Archive of SID

بررسی تأثیر تغییرات منبع کربن بر زنجیره تنفسی باکتری سودوموناس آئروژنوزا

سعید مینویی [۱]، داریوش مینایی تهرانی [۲*] و زهرا سبحانی دماوندی فر [۲]

[۱] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه آلاینده های محیطی

[۲] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، آزمایشگاه پژوهش زیستی

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳

چکیده

باکتری سودوموناس از نوع باکتریهای گرم منفی می باشد که توانایی خوبی در زیست پالایی خاکها و آبهای آلوده به نفت خام را دارد. این باکتری با اکسیداسیون مواد آلی سبب شکستن آنها و تبدیل مواد نفتی بزرگ و سنگین به مواد کوچک تر کمتر سمی یا غیرسمی می شود. زنجیره تنفسی این باکتری از سیتوکرومهایی استفاده می کند که اکسیژن را به عنوان دریافت کننده نهایی الکترون مورد استفاده قرار می دهند. زنجیره تنفسی این باکتری از سیتوکرومهای مختلفی تشکیل شده است که مهم ترین آنها شامل سیتوکرومهای a, b, c, o می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات عناصر تشکیل دهنده زنجیره تنفسی سودوموناس در حضور منابع کربن مختلف است. روش عملکرد با جداسازی و خالص سازی باکتری سودوموناس آئروژنوزا از خاک انجام شد وسپس باکتری خالص شده در منابع مختلف کربن تکثیر و طیف زنجیره تنفسی آن مطالعه شد. نتایج این تحقیق نشان داد که زنجیره تنفسی باکتری سودوموناس آئروژنوزا در محیطهایی با منابع کربن مختلف، الگوی متفاوتی را نشان می دهد. طیف زنجیره تنفسی باکتری نشان داد که در محیطهای مختلف، سیتوکرومهای نوع b و c بیش از سیتوکرومهای دیگر ظاهر می شوند که نشان دهنده استفاده باکتری از کمپلکس سیتوکروم bo است. همچنین بررسی طیف باکتری در محیطهای هگزادکان و نفت خام نشان داد که در این محیطها باکتری علاوه بر کمپلکس فوق از سیتوکروم aa_3 نیز به عنوان انتقال دهنده نهایی الکترون استفاده نموده است. نتایج فوق نشان می دهد که باکتری درحضور نفت خام و مشتقات آن که دارای منابع کربنی هستند که به سختی تجزیه می شوند از انتقال دهنده نهایی الکترون مختلف برای انتقال الکترون به اکسیژن استفاده کرده است.

واژه های کلیدی: سودوموناس، سیتوکروم، نفت خام، انتقال دهنده نهایی الکترون

*نویسندهٔ مسئول، تلفن تماس: ۲۹۹۰۳۱۴۴ ، پست الکترونیکی:D_MTehrani@sbu.ac.ir

مقدمه

زنجیره تنفسی در سلولها اهمیت زیادی در تأمین انرژی دارد. این زنجیره در سلولهای یوکاریوتی در اندامک میتوکندری قرار داشته و در انتقال الکترون به اکسیژن نقش بازی می کند (۱۶). انتقال الکترون در سلولهای پروکاریوتی دارای تفاوتها وشباهتهایی با سلولهای یوکاریوتی است به طوری که در این سلولها، زنجیره تنفسی از یکسری پروتئینهایی تشکیل شده است که در ساختمان خود دارای حلقه های پیرول، آهن و مس می باشند(۱۱ و ۱۵). تنوع سیتوکرومها در باکتریها بسیار بیشتر از سلولهای یوکاریوتی است و چندین نوع سیتوکروم که از لحاظ گروههای متصل شونده به بخش مولکول آلی هم (Heme) با یکدیگر اختلاف دارند در سلولهای پروکاریوتی دیده می شوند(۱، ۱۰ و ۲۰). در بین سیتوکرومها، اکسیدازهای انتهایی نقش انتقال دهنده نهایی الکترون را بر عهده داشته و الکترون را به اکسیژن منتقل می کنند (۳). مهم ترین اکسیدازهای انتهایی که در زنجیره تنفسی باکتریها مشاهده می شوند

www.SID.ir

Archive of SID

شامل سیتوکرومهای *a, b, d, o* می باشند (۱۴). در شرایط محیطی مختلف و همچنین در حضور منابع مختلف کربن، ممکن است اکسیدازها انتهایی مختلفی در باکتریها بیان شوند (۹ و ۲۱). باکتری سودوموناس یکی از باکتریهای گرم منفی می باشد که اهمیت زیادی در حذف آلودگیهای هیدروکربنی از آب و خاک دارد. این باکتری قادر است از راههای متابولیکی مختلف و در حضور اکسیژن سبب تخریب مواد آلی شود و در این راه از اکسیژن به عنوان آخرین دریافت کننده الکترون در زنجیره تنفسی استفاده می کند (۱۸).

زنجیره تنفسی سودوموناس در حضور اکسیژن دارای سیتوکرومهای *a, b, c, o* می باشد (۱۸). همچنین تحقیقات اخیر بیان شدن نوعی سیتوکروم مقاوم به سیانید را در سودوموناس نشان می دهد (۶، ۷ و ۸). باکتری سودوموناس گزینه مناسبی برای حذف بیولوژیک آلودگیهای نفتی در آب و خاک می باشد. در نتیجه بررسی تأثیر آلودگی بر روی متابولیسم سلول و مقایسه آن با حالت طبیعی می تواند در راستای درک بهتر عملکرد این باکتری در رفع آلودگیهای نفتی، دارای اهمیت باشد. در این مطالعه تأثیر منابع کربن مختلف بر روی زنجیره تنفسی باکتری که در ارتباط مستقیم با تأمین انرژی سلول می باشد، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

خالص سازی باکتری از خاک: خاک آلوده به مواد نفتی از نزدیکی پالایشگاه تهران به آزمایشگاه منتقل شد و مقدار ۱ گرم از آن به محیط نمکی استریل شده شامل نمک های Na_2HPO_4 2.5g/L, KH_2PO_4 2.5g/L, NH_4NO_3 1g/L که به آن مقدار (v/v) ۱ درصد هگزادکان به عنوان منبع کربن اضافه شده بود منتقل شد. محیط به مدت ۷۲ ساعت در همزن با دور ۱۵۰ دور در دقیقه هوادهی شد. سپس از محیط فوق مقدار ۱ میلی لیتر به محیط نمکی جدید انتقال داده شد و درشرایط ذکر شده کشت گردید. پس از ۷۲ ساعت مقداری کمی از محیط فوق بر روی محیط جامد شامل نوترینت آگار غنی شده با ۰/۵ در صد گلوکز کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت باکتری مشکوک به سودوموناس که کولونی آن به رنگ آبی مایل به سبز بود، به محیط جامد جدید برده و خالص گردید.

آزمایشات بعدی برای اثبات حضور سودوموناس صورت گرفت.

روشهای بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری: برای شناسایی باکتری ابتدا از رنگ آمیزی گرم استفاده شد. همچنین باکتری از لحاظ حرکت مورد بررسی قرار گرفت. برای تشخیص این باکتری از لحاظ مورفولوژیک و فنوتیپی از راهنمای کتاب راهنمای برجی برای سودوموناس استفاده شد (۲) . برای این منظور آزمایش کاتالاز با اضافه کردن یک قطره پراکسید هیدروژن به کولونی انجام شد (۴). آزمایش اکسیداز با اضافه کردن یک قطره از محلول ۱ درصد تازه تهیه شده tetramethyl-p-phenylene-diamine dihydrochloride به کاغذ فیلتر و اضافه کردن مقداری کولونی به کاغذ فیلتر انجام شد (۵). آزمایش تخمیر کربوهیدرات نیز در حضور گلوکز و بروموفنل بلو برای مشخص کردن تخمیرکنندگی باکتری انجام شد (۱۲).

کشت باکتری در منابع مختلف کربن: برای مقایسه زنجیره تنفسی باکتری در منابع مختلف کربن، باکتری خالص شده در محیطهای کشت مایع نمکی که در بالا ذکر شد و حاوی منابع مختلف کربن بود کشت گردید. این منابع شامل هگزادکان، نفت خام سنگین، اتانل و گلوکز بود که به طور جداگانه و به مقدار ۱ در صد به محیط کشت اضافه شد. همچنین باکتری در محیط غنی که شامل نوترینت برات بود نیز کشت شد. محیطهای کشت در دستگاه همزن با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گذاشته شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

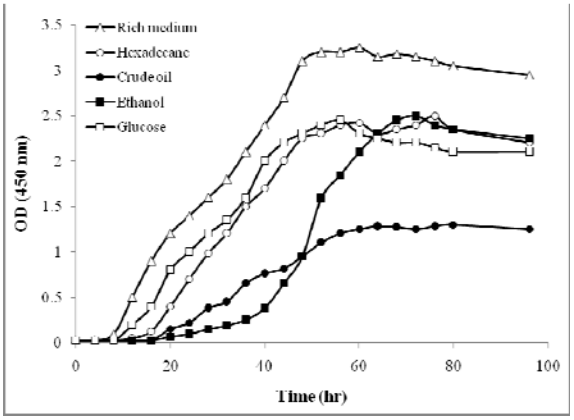
پس از این مدت محیطهای کشت در ۵۰۰۰ x g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریوفوژ شد. سلولهای رسوب شده دو بار توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH= 7 شستشو و دوباره سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی به دست آمده توزین و به عنوان وزن باکتریهای کشت شده در نظر گرفته شد. رسوب سلولی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار بگیرند.

رسم منحنی رشد: برای رسم منحنی رشد، باکتری خالص شده در **محیط غنی** و محیطهای کشت مایع نمکی که دارای منابع مختلف کربن شامل هگزادکان، نفت خام سنگین، اتانل و گلوکز به مقدار ۱ در صد بود کشت شد. محیطهای کشت در دستگاه همزن با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گذاشته شد. از هر محیط به طور جداگانه هر دو ساعت یک بار نمونه برداری انجام و کدورت محیط در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و در نهایت پس از ۹۶ ساعت نمونه گیری، منحنی رشد باکتری رسم گردید.

شکستن باکتری و تهیه عصاره سلولی: باکتریهای منجمد شده از یخچال خارج و در دمای آزمایشگاه ذوب شدند. مقدار ۱ گرم از رسوب باکتری در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH= 7 حل شد و به صورت سوسپانسیون در آمد.

سپس سلولهای موجود در سوسپانسیون سلولی توسط دستگاه اولتراسونیک با قدرت ۲۰ کیلو هرتز به ازای ۸ بار پالس ۲۰ ثانیه ای و فاصله زمانی ۱۵ ثانیه در بین دو پالس در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتی گراد شکسته شدند. سوسپانسیون به دست آمده شامل سلولهای شکسته شده و سالم بودند که برای جدا کردن سلولهای سالم، سوسپانسیون در دور ۷۰۰۰ x g به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ رسوب دور ریخته شد و محلول رویی که شامل عصاره سلولهای شکسته شده بود برای مطالعه زنجیره تنفسی استفاده شد.

بررسی زنجیره تنفسی باکتری: برای بررسی زنجیره تنفسی باکتری از عصاره سلولی استفاده شد. مقدار ۳ میلی لیتر از عصاره سلولی در دو کووت شیشه ای ریخته شد و به یکی از کووتها مقدار ۱۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد به عنوان اکسید کننده و به کووت دیگر مقداری پودر دیتیونیت سدیم به عنوان احیاء کننده اضافه شد و طیف احیائ منهای اکسید زنجیره تنفسی در عصاره سلولی ثبت شد. برای این منظور از دستگاه اسپکتروفوتومتر(Perkin Elmer DW2 UV-Visible spectrophotometer) با قابلیت اسکانینگ طول موج از ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر استفاده گردید.



شکل ۱- منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروژنوزا در محیط کشت مختلف

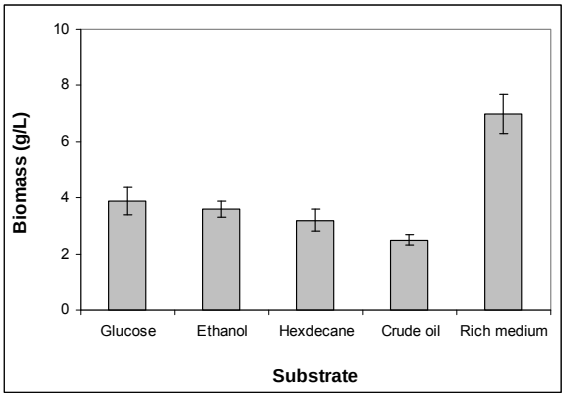
سنجش مقدار پروتئین: برای سنجش مقدار پروتئین در عصاره سلولی از روش بیوره استفاده شد. از پروتئین کازیین برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید.

محاسبه مقدار سیتوکرومها: برای محاسبه مقدار سیتوکرومها از ضریب خاموشی که برای هر سیتوکروم ثابت و مشخص است استفاده شد. با طیف به دست آمده از هر محیط و اندازه گیری ارتفاع قله هر سیتوکروم،

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت آنها محاسبه گردید. به این منظور میزان ضریب خاموشی برای سیتوکروم نوع c ، b ، aa_3 به ترتیب مقدار $14/3\ mM\ cm^{-1}$ (۲۲)، $17/5\ mM\ cm^{-1}$ (۱۳) و $11/7\ mM\ cm^{-1}$ استفاده شد(۱۴).

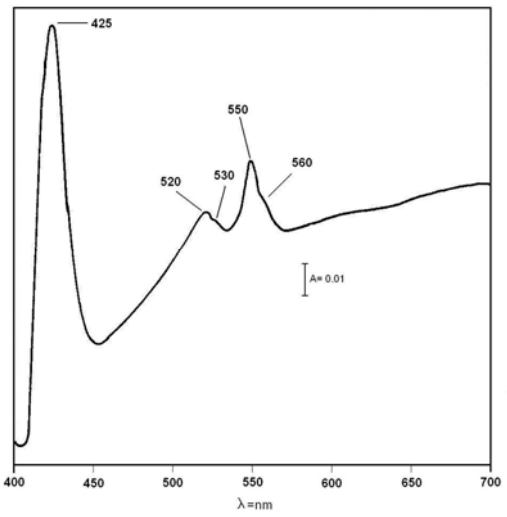


شکل ۲- نمودار مقدار سلولها در محیطهای کشت مختلف

نتایج

شناسایی باکتری: رنگ آمیزی گرم نشان داد که باکتری فوق یک باسیل گرم منفی است. این باکتری متحرک بود و در محیط پیگمانهای آبی مایل به سبز تولید کرد. باکتری به تست کاتالاز جواب مثبت داد که پس از اضافه کردن یک قطره از پر اکسید هیدروژن به کولونی آن، تشکیل حباب نشان دهنده حضور کاتالاز بود. تولید رنگ آبی مثبت بودن آزمایش اکسیداز را نشان داد. آزمایش تخمیر کربوهیدرات نیز در حضور گلوکز و بروموفنل بلو نشان داد که باکتری غیر تخمیری می باشد. با این مشخصات باکتری از نوع سودوموناس آئروجنوزا تشخیص داده شد.

منحنی رشد: منحنی رشد باکتری درحضور منابع کربن مختلف مشخص شد (شکل ۱). کوتاهترین دوره تأخیر مربوط به گلوکز و محیط غنی بود و بیشترین آن مربوط به اتانل بود. به طوری که این زمان برای اتانل حدود ۲۴ ساعت و برای گلوکز حدود ۱۰ ساعت و برای هگزادکان ۱۴ و نفت خام ۱۸ ساعت بود. تقریباً پس از حدود ۶۰ ساعت باکتری وارد فاز سکون شد. کمترین میزان کدورت سلولی در محیط نفت خام دیده شد و بیشترین آن در محیط غنی بود. در سه سوبسترای دیگر کدورت سلولی تقریباً مساوی و یکسان بود. محاسبه مقدار وزن باکتری در منابع کربن مختلف نشان داد که بیشترین مقدار باکتری به ترتیب مربوط به محیط غنی، گلوکز، اتانل، هگزادکان و نفت‌خام بوده است (شکل ۲).



شکل ۳- طیف احیای منهای اکسید عناصر تشکیل دهنده زنجیره تنفسی در باکتری سودوموناس در محیط دارای اتانل. در ناحیه α قله های ۵۵۰ و ۵۶۰ نانومتر به ترتیب مربوط به سیتوکروم c و b، در ناحیه β قله های ۵۲۰ و ۵۳۰ نانومتر به ترتیب مربوط به سیتوکروم b و c و در ناحیه γ قله ۴۲۵ نانومتر مربوط به مجموع سیتوکرومها می باشد.

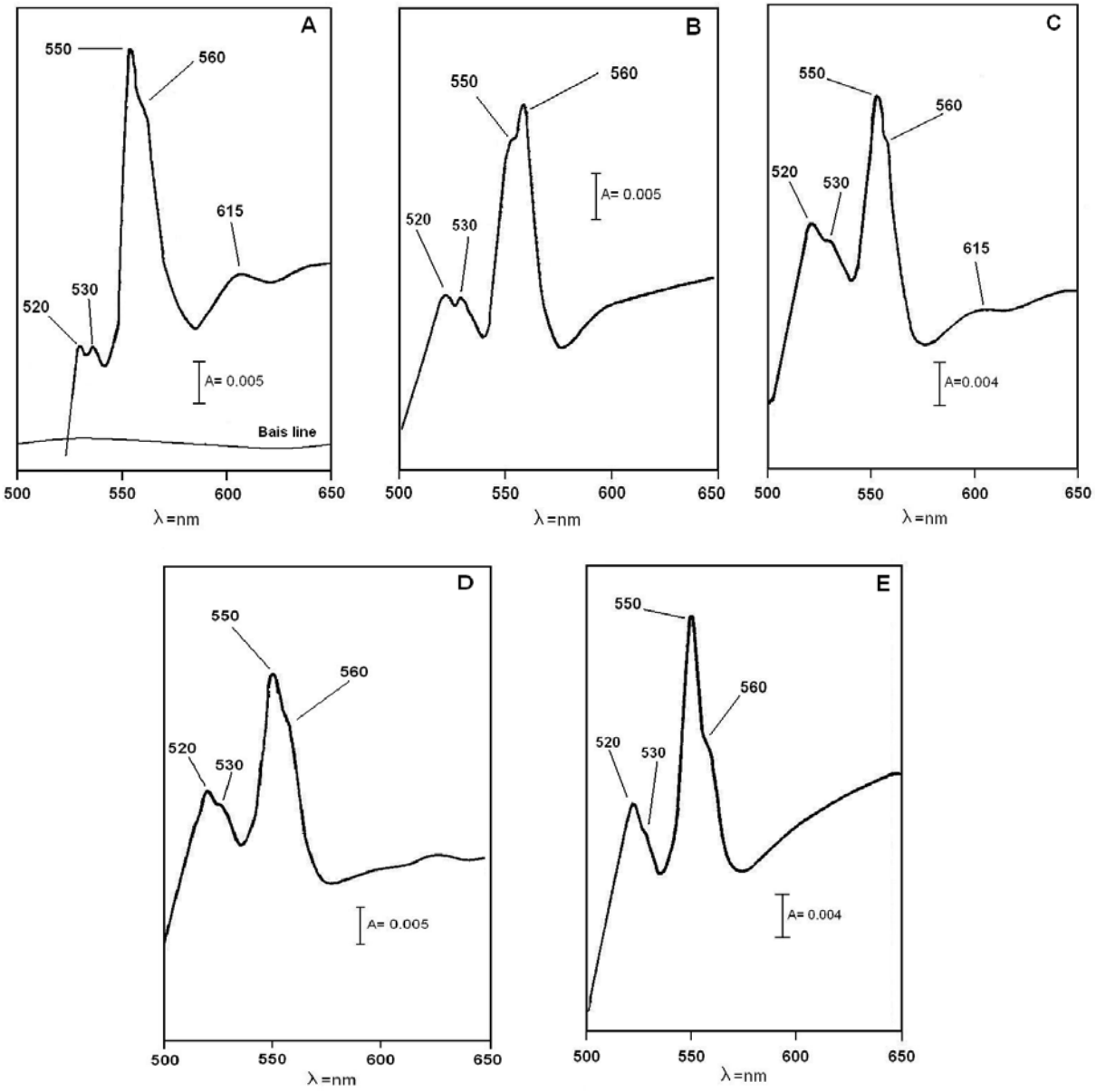
مطالعه زنجیره تنفسی باکتری در منابع کربن مختلف: برای مطالعه زنجیره تنفسی باکتری، از عصاره عاری از سلول استفاده گردید و طیف احیای منهای اکسید زنجیره تنفسی باکتری تعیین شد. در کلیه طیفها که از سوبستراهای مختلف به دست آمد، سه ناحیه مجزا در طیفها مشخص شد که شامل سه ناحیه α و β و γ بود. ناحیه α دارای یک قله در ناحیه ۵۵۰ نانومتر و یک شانه در ناحیه ۵۶۰ نانومتر است که اولی مربوط به سیتوکروم c و دومی مربوط به سیتوکرومهای نوع b است (شکل ۳). در برخی از طیفها

www.SID.ir

Archive of SID

یک قله ضعیف نیز در ناحیه ۶۱۵ نانومتر دیده می‌شوند که مربوط به سیتوکروم aa_3 بود.

قله ناحیه β در ۵۲۰ مربوط به سیتوکروم *b* و در ۵۳۰ نانومتر مربوط به سیتوکروم *c* است و قله ناحیه γ در ۴۲۵ نانومتر مربوط به مجموع سیتوکرومهای نوع *b* و *c* است. مقایسه طیف زنجیره تنفسی در حضور منابع کربن مختلف نشان داد که مقدار سیتوکرومهای عناصر تشکیل دهنده زنجیره تنفسی با تغییر منبع کربن تفاوت می کنند (شکل ۴). در تمامی محیطها به جز محیط غنی، ارتفاع قله در ۵۵۰ نانومتر که مربوط به سیتوکروم *c* می باشد از قله ۵۶۰ نانومتر که مربوط به سیتوکروم *b* است بلندتر بود. این حالت در محیط غنی برعکس بود. همچنین در محیط دارای هگزادکان و نفت خام قله کوتاهی در ناحیه ۶۱۵ نانو متر که مربوط به سیتوکروم aa_3 (سیتوکروم *c* اکسیداز) بود نیز دیده شد. این قله در محیطهای دیگر دیده نشد.

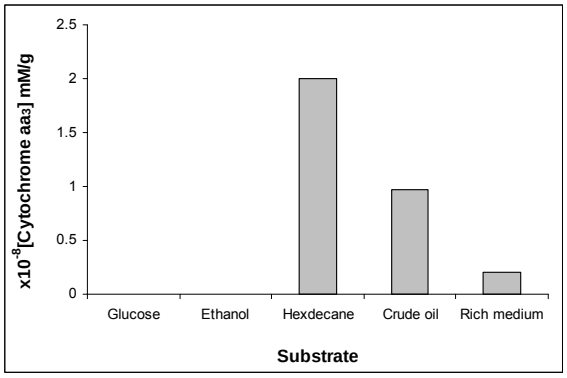


شکل ۴- طیف زنجیره تنفسی باکتری سودوموناس در منابع کربن مختلف. A) هگزادکان، B) محیط غنی، C) نفت خام، D) گلوکز، E) اتانل

www.SID.ir

Archive of SID

محاسبه مقدار سیتوکرومهای نوع *b,c* در محیطهای مختلف نشان داد که نسبت مقدار سیتوکرومهای *c/b* در تمامی نمونه ها به جز محیط غنی بیش از یک بوده در حالی که این نسبت در محیط غنی کوچکتر از یک است (جدول ۱). این حالت تفاوت بیان سیتوکرومها را در محیط غنی و محیطهای نمکی که دارای منبع کربن متفاوت هستند را نشان می دهد. مطالعه طیف زنجیره تنفسی در شکل ۴ نشان داد که در سه محیط غنی، هگزادکان و نفت خام سیتوکروم aa_3 در زنجیره ظاهر شده است که مقدار آن در محیط دارای نفت خام و هگزادکان بیش از محیط غنی بود (شکل ۵).



شکل ۵- مقدار سیتوکروم aa_3 در منابع مختلف کربن

جدول ۱- مقایسه نسبت سیتوکرومهای Cyt *c*/ Cyt *b* در محیطهای مختلف

	گلوکز	اتانل	هگزادکان	نفت خام	محیط غنی
Cyt *c*/ Cyt *b*	1.35	3.86	1.06	1.8	0.9

بحث

باکتری سودوموناس توانایی خوبی برای رشد در محیطهای مختلف کربن دارد. از این باکتری در پدیده زیست پالایی خاکهای آلوده به مواد ارگانیک استفاده می شود. به عنوان مثال می توان به توانایی این باکتری در حذف آلودگیهای نفتی در خاک و آب اشاره نمود (۱۹). در این مطالعه تأثیر منابع مختلف کربن بر زنجیره تنفسی باکتری سودو موناس آئروژنوزا بررسی گردید. اهمیت این مطالعه در این است که بتوان متوجه شد در محیطهایی که حالت استرس و غیر طبیعی را در باکتری بوجود می آورند چه تغییراتی در سیستمهای آنزیمی باکتری رخ داده و چطور باکتری می تواند خود را با این شرایط وفق دهد.

مطالعات گذشته حضور طیف گسترده ای از سیتوکرومها را در باکتریها نشان داده است (۱۴). در سودوموناس حضور سیتوکرومهای نوع *b,c*$_1$*,c, o* نشان داده شده است (۱۸). نتایج تحقیقات این مطالعه نشان داد که باکتری در حضور نفت خام و هگزادکان که یکی از مشتقات نفت خام است به خوبی رشد می کند. بررسی منحنی رشد نشان داد که مرحله تأخیر در حضور نفت خام طولانی است که این می تواند به خاطر حضور ترکیبات سمی و همچنین منابع کربنی باشد که شکستن آنها به عنوان ماده غذایی برای باکتری مشکل تر از منابع کربن ساده مثل گلوکز باشد. بررسی الگوی زنجیره تنفسی در حضور منابع مختلف کربن نشان داد که نوع سیتوکرومهای عمل کننده در تمامی محیطها یکسان است و باکتری از کمپلکس سیتوکروم *bo* اکسیداز برای انتقال الکترون به اکسیژن استفاده نموده است و حضور قله در ۵۶۰ نانومتر بر این مسئله تاکید می کند. حضور منابع مختلف کربن و دیگر **عناصر مورد نیاز برای رشد** در محیط غنی سبب شده است که الگوی زنجیره تنفسی در این محیط با محیطهای دیگر تفاوت داشته باشد و بیان کمپلکس سیتوکروم *bo* بیش از سیتوکروم نوع *c* باشد که نشان دهنده مصرف بالای اکسیژن در این محیط است. بررسی دو نوع محیط نفت خام و هگزادکان که شکستن آنها توسط برخی باکتریها از جمله سودوموناس انجام می شود، نشان داد که اگر باکتری در این منابع کربن قرار گیرد علاوه بر استفاده از کمپلکس سیتوکروم *bo*

www.SID.ir

Archive of SID

اکسیداز، از اکسیداز نهایی دیگری به نام سیتوکروم aa_3 نیز استفاده می کند.

در هر دو اکسیداز نهایی فوق، اکسیژن به عنوان دریافت کننده نهایی الکترون محسوب می شود. در واقع قرار گرفتن باکتری در منبع کربن نفت سبب شده است که باکتری برای شکستن بهتر متابولیتهای هیدروکربنهای نفتی وتبدیل آن به انرژی از یک اکسیداز نهایی دیگر نیز کمک بگیرد. در مطالعات گذشته نیز نشان داده شده است که برخی از باکتریها می توانند از ترمینال اکسیداز های مختلف برای عملکرد متابولیکی خود استفاده کنند که آنها را قادر به رشد در شرایط مختلف محیطی می کند (۱۷). بررسی تأثیر آلودگی نفتی تغییر زنجیره تنفسی سلول و مقایسه آن با حالت طبیعی می تواند در راستای درک بهتر عملکرد این باکتری در حصول انرژی برای رفع آلودگیهای نفتی، دارا ی اهمیت باشد.

منابع

1- Anraku, Y., (1988) Bacterial electron transport chains. Ann. Rev. Biochem. 57, 101-132

2- Bergey, DH, Holt JG., (1994) Bergey's manual of determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, pp: 93-94

3- Brunori, M., Wilson, M.T., (1995) Electron transfer proton pumping in cytochrome oxidase. Biochimie 77, 668-676

4- Chester, B., (1979) Semiquantitative catalase test as an aid in identification of oxidative and nonsaccharolytic Gram-negative bacteria. J. Clin. Microbiol. 10, 525-528

5- Collee, JG, Duguid, JP, Fraser, AG, Marmion, BP., (1989) Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology, Churchill Livingstone Publications (13th Edn), pp: 152

6- Cooper, M., Tavankar, GM., Williams, HD., (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 149, 1275–1284

7- Cunningham, L., Williams, HD., (1995) Isolation and Characterization of Mutants Defective in the Cyanide-Insensitive Respiratory Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 177, 432–438

8- Cunningham, L., Pitt, M., Williams, HD., (1997) The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases. Mol. Microbiol. 3, 579-591

9- Di Tomaso, G., Fedi, S., Carnevali, M., Manegatti, M., Taddei, C., Zannoni, D., (2002) The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite. Microbiology. 148, 1699-1708

10- Haddock, BA., Schairer, HU., (1973) Electron transport chains of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 35, 34-45

11- Hatefi, Y., (1985) Mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 54, 1015-1069

12- Hugh, R., Leifson, E., (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 66, 24-26

13- Jones, CW., Redfearn, ER., (1966) Electron transport in *Azotobacter vinelandii*. Biochim. Biophys. Acta. 113, 467-481

14- Jones, CW., Poole, RK., (1985) The analysis of cytochromes. Methods. Microbiol. 18, 285-328

15- Keyhani, E., (1981) The locked-cell hypthesis: on the origin of mitochondria and transition from Prokaryotic to Eukaryotic cells. Ann. NY. Acad. Sci. 361, 376-396

16- Keyhani, E., Story, BT., (1973). Energy conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotcity treated rabbit epididymal spermatozoa. Biochim. Biophys. Acta. 305, 557-569

17-Loffhagen, N., Babel, W., (2004) Influence of cytochrome composition on the energy conservation of *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V. Acta. Biotechnol. 10, 551-560

18- Matsushita, K., Yamada, M., Shingawa, E., Adachi, O., Ameyama, M., (1980) Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. J. Bactriol. 141, 389-392

www.SID.ir

Archive of SID

19- Minoui, S., Minai-Tehrani, D., Zare, A., Ahmadi, S., (2008) Effect of heavy crude oil on the pattern of respiratory chain of *Pseudomonas* sp. Terrst. Aquat. Environ. Toxicol. 2, 34-37

20- Poole, RK., (1983) Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. Biochim. Biophys. Acta. 726, 205-243

21- Reichmann, P., Gorisch, H., (1993) Cytochrome c_{550} from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. J. 289 (Pt 1), 173-178

22- Van Gelder, B., (1978) Optical properties of cytochromes from beef heart mitochondria, submitochondrial vesicles, and derived preparations. Methods Enzymol. 1978; 53:125–128

The Study of The Effect of Different Carbon Sources on *Pseudomonas Aeruginosa* Respiratory Chain.

Minoui S.[1], Minai-Tehrani D.[2] and Sobhani Damavandifar Z.[2]

[1] Environmental Pollutants Dept., Environmental Sciences Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Biology Research Lab., Faculty of Biology Science, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Pseudomonas is a gram negative bacterium which is able to biodegrade crude oil in contaminated soil and water. This bacterium can biodegrade the toxic organic materials to more simple and non-toxic materials. The respiratory chain of this bacterium contains different types of cytochromes which uses oxygen as final electron acceptor. The important cytochromes are *a*, *b*, *c* and *o*. The goal of this investigation is to study the changes of the different component of the *Pseudomonas* respiratory chain in the presence of different carbon sources. The methods include isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from the soil and allow the bacterium to grow in the presence of different carbon sources and investigate respiratory chain changes. Our results showed that the respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* in media with different carbon sources express different properties. In different media, cytochrome *b* and *c* synthesis increased more than other cytochromes, this is an indicative of cytochrome *bo* complex presence. Observing the bacterium spectrum in hexadecane and crude oil media showed that the bacterium also uses cytochrome aa_3 as the final electron acceptor. These results suggest that the bacterium use oxygen as final electron acceptor in presence of crude oil and its derivatives.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, cytochrome, crude oil, final electron acceptor

www.SID.ir