Filip KAMINSKI, Jacek POLAK, Ewa KWAPISZ, Stanisław BIELECKI

Politechnika Łódzka, Instytut Biochemii Technicznej 90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10

PLAZMIDY BAKTERII DEGRADUJĄCYCH WĘGLOWODORY ROPY NAFTOWEJ

Streszczenie. W pracy potwierdzono metodą elektroforezy pulsacyjnej obecność plazmidów u 24 szczepów bakteryjnych zdolnych do degradacji węglowodorów ropy naftowej. W odniesieniu do pięciu plazmidów określono wielkość oraz podatność na trawienie enzymem restrykcyjnym Eco RI. Z wyjątkiem najmniejszego spośród nich, któremu przypisano funkcję niesienia cech opornościowych, wszystkie pozostałe zakwalifikowano do grupy plazmidów katabolicznych.

PLASMIDS OF BACTERIA DEGRADING HYDROCARBONS OF PETROLEUM OIL

Summary. The presence of plasmids was confirmed in 24 strains of bacteria degrading hydrocarbons of petroleum oil by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Their size and susceptibility to Eco RI digestion was established for five of them. Four plasmids were designated as catabolic and the smallest one as resistance conferring.

WPROWADZENIE

Głównymi źródłami zanieczyszczeń środowiska węglowodorami ropopochódnymi są nieszczelności w rurociągach, zbiornikach składowania i na stacjach przeładunkowych, usuwany ze statków brudny balast i wody zęzowe, a w mniejszym stopniu ścieki komunalne i przemysłowe [1, 2]. Poszczególne emisje, jakkolwiek ilościowo nieznaczne w porównaniu z wypadkami tankowców, występują często w wystarczającym natężeniu, by wymagać oczyszczenia. Opracowanie skutecznych technologii bioremediacji takich niewielkich obszarów gruntów bądź wód śródlądowych objętych skażeniami stanowi największe wyzwanie, gdyż doprowadziłoby w efekcie do jakościowej poprawy stanu środowiska.

Dotychczasowe badania wykazały, że obecność w środowisku węglowodorów stanowi czynnik selekcjonujący mikroflorę wykorzystującą tego rodzaju źródło węgla. Wśród drobnoustrojów wykazujących zdolności degradacyjne wobec węglowodorów najczęściej występują bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacilli* W przypadku bakterii źródłem cech umożliwiających katabolizm węglowodorów często są pozachromosomalne elementy genetyczne, czyli plazmidy. Według różnych autorów od 50% do 90% szczepów bakteryjnych wykazujących zdolności degradacji substratów węglowodorowych posiada takie plazmidy zwane katabolicznymi [3]. Różnorodność związków wchodzących w skład ropy naftowej determinuje wielość występujących szlaków ich katabolizmu przez drobnoustroje obecne w przyrodzie. Zdolność do degradacji danej frakcji węglowodorów przez określony mikroorganizm wiąże się ściśle ze specyficznością substratową enzymów, głównie oksygenaz. Można tutaj wyróżnić plazmidy CAM [4], OCT [5] kodujące enzymy szlaków degradacji węglowodorów alifatycznych. Również utylizacja węglowodorów aromatycznych jest kodowana w wyspecjalizowanych plazmidach, takich jak TOL [6], TOM [7], NAH [8], SAL [9], XYL [10] i wielu innych.

Ze względu na złożoność szlaków oksydacyjnych tego rodzaju plazmidy często mogą być bardzo dużych rozmiarów, niekiedy nawet do 20% bakteryjnego chromosomu [11, 12]. Niemożliwe jest wyizolowanie tak dużych cząsteczek plazmidowego DNA w formie natywnej metodą konwencjonalnej preparatyki. Technika elektroforezy w pulsującym polu elektrycznym (PFGE) pozwala ograniczyć mechaniczne uszkodzenia podczas izolowania DNA, a także umożliwia jego analizę.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakteryjne

Stosowane w pracy szczepy bakteryjne oznaczone A 33.3, A 33.5, G 3, P 30.1, i R 5 wyizolowano z różnych frakcji ropy naftowej, slopów (osadów z instalacji i zbiorników), próbek skażonej gleby z terenu rafinerii, a także osadu czynnego jej oczyszczalni.

Podłoża hodowlane

Szczepy bakteryjne przechowywano na płytkach ze stałym podłożem o składzie: glukoza (0,2%), ekstrakt drożdżowy (0,2%), Na₂HPO₄ (0,15%), NH₄Cl (0,25%), agar (2,5%). Powierzchnię zestalonego podłoża pokrywano cienkim filmem sterylnej ropy naftowej. Szczepy uaktywniano na stałym podłożu LB. Hodowle płynne drobnoustrojów prowadzono w podłożu, zawierającym ropę naftową jako czynnik presji selekcyjnej i główne źródło węgla, o składzie: glukoza (0,2%), ekstrakt drożdżowy (0,2%), Na₂HPO₄ (0,15%), NH₄Cl (0,25%), ropa naftowa (6%), pH 6,5.

Enzymy

W przygotowaniu próbek do elektroforezy pulsacyjnej wykorzystywano lizozym i proteinazę K (*Sigma*). Plazmidowy DNA trawiono endonukleazą Eco RI (*MBI Fermentas*). Linearyzacji plazmidowego DNA dokonywano nukleazą S1 (*Boehringer Mannheim*).

Metody hodowli

W procedurze preparatyki plazmidowego DNA hodowle prowadzono w 250 ml kolbach stożkowych, zawierających 40 ml płynnego podłoża na wstrząsarce, przy obrotach 250 rpm,

w temperaturze 30°C przez 72 h. Hodowle przeznaczone do analizy metodą elektroforezy pulsacyjnej prowadzono w 100 ml kołbach stożkowych, zawierających 10 ml płynnego podłoża w ww. warunkach.

Preparatyka plazmidowego DNA

Plazmidowy DNA izolowano metodą alkalicznej preparatyki [13].

Elektroforeza jednokierunkowa

Rozdziału DNA dokonywano w 0,7% żelach agarozowych w buforze TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,0), przy stałym napięciu 4 V/cm. Jako markera wielkości fragmentów używano λDNA trawionego enzymem Hind III.

Przygotowanie próbek do PFGE

Komórki z hodowli płynnej odwirowano przy 40000 g przez 10 min w temp. 4°C. Osad przemywano w 2 ml buforu CSB (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5), odwirowano przy 7300 g przez 5 min Komórki zawieszano w 1 ml CSB. Ilość biomasy oceniano spektrofotometrycznie. Próbki rozcieńczano w CSB do stężenia 5-10⁹ komórek/ml.

Do 100 µl zawiesiny bakteryjnej dodawano 10 µl buforu LDB (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,5% sarkosyl, 0,2% deoksycholan sodu, 1 mg/ml lizozym, pH 7,2), delikatnie mieszano, dodawano 110 µl 2% roztworu agarozy LMP (*Bio-Rad*) w buforze TBE o temp 50°C i bardzo delikatnie mieszano. Zawartość probówki przenoszono do dwóch foremek po 100 µl. Próbki pozostawiano na 15-20 min na stole w celu zestalenia. Po 2 bloczki żelu przenoszono do 1 ml buforu LDB. Lizę ściany komórkowej unieruchomionych w żelu bakterii prowadzono przez 1-4 h (wcześniej ustalono optymalny czas) w temp. 37°C.

Po usunięciu buforu lizującego przemywano bloczki w 1 ml buforu WB (20 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0) przez 15 min w temp. pok. Bloczki przenoszono do 1 ml buforu ESP (100 mM EDTA, 1% sarkosyl, 0,5% deoksycholan sodu, 1 mg/ml proteinaza K, pH 8,0) i inkubowano przez noc w 50°C w celu odbiałczenia DNA i degradacji obecnych nukleaz. Bloczki płukano czterokrotnie po 45 min w 1 ml buforu WB i przechowywano w temp. 4°C w buforze WB.

Linearyzacja plazmidowego DNA

Bloczek przemywano trzykrotnie w 1 ml 10 mM Tris-HCl po 15 min Po usunięciu ostatniej porcji Tris-HCl próbkę przemywano 1 ml buforu NIB (33 mM octan sodu, 50 mM NaCl, 1 mM ZnSO₄, pH 4,5) przez 30 min Następnie umieszczano w 300 µl NIB z dodatkiem 1 µl (2 J) nukleazy S1 i inkubowano przez 1,5 h w temp. 37°C. Reakcję przerywano przez przeniesienie próbki do 200 µl roztworu 0,5 M EDTA o temp. 4°C.

Elektroforeza w pulsującym polu elektrycznym

Elektroforezę prowadzono w aparacie CHEF-DR II (*Bio-Rad*). Rozdziały prowadzono w żelach o grubości 8-10 mm w 1% agarozy PFC (*Bio-Rad*) wprowadzając bloczki o wymiarach 5×6×1,5 mm. Stosowano bufor TBE, cyrkulujący z natężeniem przepływu 1 l/min Doświadczalnie ustalono następujące parametry dwóch etapów elektroforezy: pierwszego - temp. buforu 12°C, gradient napięcia 5,4 V/cm, czas 15-18 h, początkowa pulsacja pola elektrycznego 5 s, końcowa 12 s; drugiego - temp. buforu 12°C, gradient napięcia 5,4 V/cm, czas 12-15 h, początkowa pulsacja pola elektrycznego 20 s, końcowa 30 s.

Markerem wielkości fragmentów był λ DNA trawiony Hind III oraz konkatamery faga λ (tzw. "*lambda ladder*"). Po elektroforezie żele wybarwiano w roztworze 0,5 µg/ml bromku etydyny przez 40 min Po wypłukaniu w wodzie destylowanej (20 min) zbierano obraz fluorescencji w świetle UV przy pomocy zestawu "BioVision" (*Biogene*).

WYNIKI

Rozdziały elektroforetyczne pozachromosomalnego materiału genetycznego pochodzącego z bakterii zdolnych do degradacji węglowodorów prowadzone techniką jednokierunkową oraz w pulsującym polu elektrycznym potwierdziły obecność plazmidów u 24 testowanych szczepów. Analiza z wykorzystaniem trawienia restrykcyjnego i linearyzacji superskręconego kolistego DNA umożliwiła wstępne scharakteryzowanie pięciu plazmidów.

Plazmid pA33.3 (rys.1) zawiera w obrębie swojej sekwencji nukleotydowej jedenaście miejsc rozpoznawanych przez enzym restrykcyjny Eco RI. W wyniku trawienia powstają fragmenty o długościach 16,6, 11,0, 8,8, 7,3, 5,8, 4,2, 3,2, 2,9, 2,1, 1,7 i 1,5 tysięcy par zasad (kbp). Zsumowanie długości utworzonych odcinków DNA wskazuje, że wielkość jego cząsteczki wynosi 65,1 kbp. Linearyzacja pA33.3 nukleazą S1 i elektroforeza PFGE sugerują 62 kbp jako najbardziej prawdopodobny rozmiar plazmidu. Intensywna fluorescencja na ścieżkach próbek nietrawionych enzymami świadczy o stosunkowo dużej liczbie kopii, w jakiej plazmid ten występuje w komórce. Można przypuszczać, że cząsteczka pA33.3 zawiera fragment szczególnie wrażliwy na uszkodzenia mechaniczne bądź działanie endogennej nukleazy, bowiem w wyniku elektroforezy obserwuje się zawsze pewną ilość formy liniowej DNA.

Plazmid zbliżony pod względem wielkości do poprzedniego wyizolowano z komórek szczepu A 33.5 (rys.2). Trawienie Eco RI cząsteczki pA33.5 powoduje powstanie również jedenastu fragmentów o długościach: 15,2, 9,4, 8,6, 6,6, 5,5, 3,8, 3,0, 2,6, 1,9, 1,7, 1,5 kbp. Całkowitą wielkość tego plazmidu można na tej podstawie szacować na 58,8 kbp. Rezultaty cięcia nukleazą S1 i elektroforezy pulsacyjnej potwierdzają wcześniejsze wyliczenia wskazując rozmiar pA33.5 na poziomie 59 kbp. Niewielka różnica wielkości obu cząsteczek oraz zbliżone długości fragmentów restrykcyjnych Eco RI wskazują na znaczne podobieństwo plazmidów pA33.3 oraz pA33.5. Względnie duża liczba kopii w komórce i wrażliwość na endogenne nukleazy stanowią dalsze analogie pomiędzy tymi cząsteczkami DNA.



- Rys. 1. Elektroforeza jednokierunkowa plazmidowego DNA wyizolowanego ze szczepu A 33.3 nietrawionego (1) i trawionego enzymem Eco RI (2) oraz elektroforeza PFGE nietrawionego (3) i trawionego nukleazą SI (4). Wielkość fragmentów DNA jest podana w tysiącach par zasad
- Fig. 1. Unidirectional electrophoresis of plasmid DNA from A 33.3 strain; undigested (1) and digested with Eco RI (2) and PFGE electrophoresis undigested (3) and digested with nuclease S1 (4). Fragments size is expressed in kilobase pairs



- Rys. 2. Elektroforeza jednokierunkowa plazmidowego DNA wyizolowanego ze szczepu A 33.5 nietrawionego (1) i trawionego enzymem Eco RI (2) oraz elektroforeza PFGE nietrawionego (3) i trawionego nukleazą SI (4). Wielkość fragmentów DNA jest podana w tysiącach par zasad
- Fig. 2. Unidirectional electrophoresis of plasmid DNA from A 33.5 strain; undigested (1) and digested with Eco RI (2) and PFGE electrophoresis undigested (3) and digested with nuclease S1 (4). Fragments size is expressed in kilobase pairs

Megaplazmid pG3 (rys.3) migruje w żelu podczas elektroforezy jednokierunkowej, w postaci mniejszych fragmentów wynikających w większości z mechanicznej fragmentacji, nieuniknionej podczas jego preparatyki. W wyniku trawienia Eco RI ujawniono dziesięć fragmentów o długościach: 26,3, 20,6, 17,2, 13,9, 7,4, 4,7, 4,5, 3,0, 1,5 i 1,4 kbp, których suma wynosi 100,5 kbp. Elektroforeza pulsacyjna próbki poddanej trawieniu nukleazą SI pozwoliła określić rozmiar pG3 na poziomie 112 kbp. Przyczynę rozbieżności wyników uzyskanych różnymi metodami stanowi prawdopodobnie współmigracja niektórych fragmentów restrykcyjnych z innymi odcinkami DNA wykazującymi również silną fluorescencję. Uzasadnione wydaje się przypuszczenie, że w sekwencji tego plazmidu znajduje się więcej niż dziesięć miejsc restrykcji dla Eco RI. Godna uwagi wydaje się stabilność tego pozachromosomalnego elementu i odporność na działanie nukleaz przejawiająca się w wyraźnie zarysowanych prążkach na żelu. Ze względu na swój duży rozmiar pG3 występuje w komórce prawdopodobnie w niewielkiej liczbie kopii, lecz wydaje się prawdopodobne istnienie mechanizmu zapobiegającego utracie plazmidu w czasie replikacji i podziału na komórki potomne.



- Rys. 3. Elektroforeza jednokierunkowa plazmidowego DNA wyizolowanego ze szczepu G 3 nietrawionego (1) i trawionego enzymem Eco RI (2) oraz elektroforeza PFGE nietrawionego (3) i trawionego nukleazą SI (4). Wielkość fragmentów DNA jest podana w tysiącach par zasad
- Fig. 3. Unidirectional electrophoresis of plasmid DNA from G 3 strain; undigested (1) and digested with Eco RI (2) and PFGE electrophoresis undigested (3) and digested with nuclease S1 (4). Fragments size is expressed in kilobase pairs

Trawienie plazmidu wyizolowanego z komórek szczepu P 30.1 (rys.4) restryktazą Eco RI powoduje powstanie dwóch fragmentów o długości 3,8 i 2,2 kbp. Łączna długość obu fragmentów, określająca rozmiary pP30.1, wynosi 6 kbp. Trzy prążki widoczne na ścieżce próbki niepoddanej trawieniu obrazują trzy formy konformacyjne tego samego DNA obecne po preparatyce. Najszybciej migruje w żelu w warunkach elektroforezy forma superskręcona (sc), zaś najwolniej porusza się konformacja kolista zrelaksowana (oc). Środkowy prążek charakteryzujący się najsłabszą fluorescencją przypisano obecności niewielkiej ilości formy liniowej (1), na co wskazuje dodatkowo wielkość tej cząsteczki DNA, szacowana na 6 kbp. Ze względu na swoje małe rozmiary i stąd znaczną szybkość migracji niemożliwa była analiza pP30.1 metodą PFGE wg przyjętych parametrów.



- Rys. 4. Elektroforeza jednokierunkowa plazmidowego DNA wyizolowanego ze szczepu P 30.1 nietrawionego (1) i trawionego enzymem Eco RI (2). Wielkość fragmentów DNA podana jest w tysiącach par zasad
- Fig. 4. Unidirectional electrophoresis of plasmid DNA from P 30.1 strain; undigested (1) and digested with Eco RI (2). Fragments size is expressed in kilobase pairs



- Rys. 5. Elektroforeza jednokierunkowa plazmidowego DNA wyizolowanego ze szczepu R 5 nietrawionego (1) i trawionego enzymem Eco RI (2) oraz elektroforeza PFGE nietrawionego (3) i trawionego nukleazą SI (4). Wielkość fragmentów DNA jest podana w tysiącach par zasad
- Fig. 5. Unidirectional electrophoresis of plasmid DNA from R 5 strain; undigested (1) and digested with Eco RI (2) and PFGE electrophoresis undigested (3) and digested with nuclease SI (4). Fragments size is expressed in kilobase pairs

Wyizolowanie i określenie rozmiaru megaplazmidu pR5 (rys.5) było możliwe jedynie dzięki zastosowaniu elektroforezy pulsacyjnej. Wielkość tego plazmidu określono metodą trawienia nukleazą S1 i późniejszej PFGE na 152 kbp. W warunkach elektroforezy jednokierunkowej nie obserwowano migracji, a jedynie obecność DNA w celi żelu. Dodatkowy problem związany z badaniem pR5 stanowi jego całkowita odporność na restrykcję enzymem Eco RI. Podobnie jak w przypadku pG3 zaobserwowano dużą stabilność cząsteczki plazmidowego DNA, choć w czasie przygotowania próbek do PFGE zachodziła w niewielkim stopniu konwersja do formy liniowej. Liczba kopii pR5 w komórce jest niewielka, ale można przypuszczać istnienie mechanizmów zapewniających stabilność dziedziczenia.

DYSKUSJA

Analizy metodami elektroforezy jednokierunkowej i pulsacyjnej pozwalają na ocenę rozmiarów plazmidów, wrażliwości na trawienie enzymem Eco RI, a także sugerują informacje o liczbie kopii w komórce, czy stabilności cząsteczki w procesie jej dziedziczenia. Na podstawie przeprowadzonych badań nie sposób jednoznacznie stwierdzić, że wyizolowane plazmidy niosą geny zaangażowane w katabolizm węglowodorów. Wielkość tych elementów i ich występowanie w komórkach bakterii zdolnych do degradacji związków ropopochodnych stanowią pośrednie dowody wspierające taką tezę.

Duże rozmiary pozachromosomalnych elementów uczestniczących w degradacji węglowodorów wynikają z ilości i złożoności struktury biorących w nich udział białek enzymatycznych. Plazmid pP30.1 nie należy do grupy degradacyjnych, bowiem jego wielkość ok. 6 kbp nie pozwala na umiejscowienie w nim materiału genetycznego odpowiedzialnego za funkcjonowanie pełnego szlaku metabolicznego. Można sądzić, że niesie on geny oporności wobec antybiotyków czy metali ciężkich lub kodujące proste enzymy katabolizmu nietypowych substratów. Intensywny wzrost szczepu P 30.1 w płynnym podłożu zawierającym ropę naftową jako główne źródło węgla świadczy o obecności genów katabolizmu węglowodorów w bakteryjnym chromosomie.

Wielkość informacji genetycznej niesionej w plazmidzie pA33.3 (65,1 kbp) i stosunkowo dobre wyniki w badaniach ilościowych zużycia substratu węglowodorowego wskazują na jego charakter kataboliczny. Plazmid ten koduje prawdopodobnie enzymy uczestniczące w degradacji jednej z grup związków ropopochodnych, zaś jego stabilność w warunkach braku presji selekcyjnej w środowisku wiąże się ze stosunkowo dużą liczbą kopii w komórce.

Podobieństwo plazmidu pA33.5 do pA33.3 stanowi potwierdzenie powyższych spostrzeżeń również w odniesieniu do niego. Ilościowy stopień degradacji ropy naftowej sięgający 30-40% pozwala sądzić, że szczep A 33.5 jest zdolny jedynie do wykorzystywania niewielkiej części całkowitej puli węglowodorów.

Zastosowanie elektroforezy pulsacyjnej do rozdziału DNA pozwoliło wykluczyć obecność systemu wieloplazmidowego i jednoznacznie potwierdzić obecność pojedynczego plazmidu w komórkach szczepu G 3. Wielkość pG3 wyznaczona na 112 kbp plasuje go wśród typowych opisanych w literaturze plazmidów degradacyjnych [6, 7, 14, 15]. Skonfrontowanie go ze znanymi plazmidami wymagałoby jednak zidentyfikowania substratów kodowanych w nim szlaków i zanalizowania wzoru trawienia innymi niż Eco RI enzymami restrykcyjnymi lub wykorzystania technik hybrydyzacji jego DNA z odpowiednimi sondami molekularnymi. Niższe niż 50% zużycie węglowodorów ropy naftowej nie wyklucza przydatności szczepu G 3 w technologiach bioremediacji, gdyż często ważniejsze jest usunięcie określonej frakcji (np. WWA) od degradacji ogólnej puli węglowodorów.

Plazmid pR5 o wielkości 152 kbp wykazuje odporność na trawienie Eco RI, co uniemożliwiło jego analizę restrykcyjną. Stopień zużycia węglowodorów obecnych w ropie naftowej przez szczep R 5 wyznaczony eksperymentalnie na ponad 90% przemawia za katabolicznym charakterem plazmidu, choć nie jest wykluczona obecność niektórych genów degradacyjnych w chromosomie. Wysoka aktywność emulgująca i stabilność wraz z ww. cechami czynią ten genetyczny element szczególnie atrakcyjnym do dalszych badań.

Opracowanie racjonalnych podstaw manipulowania genami w celu otrzymania udoskonalonych drobnoustrojów przydatnych w bioremediacji drogą planowej rekombinacji *in vivo* bądź *in vitro* wymaga prowadzenia dalszych studiów. Wiele spośród tych eksperymentów, jak np. ustalenie substratów węglowodorowych zużywanych przez poszczególne szczepy, nie wymaga angażowania kosztownych technik inżynierii genetycznej. Znajomość spektrum utylizowanych związków ma kluczowe znaczenie dla określenia stopnia homologii pozachromosomalnego DNA z kultur posiadanej kolekcji z poznanymi wcześniej plazmidami degradacyjnymi. Bliższe scharakteryzowanie genów i ich białkowych produktów u nowych, nieznanych plazmidów, a także ewentualne próby rekombinacji DNA *in vitro* wymagają opracowania dokładniejszych map restrykcyjnych dla poszczególnych cząsteczek. Kontynuowanie prac w obu powyższych kierunkach wydaje się celowe i pożądane, przy czym podkreślenia wymaga znaczenie technik eksperymentalnych dostosowanych do specyficznych cech plazmidów katabolicznych, a także ich drobnoustrojowych gospodarzy.

LITERATURA

- 1. Head I.M, Swannell R.P.J.: Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Curr. Opin. Biotechnol., 10, 234-239, 1999.
- Rosenberg E., Ron E.Z.: Bioremediation of petroleum contamination. W: Bioremediation: Principles and Applications (Crawford R.L., Crawford D.L., ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 100-124, 1996.
- 3. Boronin A.M.: Diversity of Pseudomonas plasmids: To what extent? FEMS Microbiol. Lett., 100, 461-468, 1992.
- 4. Chakrabarty A.M., Chou G., Gunsalus I.C.: Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in Pseudomonas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1137-1140, 1973.
- 5. Eggink G., Lagevegen R.G., Altenburg B., Witholt B.: Controlled and functional expression of the Pseudomonas oleovorans alkane utilizing system in Pseudomonas putida and Escherichia coli. J. Biol. Chem., 262, 17712-17718, 1987.
- 6. Williams P.A., Worsey M.J.: Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. J. Bacteriol., 125, 818-828, 1976.
- 7. Shields M.S., Reagin M.J., Gerger R.R., Campbell R., Somerville C.: TOM, a new aromatic degradative plasmid from Burkholderia (Pseudomonas) cepacia G4. Appl. Environ. Microbiol., 61, 1352-1356, 1995.
- 8. Dunn N.W., Gunsalus I.C.: Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. J. Bacteriol., 114, 974-979, 1973.
- 9. Chakrabarty A.M.: Genetic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas. J. Bacteriol., 112, 815-823, 1972.
- 10. Cork D.J., Krueger J.P.: *Microbial transformation of herbicides and pesticides*. Adv. Appl. Microbiol., 36, 1-66, 1991.

- 11. Frantz B., Chakrabarty A.M.: Degradative plasmids in Pseudomonas. W: The Bacteria, vol. X, (Sokatch J.R., ed.). Academic Press, London, 295-323, 1986.
- 12. Hooper D.J., Kemp P.D.: Regulation of enzymes of the 3,5-xylenol degradative pathway in Pseudomonas putida: evidence for a plasmid. J. Bacteriol., 142, 21-26, 1980.
- 13. Birnboim H.C., Doly J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., 7, 1513-1523, 1979.
- Tan H.-M., Mason J.R.: Cloning and expression of the plasmid-encoded benzene dioxygenase genes from Pseudomonas putida ML2. FEMS Microbiol. Lett., 72, 259-264, 1990.
- Meer J.R. van der, Neerven A.R.V. van, Vries E.J. de, Vos V.M. de, Zehnder A.J.B.: Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of Pseudomonas sp. strain P51, J. Bacteriol., 173, 6-15, 1991.

Abstract

The presence of plasmids was confirmed in 24 strains of bacteria degrading hydrocarbons of petroleum oil by unidirectional gel electrophoresis and megaplasmids were isolated from cells by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Their size and susceptibility to Eco RI digestion was established for five of them. The PFGE has appeared as an efficient method for isolation of high molecular DNA from bacterial cells in intact state. The size of four large plasmids ranges from 59 kbp to 152 kbp. Therefore, their capacity is enough to code some catabolic pathways. The patterns of Eco RI digestion indicate high similarity of plasmids isolated from strains A 33.3 and A 33.5. The largest plasmid isolated from the best hydrocarbon degrader (utilization of over 90% hydrocarbons) is not digested by Eco RI. The smallest DNA molecule is of size 6.0 kbp, similar to plasmids coding resistance to antibiotics or heavy metals.

Recenzent: Prof. dr hab. Barbara Maliszewska-Kordybach