

**PHYSIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF A  
N-ALKANE-DEGRADING STRAIN OF ACINETOBACTER  
CALCOACETICUS ISOLATED FROM LAGUNA VENETA**

R. FANI<sup>1</sup>, A. GRIFONI<sup>1</sup>, L. DA ROS<sup>2</sup>, V.U. FOSSATO<sup>2</sup>,  
A. GUIDONI<sup>3</sup>, M. PEPI<sup>3</sup> and F. BALDI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipart. di Biologia Animale e Genetica, Univ. di Firenze, Via Romana 17, Firenze, Italia  
<sup>2</sup> Istituto di Biologia del Mare, C.N.R., Castello 1364/A, 30122 Venezia, Italia  
<sup>3</sup> Dipart. di Biologia Ambientale, Univ. di Siena via Mattioli, 4, 53100 Siena, Italia

The presence of petroleum into the oceans represents one of the most important cause of the marine pollution. The major contribution of petroleum into the oceans has been attributed to deliberate releases of oil from marine operations followed by accidental spills in connection with oil transport. The role of oil degrading bacteria is known since 1950, but only later the molecular genetics of oil degradation was studied (CHAKRABARTY *et al.*, 1973). In spite of the enumeration of oil degrading bacteria carried out frequently in many parts of the world, the identification at genus, species and strains level of these bacteria is poorly investigated. The presence of oil degrading bacteria was investigated in water samples collected throughout the Laguna Veneta (GALASSI and CANZONIER, 1978) and the effect of phosphate and nitrate concentration on the kinetics of oil biodegradation in the lagoon water were also investigated.

Sixty three strains of oil degrading bacteria were isolated from three different stations of the Laguna Veneta; one of these strains, VE-C3, was isolated from station C. The *n*-alkane degrading activity of this strain was tested by gas chromatography equipped and the degradation rate of respiratory activity was measured under laboratory condition by oxygen consumption determined by Clark's electrode.

Physiological tests allowed to assign this strain to the species *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *haemoliticus*. In this study we also report the molecular characterization of this strain including determination of 16S rDNA sequence, plasmid profile and identification of genes homologous to *Pseudomonas oleovorans alk* genes. The 16S rDNA from strain VE-C3 was obtained via PCR by amplifying the genomic DNA with ad hoc oligonucleotides designed on the basis of conserved prokaryotic 16S rDNA. The nucleotide sequence obtained showed the highest degree of sequence homology with the *A. calcoaceticus* 16S rDNA, showing a correspondence in the genus assignment performed by physiological and molecular methods.

Since in *P. oleovorans* the *alk* genes that are responsible for *n*-alkane degradation are localized on OCT plasmid (GRUND *et al.*, 1975; EGGINK *et al.*, 1987), the presence of plasmid(s) was investigated by agarose gel electrophoresis of the DNA extracted. The electropherogram showed the presence of two plasmids of different dimensions, 10 and 20 kb (figure 1). To verify if the ability to degrade *n*-alkanes possessed by VE-C3 strain could be due to the presence of genes homologous to the *P. oleovorans alk* genes, a Southern blotting experiment was carried out using as probe the 4.58 PstI-PstII fragment containing *P. oleovorans alk* BFGH genes.

The targets were represented by total DNA and plasmid DNA previously digested by appropriate restriction enzymes. The hybridization signals obtained were found on chromosomal and plasmid DNA of VE-C3 strain showing the presence of genes homologous to the *P. oleovorans alk* genes with genomic and plasmidic location; this fact suggested that the organization of the *alk* genes in *A. calcoaceticus* could be different from that of *P. oleovorans*.

**REFERENCES**

CHAKRABARTY A.M., CHOU G. and GUNSALUS C., 1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 : 1137-1140.  
EGGINK G., VAN LELYVELD P.H., ARNBERG A., ARFMAN N., WITTEVEEN C. and WITTHOLT B., 1987. Structure of the *Pseudomonas putida alk*BAC operon. Identification of transcription and translational products. *J. Biol. Chem.*, 262 : 6400-6406.  
GALASSI S. and CANZONIER W. J., 1977. Applicazione di un nuovo metodo per la determinazione dei batteri che degradano idrocarburi nel bacino meridionale della laguna veneta. *Atti Ist. Veneto Sci.*, 135 : 157-167.  
GRUND A., SHAPIRO J., FENNEWALD M., BACHA P., LEAHY J., MARKBREITER K., NIEDER M., and TOEPFFER M., 1975. Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 139 : 546-556.

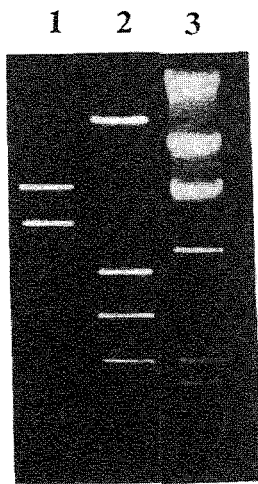


Figure 1. Plasmid profile of *A. calcoaceticus* strain VE-C3. Lanes: 1) VE-C3 plasmid DNA; 2) VE-C3 plasmid DNA digested with EcoRI restriction enzyme; 3) molecular weight marker  $\lambda$  DNA/HindIII.

**LES ALGUES MARINES, SOURCE D'OSMOPROTECTEURS  
POUR ESCHERICHIA COLI**

GHOUL Mostefa

Laboratoire d'écologie microbienne, Institut de biologie,  
Université de Sétif, 19000 Algérie

L'étude de la croissance de *E. coli* en milieu salé et de l'accumulation intracellulaire d'osmoprotecteurs en présence d'algues marines macroscopiques a été menée. Seize souches de *E. coli* ont été isolées pour ce travail, toutes isolées du milieu marin. Les algues macrobenthiques appartiennent aux Phéophycées : *Ascophyllum nodosum* et *Fucus serratus*, aux Chlorophycées : *Ulva lactuca* et *Enteromorpha ramulosa*, et aux Rhodophycées : *Palmaria palmata*.

L'étude de l'halotolérance bactérienne d'une population de *E. coli* est réalisée sur deux types d'extraits : aqueux et hydro-alcooliques. D'une part, chaque algue (2,5g, poids humide) est finement coupée et immergée dans 50 ml de M63, milieu minéral minimum, additionné de glucose (10 mM). L'osmolarité du milieu est augmentée par addition de NaCl aux concentrations finales suivantes : 0 - 0,5 - 0,68 - 0,85 - 1,02 - 1,20 M. Les milieux sont autoclavés à 110 °C pendant 30 mn. Après décantation, les surmargeants constitueront les extraits aqueux. D'autre part, 50 g d'algue (poids humide) sont homogénéisés au mixer dans de l'éthanol 70% (v/v). Après décantation, les extraits hydro-alcooliques sont filtrés, évaporés à sec puis récupérés dans 10 ml d'eau distillée. Les extraits sont ajoutés aux solutions de M63 à la dilution finale 10<sup>-2</sup>. Des témoins, sans apport d'algues et en présence de glycine bêtaïne (puissant osmoprotecteur), sont réalisés. En outre, la croissance bactérienne d'une souche de *E. coli* (ZB400) est étudiée en présence de thalles d'algues entières découpés en fins morceaux (2,5 g, poids humide) immergés dans du M63 / NaCl 0,85 M et en présence d'extraits hydro-alcooliques d'algues (dilution finale 10<sup>-2</sup> dans du M63/ NaCl 0,85 M). Des témoins sans apport algal (M63 / NaCl 0,85 M) sont réalisés.

La mise en évidence de composés -oniums (ammoniums quaternaires et sulfoniums tertiaires auxquels appartiennent les molécules osmoprotectrices) dans des extraits hydro-alcooliques est réalisée par électrophorèse sous haute tension (40 V/cm). De telles substances sont-elles accumulées par *E. coli* soumise à une forte osmolarité du milieu (M63 / NaCl 0,85 M) ? La substance, principalement accumulée par *E. coli* à partir d'une algue donnée et déterminée par électrophorèse, est ensuite purifiée par chromatographie sur papier. L'identification de cette substance, étape finale, est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) puis par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN<sup>1</sup>H). Parallèlement, le dosage des composés -oniums, azote aminé et protéines, est effectué dans des extraits hydro-alcooliques.

La croissance des souches de *E. coli* soumises à un stress salin est largement améliorée en présence des deux types d'extraits d'algues, hydro-alcooliques et aqueux, dont les capacités osmoprotectrices sont très importantes et, dans certains cas, peuvent dépasser celles de la glycine bêtaïne. Les extraits favorisent la croissance bactérienne respectivement jusqu'à des teneurs en sel de 1,02 et 1,20 M. Dans les deux cas, *U. lactuca* et *P. palmata* sont les plus performantes : la croissance de plus de 30% des souches est encore constatée.

Le suivi de la croissance de *E. coli* ZB400 révèle que l'addition de thalles d'algues ou d'extraits hydro-alcooliques dans du M63 / NaCl 0,85 M accélère la multiplication bactérienne. En présence de thalles d'algues, les numérations bactériennes, en 48 heures, sont élevées : 5.108 UFC/ml (*U. lactuca* et *P. palmata*), 108 UFC/ml (*E. ramulosa*). La croissance est lente avec *F. serratus* ou inhibée avec *A. nodosum*. En présence d'extraits hydro-alcooliques, la croissance est considérable : elle atteint des valeurs optimales avec *U. lactuca* et *P. palmata* (1011 UFC/ml) (phénomène de diauxie), et des valeurs moyennes avec *E. ramulosa* et *F. serratus* (109 UFC/ml). Concernant *A. nodosum*, l'inhibition n'est plus véhiculée par l'extrait (5.108 UFC/ml).

L'électrophorèse sous haute tension révèle l'extrême richesse des extraits en composés Dragendorff-positifs. Elle montre d'autre part que *E. coli* accumule ces mêmes composés à partir de thalles d'algues ou d'extraits. Deux à quatre composés Dragendorff-positifs sont accumulés à chaque fois à partir d'une algue donnée. Celui qui s'est révélé principalement accumulé, a été purifié puis identifié par CCM et RMN<sup>1</sup>H : *E. coli* accumule de la glycine bêtaïne à partir de *P. palmata* et *E. ramulosa*, du diméthylsulfonopropionate (DMSP) à partir de *U. lactuca*, et de la  $\gamma$ -butyrobêtaïne à partir de *A. nodosum* et *F. serratus*. Les résultats des dosages ont montré que *A. nodosum* et *F. serratus* sont plutôt riches en azote aminé et protéines, *P. palmata* en composés -oniums, *U. lactuca* en composés -oniums et azote aminé. *E. ramulosa* est pauvre en ces différents composés.

Les macroalgues marines favorisent donc la croissance de *E. coli* soumis à de fortes osmolarités du milieu. Ceci peut être attribué aux substances osmoprotectrices et probablement à leurs effets synergiques ainsi qu'à la présence d'autres substances organiques utilisables par *E. coli* comme éléments nutritifs.

Les macroalgues marines constituent, *in vitro*, une source d'osmoprotecteurs pour *E. coli*, bactérie de contamination du milieu marin. Elles favoriseraient (débris, excréation...) ainsi la survie de *E. coli* et d'autres entérobactéries dans certains compartiments benthiques de ce milieu.

**RÉFÉRENCES**

BLUNDEN G., SMITH B.E., IRONS M.W., MING-HE YANG, ROCH O.G., et PATEL A.V., 1992. Betaines and their sulphonium compounds from 62 species of marine algae. *Biochemical Systematics and ecology*, 20 : 373-388.  
FLATAU G.N., CLEMENT R.L., GAUTHIER M.J., et PUEL D.C., 1992. Effect of incubation of *Escherichia coli* cells with halophyte extracts on their subsequent survival in seawater. *Canadian Journal of Microbiology*, 38 : 838-842.

