مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۳۹۲-۳۸۱)

کلونینگ اپرون گوگردزدایی مسیر ۴s در *سودوموناس*

شمیم نقدی*، جمشید راهب، باقر یخچالی، الهام آقائی‌مقدم
مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی زیستی
تهران ـ خیابان انقلاب، خیابان قدس، کوچه شهید عباس شفیعی، پلاک ۱۵
کد پستی ۶۳۶۴- ۱۴۱۵۵
(دریافت: ۸۱/۳/۱۵ ؛ پذیرش:۸۲/۴/۴)

چکیده

گوگرد موجود در نفت خام اثرات زیانباری در آلودگی هوا و محیط زیست دارد. بنابراین تلاش هـای بسـیاری در زمینه شناسایی باکتریهای گوگردزدا انجام شده است. در این تحقیق ژنهای گـوگردزدایی از بـاکتری *رودوکوکوس اریتروپولیس* (*Rhodococcus erythropolis* IGTS8) جداسازی و تحت کنترل پروموتر *tac* از طریق کانژوگاسیون در کروموزوم باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginos*a ATCC9027)کلـون شـد.یـک کپـی پلاسـمیدی نیـز از لوکـوس گوگردزدا در باکتری نوترکیب مذکور کلون شد. این کلـون هـا توسـط آزمایشـهای ژنتیکـی تاییـد شدند. باکتری نوترکیب حاصل از این تحقیق احتمالاً در پژوهشهای مربوط به گـوگردزدایی از مـواد نفتی قابل استفاده خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: *گوگردزدایی، سودوموناس، دی بنزوتیوفن، رودوکوکوس.*

مقدمه

آلاینده هایی که در مراحل مختلف پالایش و یا احتراق سوختهای فسیلی ایجاد می شوند، مشکلاتی را در زمینه مصرف این مواد ایجاد کرده‌اند. از مهمترین این مواد،اکسیدهای گوگردی هستند که در زمان احتراق مواد نفتی حاوی گوگرد بوجود می‌آیند (Oshiro *et al.,* 1996; McFarland,1999).

این مواد در زمینه محیط زیست و صنایع، مشکلاتی از جمله ایجاد بارانهای اسیدی، ایجاد خوردگی در ادوات و تجهیزات پالایش، خرابی زودرس موتورهای مولد انرژی و غیرفعال ساختن کاتالیست‌های فلزی مورد استفاده در فرآیندهای مختلف پالایش، ایجاد می‌کنند (Oshiro *et al.,* 1996; McFarland, 1999; Gray *et al.,* 1996; Wolf *et al.,* 1998; Gallardo *et al.,* 1997).

هیدرودسولفوریزاسیون (Hidrodesulfurization) از متداولترین روشهای بکار رفته برای حذف گوگرد می‌باشد. در این روش با کمک کاتالیست‌های فلزی درفشار و دمای بالا، گوگرد احیاء شده و بصورت H_2S از نفت جدا می‌شود(McFarland, 1999). اما صرف هزینه هنگفت برای تولید دما، فشار و تهیه منبع هیدروژن مورد نیاز این روش، همچنین عدم توانایی این روش جهت حذف کامل گوگرد از ترکیبات ناجور حلقه موجود در نفت، نیاز به روشهای مطلوبتر را ایجاب کرده است (Monticello, 1994; Gallardo *et al.,* 1997; Gray *et al.,* 1996).

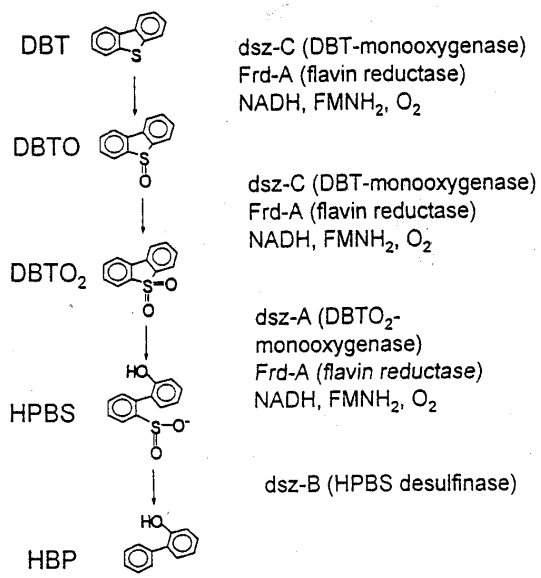
در پی مسائل فوق الذکر و سخت تر شدن قوانین زیست محیطی برای تولید فراورده‌های نفتی کم گوگرد،گوگردزدایی میکروبی(Microbial Desulfurization) مورد توجه دانشمندان قرار گرفت (Oshiro *et al.,* 1996; Monticello, 1994).

امتیاز فرآیندهای زیستی این است که:

- در دما و فشار محیط صورت می گیرند.
- هزینه عملیات‌های پالایش و سرمایه‌گذاری قابل توجهی کاهش می‌یابد.
- قابلیت انعطاف پذیری و بازده مناسب دارند.
- گوگردزدایی ترکیبات نفتی را به صورت کامل انجام می‌دهد (Monticello, 1994).

شاخص‌ترین گونه باکتریایی که مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی بسیاری روی آن شده، *رودوکوکوس اریتروپولیس*(*Rhodococcus erythropolis* IGTS8) می‌باشد. این باکتری به روش هوازی عمل می‌کند و از دی بنزوتیوفن (مولکول مدل)، به‌عنوان تنها منبع گوگرد استفاده می‌کند. درچند سال گذشته بررسیها و پژوهشهای به عمل آمده روی این باکتری، با افزایش توانمندی گوگردزدایی و کاهش مدت زمان این فرایند، همراه بوده است (Monticello *et al.,* 1985; McFarland, 1999).

فنوتیپ گوگردزدایی این باکتری توسط یک اپرون ۴kbp واقع دریک پلاسمید بزرگ (حدوداً ۱۵۰کیلوبازی)، ایجاد می‌شود (Denis-larose *et al.,* 1997, Oshiro *et al.,* 1994; Gray *et al.,*1996).
پروتئین‌های کد شده توسط سه ژن *dszA*، *dszB*، *dszC* با همکاری پروتئین چهارمی بنام *DszD* که توسط ژنی خارج از این اپرون کد می‌شود، دریک مسیر شناخته شده بنام "۴s"، دی بنزوتیوفن را به تدریج اکسیده کرده و گوگرد را به صورت یون سولفات جداسازی می‌کنند (شکل ۱).



شکل۱- مسیر 4s در باکتری Rhodococcus erythropolis IGTS8 (Mc Farland, 1999).

پروتئین‌های DszA، DszC مونواکسیژنازهایی هستند، که از فلاوین مونونوکلئوتیددی هیدروژن استفاده می‌کنند. این کوانزیم توسط DszD که یک NADH:FMN اکسیدوردوکتاز است تامین می‌شود.

درابتدای مسیر ۴s، Dsz C ، دی بنزوتیوفن مونواکسیژناز، ۲ مرحله ابتدایی که شامل تبدیل DBT به DBT- سولفوکساید وDBT- سولفون می‌باشد را کاتالیز می‌کند.

پروتئین Dsz A، دی بنزوتیوفن ۵ و۵ دی اکسیدمونواکسیژناز است و باعث تبدیل سولفون به سولفینات می‌شود. Dsz B به عنوان آخرین آنزیم فرایند مذکور فعالیت می‌کند. آنزیم مذکور یک هیدرولاز اسید سولفینیک حلقوی است . در حضور این آنزیم دراثر حمله نوکلئوفیلی یک مولکول آب به سوبسترا، گوگرد بصورت یون سولفات جدا می‌شود و

محصول نهایی بصورت دی هیدروکسی بی فنیل(HBP) تولید می‌شود (Wolf *et al.,* 1998; Piddington *et al.,* 1995; Denis-larose *et al.,* 1997; McFarland, 1999; Gray *et al.,* 1996; Denome *et al.,* 1994).

اسیدهای آمینه‌ای مثل متیونین و سیستئین همچنین یونهای سولفات و سولفید روی پروموتر طبیعی این اپرون تاثیر گذاشته و باعث توقف فرایند درسطح نسخه‌برداری می‌شود. همچنین افزایش غلظت دی‌هیدروکسی بی‌فنیل منجر به کاهش روند گوگردزدایی می‌شود (McFarland, 1999).

دراین پژوهش اپرون گوگردزدایی باکتری *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 تحت پروموتر هیبرید *tac* در باکتری *E.coli* JM110 و*E.coli* CC118λ*pir* کلون شد. و سپس بطور همزمان بصورت کروموزومی و پلاسمیدی در میزبان هترولوگ*Pseudomonas aeruginosa*ATCC9027 کلون شد. این کلونها از نظر ژنتیکی تأیید شدند.

مواد و روشها

محیط کشت ها و شرایط کشت

جهت کشت سویه‌های *سودوموناس و اشریشیاکلی* حاوی ژنهای*dsz* ازمحیط BSM به عنوان محیط حداقل استفاده شد. ترکیب BSM طبق عملکردDenome و همکاران(۱۹۹۴) عبارت‌است از:

KH_2PO_4 2.44gr; Na_2HPO_4 5.57gr; NH_4Cl 2gr; $MgCl_2.6H_2O$ 0.2gr; $CaCl_2.2H_2O$ 0.001gr; $FeCl_3.6H_2O$ 0.001gr; $MnCl_2.4H_2O$ 0.004gr) (pH=۷/۲، به ازاء یک لیتر)

برای کشت سویه‌های مختلف *سودوموناس و اشریشیاکلی* به ترتیب گلیسرول و سیترات به مقدار (۲ /۰ ٪) بعنوان منبع کربن و DBT (۱/.٪) به عنوان منبع گوگرد در این محیط استفاده شد.

در سایر موارد برای کشت باکتریها از محیط LB (Luria Bertani) مایع حاوی آنتی بیوتیک و یا پلیت‌های LB حاوی آگار ۲ درصد و آنتی‌بیوتیک استفاده شد (Manatis *et al.,* 1995).

سویه‌های *اشریشیاکلی* در دمای۳۷ درجه سانتیگراد و سویه‌های کانژوگه شده دردمای۳۰ درجه کشت داده شد.

مواد

- ✓ آنتی‌بیوتیک‌ها شامل کانامایسین (Km)،کلرامفنیکل(Cm)، تتراسیکلین(Tet) بود،که با غلظت نهایی، ۵۰µg/µlit برای دو مورد اول و ۲۰µg/µlit برای تتراسیکلین در موقع لزوم در محیطهای کشت استفاده شدند.

- ✓ دی بنزوتیوفن DBT به صورت محلول در دی متیل فرمامید با غلظت نهایی ۱٪ در محیط کشت استفاده شد. این ماده به همراه دی هیدروکسی بی فنیل (HBP) از شرکت Merck خریداری شد.
- ✓ ۲و۶ دی‌کلروکینون ۴-کلریمید(2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid) به میزان ۱/۱۰۰(V/V) استفاده شد. این ماده نیز از Merck خریداری شد. حلال این ماده اتانول می‌باشد.
- ✓ Protease K و RNase A که در آزمایشات به صورت محلول 2 µg/µl استفاده شد.
- ✓ کیت‌های به کار رفته شامل Detection Kit،Dig Labelling و Agarose gel DNA extraction بود، که از شرکت Merck خریداری شد.
- ✓ برای روش سادرن‌بلات (Southern blot) و دات‌بلات (Dot blot) از غشا نایلونی باردار استفاده شد که از شرکت Boehringer خریداری شد .
- ✓ آنزیم‌های برش‌دهنده اختصاصی(Restriction enzyme) شرکتBoehringer خریداری شد.

سویه‌های باکتریایی و پلاسمیدهای مورد استفاده دراین تحقیق درجداول ۱و۲ موجود می‌باشد.

جدول ۱ -سویه‌های باکتریایی

سویه‌ها و باکتریایی	ژنوتیپ و توضیحات	منبع
Pesudomonas aeruginosa EGSOX	دارای PG201:miniTn5km(*ptac::dsz*) قابلیت‌سولفورزدایی‌اختصاصی	دانشگاه‌مادریداسپانیا
Pesudomonas aeruginosa ATCC9027	تولید کننده بیوسورفاکتانت	مرکز کلکسیون‌سازمان پژوهشهای‌علمی‌وصنعتی
E.coli JM110	[F', TraD36, $ProA^+$, $ProB^+$ lacI, laczΔM15], Thi, suPE44, Δ(lac-ProAB), leu, Thr, lacy, galk, galT, ara, FhuA, dam, dcm میزبان‌دارای lacz و نقص Metilation ، مناسب برای انتخاب کلونی‌های آبی و سفید نوترکیب	مرکز مهندسی ژنتیک
***E.coli* HB101**	$ProA_2$, leuB6, Thi-locY1, hasds20(rB_MB+) recA13, rps120(str^r), ara-14, galk2, xyl-5, mtl-1, supE44, mcrB,mrr	مرکز مهندسی ژنتیک

جدول۲- پلاسمیدها

پلاسمید	ژنوتیپ و توضیحات	منبع
pUC18	Ap^r, High copy cloning Vector	مرکز مهندسی ژنتیک
pRK600	Cm^r, ori colE1/PK 2-Mob^+, PK2-Tra^+, $pESOX_1$ into pVLT31	دانشگاه مادرید اسپانیا
$pESOX_3$	TC^r,3.8kb, *dsz* operon subclone of $PESOX_1$ into PVLT31	دانشگاه مادرید اسپانیا
$pESOX_4$	Km^r, Ap^r, 5.8kb fragment subclone of $pESOX_3$ into PBSL118	دانشگاه مادرید اسپانیا

روش‌ها

تست گیبس کیفی

دراین تست تولید دی‌هیدروکسی بی‌فنیل که محصول نهایی گوگردزدایی است، ارزیابی می‌شود. این تست برمبنای تولید رنگ ناشی از واکنش معرف گیبس (۲و۶ دی‌کلروکینون- ۴ - کلریمید) با دی‌هیدروکسی‌بی‌فنیل در PH هشت میباشد. تولید رنگ در۶۱۰nm بعد از ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قابل اندازه‌گیری است (Oldfield *et al.,* 1997).

دست ورزی DNA

روشهایی شامل استخراج DNA کروموزومی و پلاسمیدی، برش و اتصال DNA و انتقال آن به غشای نایلونی جهت هیبریدیزاسیون توسط روشهای استاندارد انجام شد (Manatis *et al.,* 1995) .

هیبریدیزاسیون

اپرون گوگردزدایی باکتری *رودوکوکوس اریتروپولیس*IGTS8 به عنوان پروب استفاده شد. این قطعه در ابتدا با استفاده از کیت Dig labeling به صورت تصادفی نشاندار شد. مراحل هیبریدیزاسیون بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت detection صورت پذیرفت.

لقاح سه والدی (Triparental Mating)

تک کلونیهای مربوط به هر یک از سه باکتری دهنده،گیرنده و کمک کننده به مدت یک شب در محیط LB بدون آنتی بیوتیک کشت داده شدند، از محیط کشت هر باکتری به نسبت ۱:۱:۱ با یکدیگر مخلوط نموده و از فیلتر عبور داده شدند. فیلتر مذکور به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت روی محیط کشت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از جداسازی باکتری‌ها از روی فیلتر برحسب ویژگیهای باکتری مورد نظر، نسبت به جداسازی سویه نوترکیب اقدام شد (De Lorenzo, 1994).

تهیه سلولهای مستعد (Competent) و ترانسفورمیشن

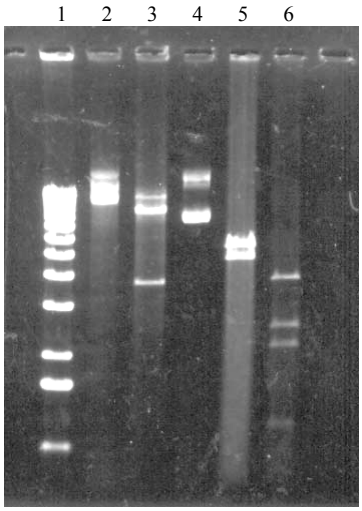
تهیه سلول مستعد طبق روش استاندارد انجام شده با تیمار باکتریهای مورد نظر با کلریدکلسیم دیواره باکتری آماده پذیرش قطعه DNA خارجی شد. ترانسفورمیشن نیز طبق روش استاندارد با استفاده از شوک حرارتی صورت پذیرفت (Manatis *et al.,* 1995).

نتایج

ساخت کلونهای $pESOX_3$ و $pESOX_4$

اپرون گوگردزدایی باکتری *رودوکوکوس اریتروپولیس* قبلاً تحت پروموتر *lac* در پلاسمید pUC18 کلون شده بود (Gallardo *et al.,* 1997). در این پژوهش اپرون مذکور به وسیله آنزیمهای *Eco*RI،*Hin*dIII جدا، و در پلاسمید pVLT31 و تحت پروموتر *tac* کلون شد.این پلاسمید میزبانهای متعددی دارد ودر محدوده وسیعی از باکتریها قابلیت انتقال دارد (De Lorenzo, 1993).

پلاسمید حاصل با وزن مولکولی ۱۳/۸ کیلوباز تحت عنوان pESOX3 نامیده شد. پلاسمید مذکور به وسیله آنزیم *Eco*RV برش داده شد و اپرون SOX در پلاسمید pBSL118 کلون و به باکتری *E.coli*CC118λpir ترانسفورم شد. این سازه ژنتیکی که pESOX4 نامیده شد از وکتورهای خودکش می‌باشد و به دلیل داشتن ترانسپوزون می‌تواند باعث انتقال قطعه مورد نظر به درون کروموزوم باکتری شود. صحت کلونینگ توسط روشهای متداول نظیر برش با آنزیمهای برش دهنده اختصاصی تأیید شد. شکل۲ نتیجه استخراج دو پلاسمید فوق الذکر به همراه هضم آنزیمی آنها را نشان میدهد. در این شکل باند مربوط به اپرون گوگردزدایی در ناحیه ۳/۸ کیلوبازی دیده می‌شود.



شکل۲- نتایج استخراج پلاسمیدی و هضم آنزیمی پلاسمیدهای $pESOX_3$,$pESOX_4$.

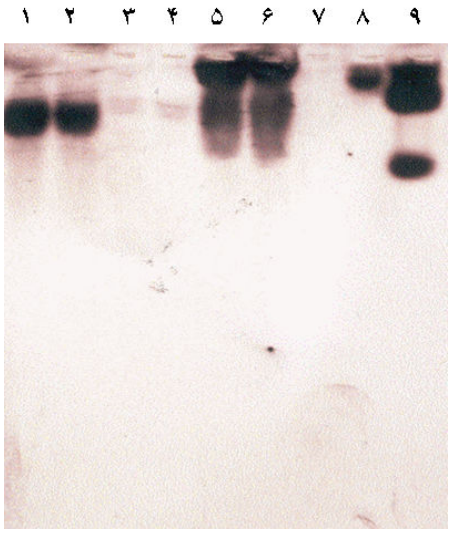
۱) وزن مولکولی X از شرکت Roche . ۲) پلاسمید برش داده نشده $pESOX_3$.

۲) پلاسمید برش داده شده $pESOX_3$(EcoRI-HindIII).۴) پلاسمید برش داده نشده $pESOX_4$.

۳) پلاسمید برش داده شده $pESOX_4$ (EcoRV) .۶) پلاسمید برش داده شده $pESOX_4$(EcoRI-HindIII).

ساخت باکتری نوترکیب PTSOX4

برای وارد کردن اپرون گوگردزدایی به صورت پایدار و کروموزومی در میزبان *سودوموناس* لقاح سه والدی انجام داده شد که در طی آن *E.coli*CC118λpir(pESOX4) به عنوان دهنده، *E.coli*HB101(RK600) به عنوان کمک کننده و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 به عنوان پذیرنده به کار رفتند. مخلوط سه باکتریی که از روی فیلتر جداسازی شدند به وسیله محیط BSM شستشو داده شده و در محیط حاوی سیترات و دی بنزوتیوفن در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ روز اینکوبه شد.پس از طی این مدت تست گیبس مثبت شد، که نشانه پیدایش باکتریهای نوترکیب بود. به علت حضور سیترات به عنوان تنها منبع کربن باکتریهای *اشیریشیاکلی* قادر به رشد نبودند، تنها باکتریهایی که تحت این شرایط قادر به رشد بودند، *سودوموناسهای* نوترکیب شده بودند. محیط کشت باکتریایی سانتریفوژ شد و محتوای آن به محیط کشتهای جامد LB-کانامایسین انتقال داده شد.کلونهای رشد یافته، *سودموناسهای* نوترکیب بودند که تحت نام PTSOX4 نامگذاری شد. برای تأیید نهایی ورود اپرون گوگردزدایی به درون کروموزوم باکتری *سودوموناس* تست سادرن بلات انجام شد (شکل۳).



شکل ۳- نمونه مربوط به سادرن بلاتPTSOX4

۱ و۲:DNA کروموزومی باکتری*Pseudomonas aeruginosa* EGSOX (کنترل مثبت).

۳ و۴:DNA کروموزومی باکتری*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 (کنترل منفی).

۵ و۶: DNA کرموزومی باکتری*P.aeruginosa* PTSOX4 .

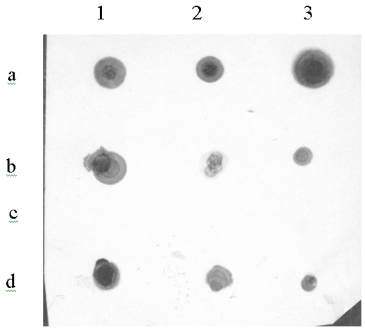
۸: DNAپلاسمید $pESOX_3$(تخلیص شده از باکتری E.coli JM110).

۹: DNAپلاسمید $pESOX_4$(تخلیص شده از باکتری *E.coli* CC118λpir).

در این بلات، DNA کروموزومی باکتری *P.aeruginosa* ATCC9027 به عنوان کنترل منفی و DNA کروموزومی باکتری *P.aeruginosa* EGSOX که حاوی یک نسخه اپرون گوگردزدایی به صورت کروموزومی است (Gallardo *et al.*, 1997) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بلات‌های مشاهده شده در ردیف ۵ و۶ نشانگر حضور اپرون گوگردزدایی در باکتری نوترکیب هستند.

ساخت باکتری نوترکیب *PTSOX34*

برای افزایش قابلیت گوگردزدایی باکتری نوترکیب تولید شده در مرحله قبل، سعی شد تا تعداد کپی‌های اپرون گوگردزدایی در این سویه افزایش داده شود، به این منظور لقاح سه والدی دومی صورت پذیرفت که در طی آن باکتری *E.coli* JM110(pESOX3) که قبلا به وسیله تست گیبس تأیید شده بود به عنوان دهنده، باکتری*E.coli*HB101(RK600) به عنوان کمک کننده وPTSOX4 به عنوان پذیرنده به کار رفتند.پس از انجام لقاح سه والدی، باکتریها از سطح فیلتر شستشو داده شدند و در محیط LB جامد کانامایسین- تتراسیکلین کشت داده شدند. کانامایسین باعث حذف باکتری *اشریشیاکلی* می‌شد، اما به دلیل مقاومت باکتری PTSOX4 نسبت به تتراسیکلین، *سودوموناسهای* نوترکیب حاوی پلاسمید pESOX3 و فاقد آن، هر دو قابلیت رشد روی محیط مذکور را داشتند. برای جداسازی این دو نوع باکتری از یکدیگر از تعدادی از کلونیها، استخراج پلاسمید صورت گرفت. آزمایش دات بلات حضور پلاسمید pESOX3 را در تعدادی باکتری نوترکیب مشخص نمود (شکل۴). در این بلات از پلاسمید pESOX3 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.



شکل۴- نتیجه دات بلات استخراج پلاسمید از باکتری $PTSOX_{34}$ و باکتری ترانسفورم شده*E.coli* JM110.

(2d,1a DNA پلاسمیدpESOX4 به عنوان کنترل مثبت.

(2a,2b,1b DNA پلاسمید استخراج شده از باکتریPTSOX34.

(3d,3a,1d DNA پلاسمید $pESOX_3$استخراج شده از باکتری *E.coli* JM110.

3c: DNA پلاسمیدpBSL118 به عنوان کنترل منفی.

۳۹۰ ـــــــ

درصورت بهینه‌سازی شرایط مختلف، به نحوی که فرایند گوگردزدایی میکروبی از نظر اقتصادی به صرفه باشد، با استفاده از مراحل ذیل بکارگیری باکتری نوترکیب در روند پالایش متصور است:

۱) کشت باکتری در مقیاس بالا.

۲) مخلوط نمودن محیط کشت باکتری و اکسیژن با نفت خام درمخازن بزرگ.

۳) استفاده از هیدروسیکلونها (جداکننده‌های گردابی ذرات) برای جداسازی بخش سولفات-میکروارگانیسم و نفت گوگردزدایی شده از یکدیگر.

۴) جداسازی گوگرد (به صورت سولفیت)، از میکروارگانیسمها و بازچرخ میکروارگانیسمها به منظور استفاده مجدد (Monticello, 2000).

سپاسگزاری

از آقای علی اصغر کارخانه‌ای که در انجام آزمایشات بیوشیمی پژوهش فوق همیاری نموده‌اند، تشکر می‌شود.

References

De Lorenzo,V., Eltis, L. (1993) *Analysis of Pseudomonas gene products using LacIq/Ptrp-Lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes*, Gene, **123**, 17-24.

De Lorenzo,V., Timmis, K.N. (1994)*Analysis and construction of stable phenotype in gram negative bacteria with Tn5- and Tn10- derived minitransposon*, Methods In Enzym. **233,** 386-405.

Denis Larose, C., Labbe, D., Bergeron, H., Jones, A.L., Greer, C.W.(1997) *Conservation of plasmid encoded dibenzothiophen desulfurization genes in Rhodococci.* Applied and Environmental Microbiology, **63**, 2915-2919.

Denome, S.A., Oldfield, C., Nash, L.J. and Young, K.D. (1994) *Characterization of the desulfurization genes from Rhodococcus sp.strain IGTS8.* J. Bacterial, **176**(21*)*, 6707-6716.

Gallardo, M.E., Ferrandez, A., Delarenzo, V., Garcia, J.L., and Diaz, E. (1997) *Designing recombinant Pseudomonas strains to enhance biodesulfurization.* J. of Bacteriology, **179**, 7156-7160.

Gray,K.A., Pogrebinsky, O.S., Marchko, G.T., Xi, L., Monticello, D.J., Squires, C. (1996) *Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels*. Nature Biotechnology, **14**, 1705-1709.

Hansen, L.H., Sørensen, J.S., and Jensen L.B. (1997) *Chromosomal insertion of the entire Escherichia coli lactose operon, into two strains of Pseudomonas using a modified mini-Tn 5 delivery system*, Gene. **187**,167-173.

Manatis, T., Fritsch, E., and Sambrooks, F. (1995) *Molecular cloning:a laboratory. Manual,* Cold spring Harbor laboratory, Cold spring Harbor, N.Y.

۳۹۲ ـــــــ