

¹MARIA J. KRÓL, ²JERZY WIELBO, ³JULITA ZIELEWICZ-DUKOWSKA

¹Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
²Zakład Mikrobiologii Ogólnej, ³Zakład Mikrobiologii Środowiskowej
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

GENETYCZNE DETERMINANTY ENZYMÓW ZAANGAŻOWANYCH W WYKORZYSTANIE WWA JAKO SUBSTRATU PIERWOTNEGO PODCZAS WIĄZANIA N₂ PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *PSEUDOMONAS*

Genetic determinants of enzymes contributing to utilization of PAHs as substrates in atmospheric nitrogen fixation in *Pseudomonas* spp. strains

ABSTRAKT: Przebadano 12 szczepów *Pseudomonas stutzeri* oraz 6 szczepów *Pseudomonas* spp. pod kątem obecności genów kodujących dioksygenazę 2,3-katecholową (C 2,3-DO), dioksygenazę naftalenową (NDO) oraz nitrogenazę. Hybrydyzacja do kolonii, amplifikacja PCR oraz weryfikacja amplifikacji metodą dot-blot i hybrydyzacji wykazała, że większość badanych szczepów *Pseudomonas stutzeri* posiadała gen dla C 2,3-DO, a w większości izolatów *Pseudomonas* spp. zidentyfikowano gen dla NDO. We wszystkich badanych szczepach potwierdzono obecność genu dla nitrogenazy. Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, że badane szczepy są zdolne do prowadzenia redukcji azotu cząsteczkowego używając WWA jako substratu pierwotnego.

słowa kluczowe: key words:

Pseudomonas – *Pseudomonas*, węglowodory aromatyczne – aromatic hydrocarbons, dioksygenazy – dioxygenases, nitrogenaza – nitrogenase

WSTĘP

Związki ropopochodne są zbudowane głównie z węgla, wodoru i niewielkiej ilości azotu. W skażonej nimi glebie wzrasta stosunek C:N, a nadmiar węgla nie jest w pełni wykorzystany przez mikroorganizmy, ponieważ brak jest dostatecznej ilości azotu i fosforu. W procesach bioremediacji wraz ze szczepionkami mikroorganizmów stosuje się uzupełnianie związków azotowych w skażonym środowisku, aby efektywnie przekształcać związki ropopochodne w masę bakteryjną.

Największe tempo bioremediacji zanieczyszczeń organicznych obserwuje się w strefie korzeniowej roślin. Jest ono wynikiem aktywności metabolicznej mikro-

ory licznie zasiedlającej ryzosferę oraz działalności mikroorganizmów żyjących na powierzchni i wewnątrz tkanek korzenia, do których można zaliczyć m.in. endofityczny *Pseudomonas stutzeri* (2, 6). Gatunek ten posiada szereg cech przemawiających za stosowaniem go w bioremediacji, takich jak zdolność do wiązania azotu cząsteczkowego i zdolność do wykorzystywania bardzo różnorodnych związków węgla jako źródeł energii (12, 16, 22, 29).

Zdolność mikroorganizmów do wykorzystywania węglowodorów jako źródła węgla uzależniona jest od posiadania przez nie enzymów uczestniczących w przemianach węglowodorów do acetylo-CoA. Głównymi enzymami zaangażowanymi w te procesy są dioksygenaza 2,3-katecholowa (C2,3-DO) i naftalenowa (NDO) katalizujące pierwsze etapy oksydacji węglowodorów aromatycznych. Geny kodujące C2,3-DO i NDO, jak również inne enzymy zaangażowane w degradację węglowodorów aromatycznych takich jak toluen, fenantren czy antracen, są często zlokalizowane na plazmidach, np. NAH7 *P. putida* PpG7 (28), NCIB 9816 *P. putida* PaW736 (5, 27) czy pKA1 *P. fluorescens* 5R (20).

Nasze wcześniejsze prace donosiły o wyizolowaniu szczepów *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas* spp. oraz ich zdolności do wiązania azotu cząsteczkowego przy wykorzystaniu różnych węglowodorów aromatycznych jako substratu (13-16, 18, 30). Celem niniejszej pracy była identyfikacja genów odpowiedzialnych za przebieg tych procesów, kodujących: nitrogenazę, dioksygenazę katecholową i oksygenazę naftalenową.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano 18 szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, w tym 12 szczepów bakterii *Pseudomonas stutzeri*, wyizolowanych z endoryzosfery wydmu-chrzczy piaskowej i z endoryzosfery jęczmienia jarego (7-11, 17) oraz 6 szczepów *Pseudomonas* spp., wyizolowanych z gleby skażonej olejem napędowym (18, 30).

Badano następujące szczepy:

- *Pseudomonas stutzeri*: 52, 53, 54, 57, 40T1, 40T2, 40T4, 40T5, 101, 102, 103, 105.
- *Pseudomonas* spp.: 21KC5, 26KC5, 38KC5, 73KC5, 80KC5, 26K6.

W materiale genetycznym izolatów poszukiwano genów kodujących:

- dioksygenazę 2,3-katecholową wg metody M e s a r c h i in. 2000 (21),
- dioksygenazę naftalenową wg metody H a m a n n i in. 1999 (3),
- nitrogenazę (gen *nifD*) wg metody S t o l t z f u s i in. 1997 (26).

Gen kodujący C2,3-DO identyfikowano poprzez hybrydyzację do kolonii (DIG Nucleic Acid Detection Kit, ROCHE). Sondę do hybrydyzacji amplifikowano z plazmidu pWW0 (M64747) *Pseudomonas putida*, z zastosowaniem primerów 5«-atttcctgcgcatgct-3« oraz «5-gaaggacctgatggggccggcgctga-3« opracowanych dla konserwatywnego fragmentu genu *nahH* (AF039534) *Pseudomonas stutzeri* (19, 21).

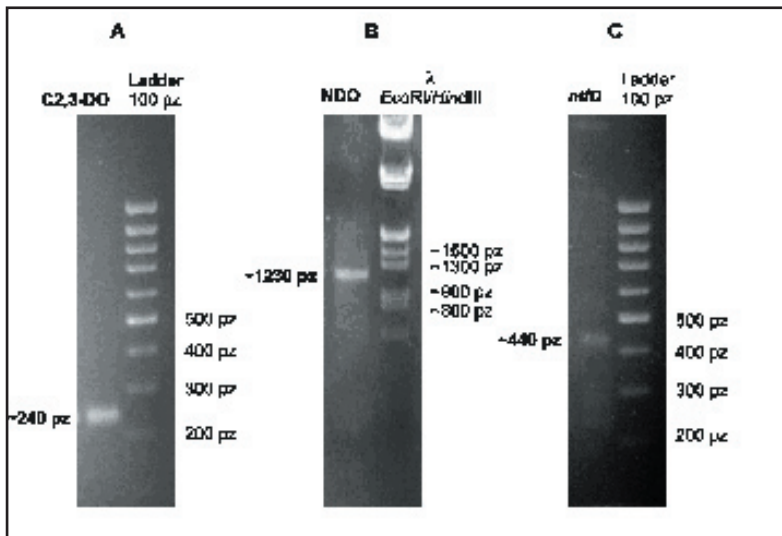
W wybranych szczepach (52, 53, 57, 40T1, 40T2, 40T5, 101, 102, 103 i 105) dodatkowo z całkowitego DNA amplifikowano fragment genu dla C2,3-DO z zastosowaniem primerów 5'«-atttcctgcgcgatgct-3'« oraz «5-gaaggacctgatggggccggcggtga-3'«, a specyficzność amplifikacji potwierdzano poprzez hybrydyzację typu dot-blot produktu PCR z opisaną wyżej sondą.

Gen dla NDO identyfikowano poprzez amplifikację z primerami dla genu nahAc *Pseudomonas putida* pDTG1 (NCIB 9816-4); (1, 3, 22, 25). Wielkość produktu PCR weryfikowano poprzez porównanie z produktem amplifikacji genu NDO z *Pseudomonas putida* pWW0 użytego jako szczep referencyjny (4).

Gen *nifD* identyfikowano poprzez reakcję PCR z zastosowaniem uniwersalnych starterów dla bakterii wiążących N₂ (26).

WYNIKI

Hybrydyzacja kolonii badanych izolatów z sondą dla genu C2,3-DO wykazała, że sonda intensywnie hybrydyzowała do izolatów *Pseudomonas stutzeri* 52, 53, 57, 40T1, 40T2, 40T5, 101, 102, 103 i 105 oraz izolatów *Pseudomonas* spp. 26KC5, 38KC5 i 73KC5. Izolaty 54 i 40T4 *Pseudomonas stutzeri* odznaczały się słabym sygnałem.



Rys. 1. Amplifikacja PCR fragmentów genów dla C2,3-DO (A), NDO (B) oraz *nifD* (C) z genomowego DNA badanych szczepów z rodzaju *Pseudomonas* (objaśnienia w tekście)
 PCR amplification of gene fragments of C2,3-DO (A), NDO (B) and *nifD* (C) from investigated DNA of strains *Pseudomonas* (legend in text)

Ze szczepów 52, 53, 57, 40T1, 40T2, 40T5, 101, 102, 103 i 105 wyizolowano DNA i użyto go jako matrycy do amplifikacji w reakcji PCR z primerami dla C2,3-DO (fot. 1A). Dla szczepów 52, 53, 57, 101, 102, 103 i 105 uzyskano produkt o zgodnej z oczekiwaniami wielkości 238 pz. (21). Specyficzność produktu weryfikowano za pomocą hybrydyzacji dot-blot z sondą dla genu C 2,3-DO i potwierdzono ją dla szczepów 52, 53, 54, 101, 102, 103 oraz 105.

Gen dla NDO identyfikowano w izolatach 57, 40T5, 102, 21KC5, 38KC5, 80KC5 oraz 23K6 za pomocą reakcji PCR na matrycy całkowitego DNA tych szczepów. W szczepach 21KC5, 38KC5, 80KC5 oraz 23K6 uzyskano produkt amplifikacji o wielkości 1225 pz, identyczny z produktem otrzymanym na matrycy DNA szczepu referencyjnego *Pseudomonas putida* pDTG1 (fot. 1B). Nie otrzymano specyficznego produktu PCR dla izolatów 57, 40T5 oraz 102.

Gen *nifD* identyfikowano w szczepach 52, 53, 57, 40T1, 40T2, 40T5, 101, 102, 103 i 105. We wszystkich przypadkach uzyskano produkty amplifikacji o wielkości około 440 pz (fot. 1C), jednak często występowała amplifikacja niespecyficzna (uzyskiwano także ze znacznie mniejszą wydajnością produkty o innej wielkości). Fragment najwydajniej powielany był większy od przewidywanego o około 50 pz.

DYSKUSJA

We wcześniejszych pracach publikowaliśmy wyniki badań nad aktywnością nitrogenazy podczas wzrostu szczepów *Pseudomonas stutzeri* na bezazotowych pożywkach mineralnych, z węglowodorami jako jedynymi źródłami węgla i energii (18, 13-16, 30). Szczepy bakterii aktywne w wiązaniu N_2 podczas wzrostu na podłożu bezazotowym zawierającym antracen lub fenantren jako jedyne źródło węgla i energii poddano badaniu na obecność genów kodujących enzymy szlaku rozkładu węglowodorów aromatycznych. Dodatkowo zbadano jeszcze szczepy *Pseudomonas* spp., charakteryzujące się zdolnością do wytwarzania biosurfaktantów (18).

W zależności od zastosowanej metody uzyskano różne wyniki identyfikacji genu dla C2,3-DO. Stwierdzono, że sonda dla C2,3-DO hybrydyzowała do kolonii wszystkich badanych tą metodą szczepów *Pseudomonas*, natomiast amplifikację genu dla C2,3-DO uzyskano dla mniejszej liczby izolatów. Nie stwierdzono amplifikacji dla szczepów *P. stutzeri* 40T1, 40T2 i 40T5, mimo że wcześniejsze prace wykazały, że są one zdolne do wzrostu i wiązania N_2 na antracenie i fenantrenie (13, 14). Możliwe, że w genomie tych izolatów istnieje inna forma dioksygenazy katecholowej lub pokrewny enzym zaangażowany w rozkład WWA. Jeśli kodujący go gen wykazuje pewien stopień homologii, można go zidentyfikować na drodze hybrydyzacji, która jest metodą mniej specyficzną niż amplifikacja PCR. W takim przypadku amplifikacja jest niemożliwa z uwagi na zastosowanie specyficznych primerów, nie pasujących do matrycy, jaką jest gen homologiczny, lecz nie identyczny. Hipotezę taką może potwierdzać fakt, że wspomniane szczepy 40T1, 40T2 i 40T5 wykazywały słabsze zdolno-

ści do wykorzystania fenantrenu niż szczepy 103, 105, 54 (13), co również wskazywałoby na istnienie różnic dotyczących posiadanego przez te szczepy aparatu enzymatycznego zaangażowanego w rozkład WWA.

Również w przypadku NDO nie otrzymano produktu PCR we wszystkich badanych szczepach, jednak można było zaobserwować pewną prawidłowość: specyficzny produkt amplifikacji uzyskano dla wszystkich badanych szczepów *Pseudomonas* sp., nie otrzymano go natomiast dla żadnego z trzech badanych szczepów *P. stutzeri*. Jednak podobnie jak w przypadku C2,3-DO brak produktu PCR nie może jednoznacznie przesądzać o nieobecności genu dla NDO w materiale genetycznym badanych szczepów, szczególnie w przypadku gdy (a) badania fizjologiczne potwierdzają zdolność do wykorzystania określonych WWA przez szczep (13-15), (b) potwierdzają to badania innych autorów (3, 23, 24).

Gen *nifD* kodujący jedną z podjednostek nitrogenazy zidentyfikowano metodą amplifikacji PCR w materiale genetycznym wszystkich badanych szczepów. Pozostaje to w zgodzie z naszymi wcześniejszymi doniesieniami o aktywności tego enzymu we wspomnianych szczepach rosnących na pożywkach bezazotowych z WWA jako jedynymi źródłami węgla (13-15, 18, 30). Wprawdzie uzyskany produkt amplifikacji był większy od przewidywanego o około 50 pz, jednak istnieją prace potwierdzające ten wynik (26), który tłumaczony jest możliwością posiadania przez szczep innej niż typowa formy genu *nifD*.

Zestawienie wyników badań fizjologicznych (12-16, 18, 30) oraz przedstawionych w niniejszej pracy badań genetycznych upoważnia do stwierdzenia, że testowane szczepy *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas* spp. posiadają informację genetyczną niezbędną do wykorzystania WWA jako źródła energii w procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego. Informacja ta ulega ekspresji dając w rezultacie fenotyp korzystny z praktycznego punktu widzenia, ponieważ można planować użycie takich szczepów do szczepienia nasion traw wykorzystywanych w procesie fitoremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi. Najbardziej obiecujący pod tym względem wydaje się być izolat 38KC5 *Pseudomonas* spp. posiadający w genomie zarówno gen dla NDO, jak i jakąś formę genu dla C2,3-DO.

WNIOSKI

1. Wyniki oznaczeń genetycznych determinantów enzymów zaangażowanych w rozkładzie węglowodorów aromatycznych potwierdzają fizjologiczne zdolności szczepów *Pseudomonas stutzeri* do wiązania azotu cząsteczkowego przy wykorzystaniu WWA jako jedynego źródła węgla. Najwartościowsze szczepy *Pseudomonas stutzeri* to: 52, 53, 57, 101, 102, 103 i 105, ponieważ stwierdzono w nich obecność genu dla C2,3-DO, jest również możliwe, że zawierają także gen *nifD*. Spośród badanych szczepów *Pseudomonas* spp. najwartościowszym wydaje się być 38KC5, ponieważ ma geny dla C2,3-DO i NDO.

2. Biorąc pod uwagę, że podłoże genetyczne wymienionych szczepów jest w badanych punktach jednakowe (we wszystkich zidentyfikowano geny *nifD*, *C2,3-DO* i *NDO*), można założyć, że na zdolność do wykorzystania różnych substratów węglowodorowych wpływają również inne determinanty genetyczne, w prezentowanych badaniach nie testowane.

3. Zdolność szczepów *Pseudomonas stutzeri*, zasiedlających strefę korzeniową i wewnątrz korzeni traw, do wiązania azotu cząsteczkowego i wykorzystania węglowodorów aromatycznych jako jedyne źródła węgla i energii sugeruje, że w przyszłości można będzie skomponować preparat do szczepienia nasion tych roślin stosowany w fitoremediacji gleb skażonych substancjami ropopochodnymi bez uzupełniania środowiska azotem.

LITERATURA

1. Dennis J. J., Zylstra G. J.: Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4, *J. Mol. Biol.*, 2004, 341(3): 753-768.
2. Desnoues N., Lin M., Elmerich C.: Organisation of *nif* genes in *Pseudomonas stutzeri* A15, a rice endophyte. (Dane nie opublikowane zaczerpnięte z bazy NCBI).
3. Hamann C., Hegemann J., Hildebrandt A.: Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 173(1): 255-263.
4. Harayama S., Rekik M., Bairoch A., Neidle E. L., Ornston L. N.: Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid *xylXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(23): 7540-7548.
5. Harayama S., Rekik M., Wubbolts M., Rose K., Leppik R. A., Timmis K. N.: Characterization of five genes in upper pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J. Bacteriol.*, 1989, 171: 5048-5058.
6. Krotzky A., Werner D.: Nitrogen fixation in *P. stutzeri*. *Arch. Microbiol.*, 1987, 147: 48-52.
7. Król M.: Drobnoustroje ryzosfery jęczmienia jarego. Rozprawa habilitacyjna, IUNG Puławy, 1997, H(13).
8. Król M. J.: Niektóre aspekty biodegradacji jednopierścieniowych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). *Post. Nauk Rol.*, 2005, 1: 1-19.
9. Król M., Kobus J.: Występowanie bakterii diazotroficznnych w niektórych glebach. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum: Organizmy glebowe jako wskaźnik procesów ekologicznych. Trzcianki/Wrocław, 14-16 wrzesień 1995, 2.
10. Król M. J., Kobus J.: Free-living halophilic bacteria fixing-N₂. 2nd European Nitrogen Fixation Conference, NATO Advanced Research Workshop, Poznań, September 8-13, 1996, 168.
11. Król M. J., Kobus J.: Bakterie halofilne wiążące azot wyizolowane z endoryzosfery roślin jednoliściennych. W: Drobnoustroje w środowisku. Red.: W. Barabasz, AR Kraków, 1997, 291-307.
12. Król M. J., Kobus J., Eckert B.: Characterization biochemical of free-living N₂-fixing bacteria isolated from the endorhizosphere of barley - *Hordeum sativum* and *Elymus arenarius*. 3rd European Nitrogen Fixation Conference. De Blije Werelt Lunteren, The Netherlands, September 20-24, 1998, 183.

13. Król M. J., Perzyński A.: *Pseudomonas stutzeri* – bakterie wiążące azot z wykorzystaniem naftalenu i fenantrenu jako jedyne źródła węgla i energii. *Pam. Puł.*, 2002, 131: 81-91.
14. Król M. J., Perzyński A.: Wykorzystanie antracenu w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie diazotroficzne. *Acta Agr. Silv.*, 2004, XLII: 229-237.
15. Król M. J., Perzyński A.: Wykorzystanie benzenu jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* i *Pseudomonas stutzeri*. *Pam. Puł.*, 2005, 140: 103-116.
16. Król M. J., Perzyński A., Eckert B.: *Pseudomonas stutzeri*- szczepy wyizolowane z endoryzosfery jęczmienia i wydmuchrzy cy piaskowej. *Zesz. Nauk. AR Szczecin, Agricultura*, 2002, 226(90): 83-90.
17. Król M. J., Perzyński A., Kobus J.: N_2 -fixing bacteria isolated from the roots of crops and grasses. *Acta Agroph.*, 2001, 52: 151-161.
18. Kurek E., Król M. J., Zielewicz-Dukowska J., Perzyński A.: Rozkład produktów naftowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny. Konferencja naukowo-techniczna: Ekologia w przemyśle rafineryjnym, Kielce 10-12.10. 2001, 2001, 153-162.
19. Marchesi J. R., Sato T., Weightman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hiom S. J., Wade W. G.: Design and evaluation of bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(2): 795-799.
20. Menn F. M., Applegate B. M., Slayter G. S.: NAH plasmid-mediated catabolism anthracene and phenanthrene to naphtholic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 1938-1942.
21. Mesarch M. B., Nakatsu C. H., Nies L.: Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 678-683.
22. Park W., Padmanabhan P., Padmanabhan S., Zylstra G. J., Madsen E. L.: nahR, encoding a LysR-type transcriptional regulator, is highly conserved among naphthalene-degrading bacteria isolated from a coal tar waste-contaminated site and in extracted community DNA. *Microbiol.*, 2002, 148(8): 2319-2329.
23. Rius N., Fuste M. C., Guasp C., Lalucat J., Loren J. G.: Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 736-744.
24. Sanseverino J., Applegate B. M., King J. M. H., Saylor G. S.: Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 1931-1937.
25. Simon M. J., Osslund T. D., Saunders R., Ensley B. D., Suggs S., Harcourt A., Suen W. C., Cruden D. L., Gibson D. T., Zylstra G. J.: Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 1993, 127(1): 31-37.
26. Stoltzfus J. R., So R., Malarvizhi P. P., Ladha J. K., De Bruijn F. J.: Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil*, 1997, 194: 25-36.
27. Yang Y., Chen R. F., Shiaris M. P.: Metabolism of naphthalene, urene, and phenanthrene: preliminary characterisation of cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 2158-2164.
28. You I. S., Ghosal D., Gunsalus I. C.: Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (nahG) and its 3'-anking region. *Biochem.*, 1991, 30(6): 1635-1641.
29. You C. B., Song W., Wang H. X., Li J. P., Lin M., Hai W. L.: Association of Alkaligenes with wetland rice. *Dev. Plant Soil Sci.*, 1991, 48: 195-203.
30. Zielewicz-Dukowska J., Kurek E., Król M. J., Perzyński A.: *Pseudomonas stutzeri* – bakterie wiążące azot z wykorzystaniem antracenu, jako jedyne źródła węgla. Biopreparaty w ochronie i użytkowaniu środowiska. *Inż. Ekol.*, 2001, 4: 76-82.

GENETIC DETERMINANTS OF ENZYMES CONTRIBUTING IN UTILIZATION OF PAHs
AS SUBSTRATES IN ATMOSPHERIC NITROGEN FIXATION IN PSEUDOMONAS SPP.
STRAINS

Summary

12 *Pseudomonas stutzeri* strains and 6 *Pseudomonas* spp. strains were tested for the presence of catechol-2,3-dioxygenase (C2,3-DO), naphthalen oxygenase (NDO) and nitrogenase (nifD) genes. Colony hybridization, PCR amplification and dot-blot hybridization revealed that most of tested strains contained C2,3-DO gene. Using PCR technique NDO gene was identified in genomes of most of strains and nifD gene in all tested genomes. These results confirmed our previous findings that our *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas* spp. strains were good candidates for bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), because they were able to utilize different PAHs as sole carbon source in atmospheric dinitrogen fixation.

Serdecznie dziękujemy Pani prof. dr hab. Ewie Kurek za udostępnienie do badań następujących szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*: 21KC5, 26KC5, 38KC5, 73KC5, 80KC5, 26K6.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 VII 2005 r.