

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук (ИБФМ
РАН)



Плазмиды бактерий рода *Pseudomonas*

А.М. Боронин

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

The History of Bacterial Genetics (S.E. Luria, 1968)

- The Stone Age or the Luria-Delbrück Age (1943-1946)
- The Bronze or Lederberg Age (1946-1953)
- The Golden or Hayes-Wollman-Jacob Age (1953-1961)
- The Desperate Age, which is the present one, in which lots of things happen, lots of biochemists and ultracentrifugologists appear, and the philosophers get desperate.

Examples of plasmids encoding the degradation of organic compounds

Strain	Plasmid	Substrates	Size (kb)	Inc-group
Aliphatic compounds:				
<i>Pseudomonas oleovorans</i> PpG6	OCT	Octane, decane	500	P2
<i>Pseudomonas putida</i> PPU2	pSRQ	Acyclic isoprenoid (citronellol, geraniol)	75	–
Monoaromatic compounds:				
<i>P. putida</i> R1	SAL1	Salicylate	85	P9
<i>P. putida</i> PpG1	CAM	Camphor	500	P2
<i>P. putida</i> PaW1	TOL	Xylene, Toluene	115	P9
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RJE74	pWW174	Benzene	200	–
<i>Pseudomonas sp.</i> CIT1	pCIT1	Anililine	100	–
<i>P. putida</i> ST	pEG	Styrene	37	–
<i>P. putida</i> RE204	pRE4	Isopropyl benzene	105	–
<i>P. putida</i> NCIB9869	pRA500	3,5-xylene	500	–
<i>Pseudomonas sp.</i> CF600	pVI150	Phenol	–	P2
<i>P. putida</i> CINNP	pCINNP	Cinnamic acid	75	–
<i>P. putida</i> AC858	pAC25	3CBA	117	P1
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	pJP4	2,4-D, 3CBA	75	P1
<i>Comamonas testosteroni</i> BS1310	pBS1010	p-Toluenesulfonic Acid	130	–
Polyaromatic compounds:				
<i>P. putida</i> PpG7	NAH7	Naphthalene, Phenanthrene, Anthracene	83	P9
<i>Pseudomonas sp.</i> CB406	pWW100	Biphenyl	200	–
<i>Alcaligenes sp.</i> A5	pSS50	PCBs	53	P1
<i>Arthrobacter sp.</i>	pKF1	PCBs	80	–
Heterocyclic compounds:				
<i>Pseudomonas convexa</i> Pcl	NIC	Nicotine, Nicotinate	–	–
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> DBT2	pDBT2	Dibenzothiophene	80	–

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons



Naphthalene



Acenaphthene



Phenanthrene



Fluorene

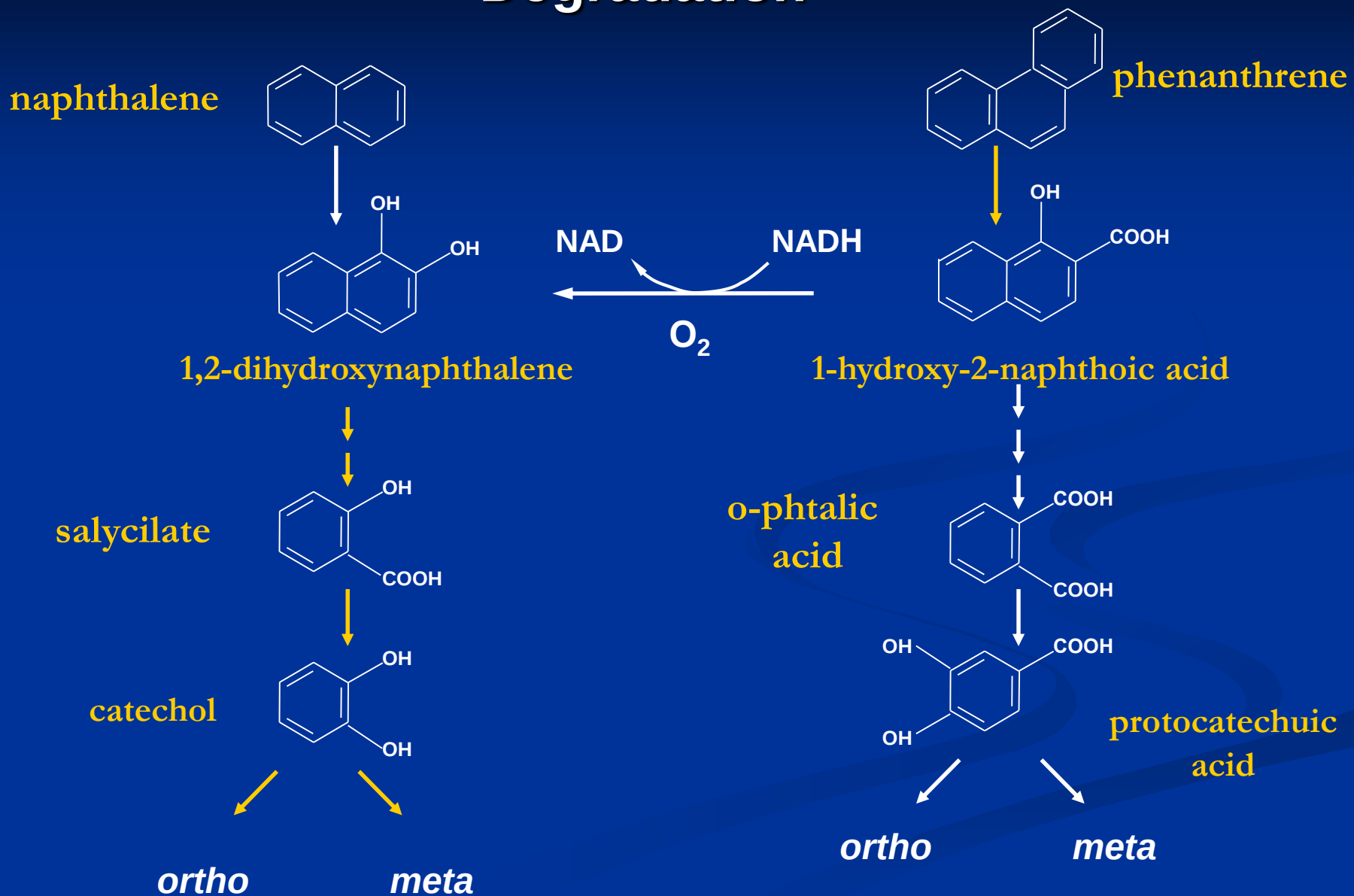


Anthracene

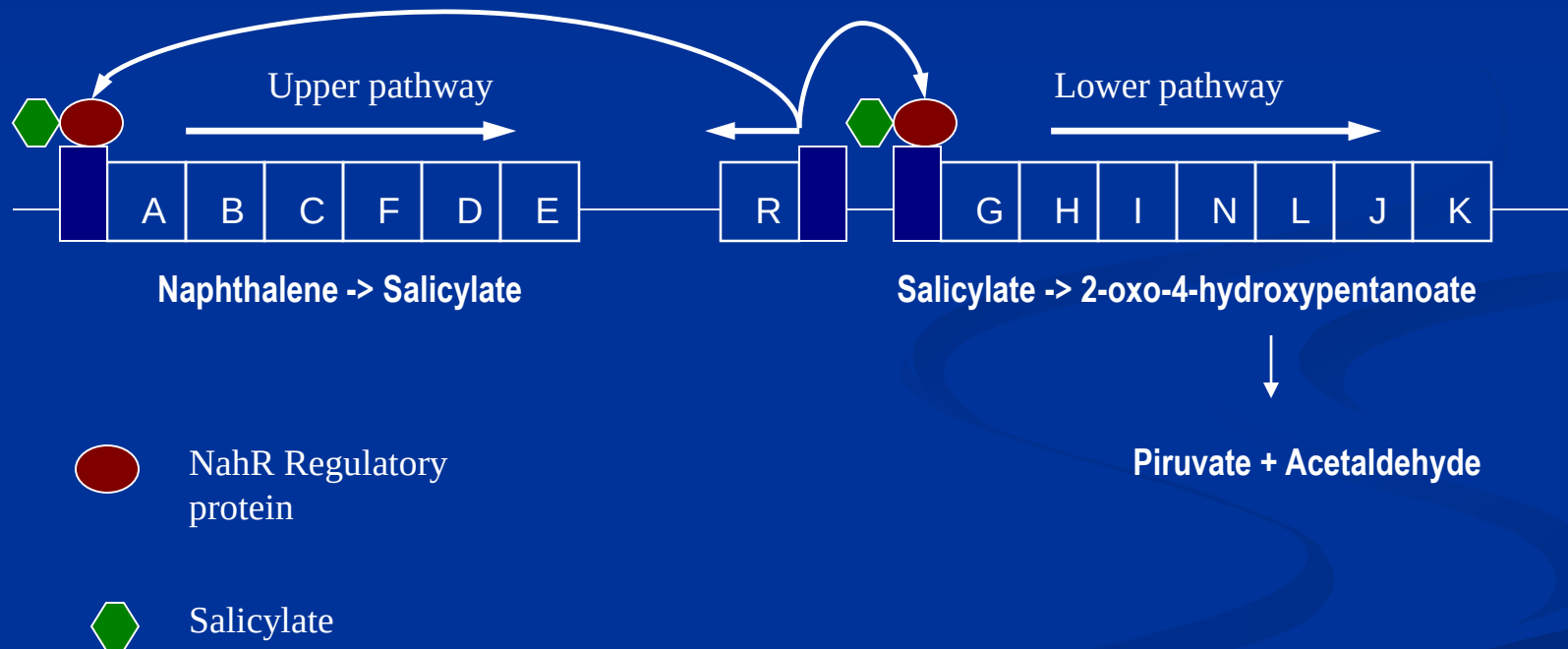


Pyrene

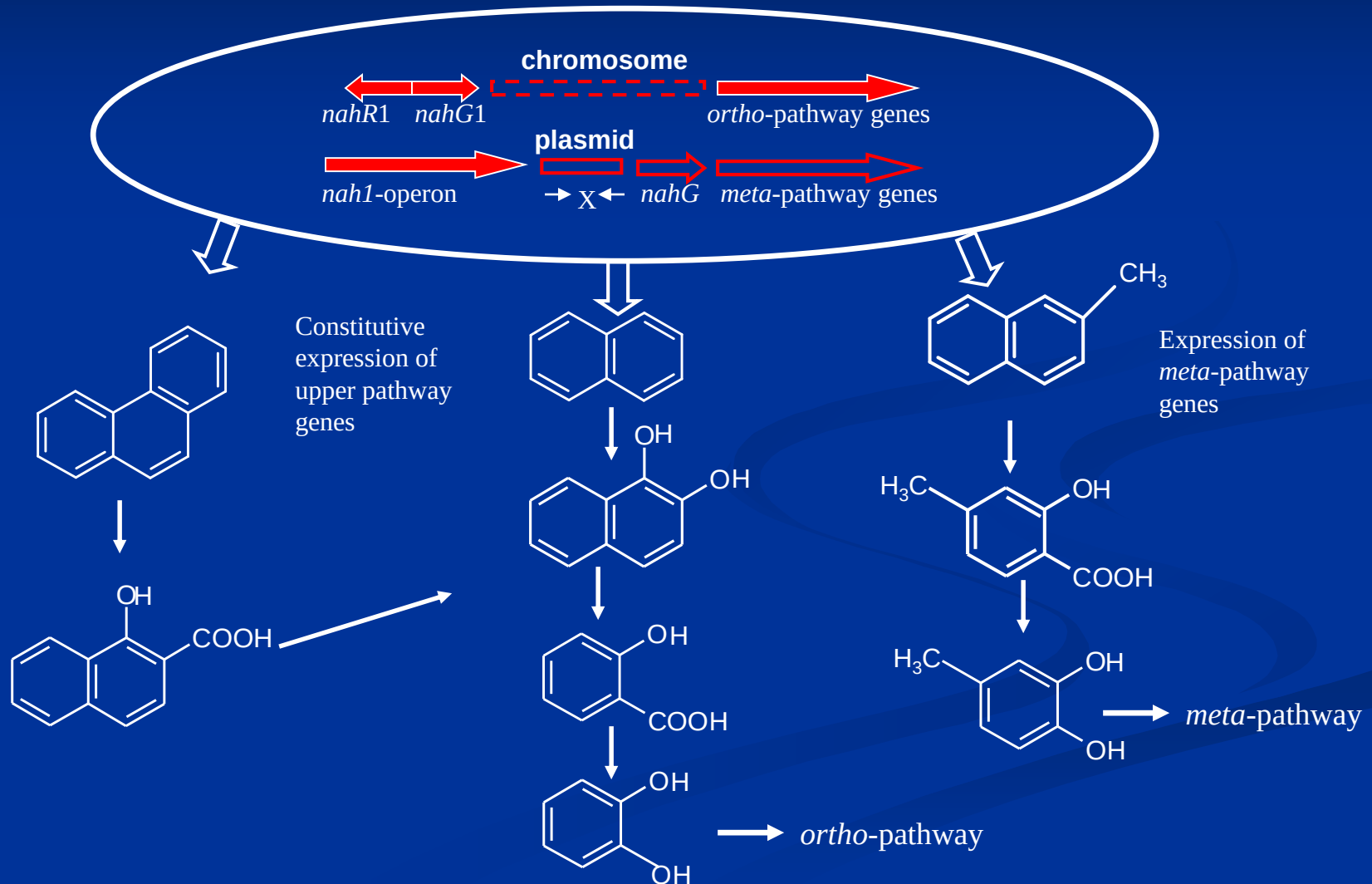
Pathways of Naphthalene and Phenanthrene Degradation



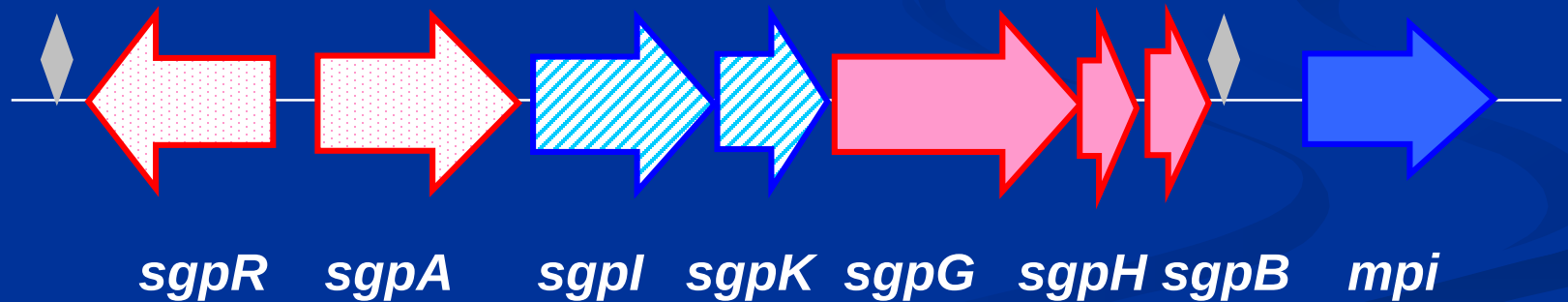
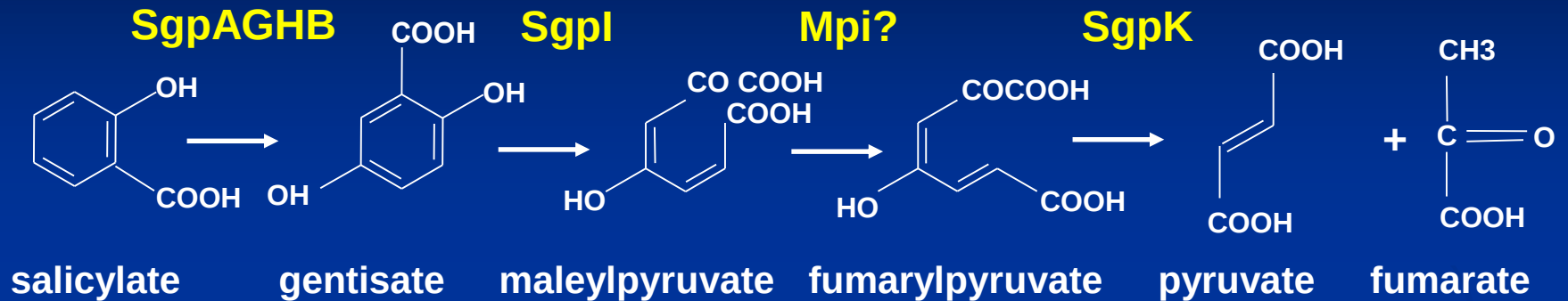
NAH Catabolic Gene Organization and Regulation



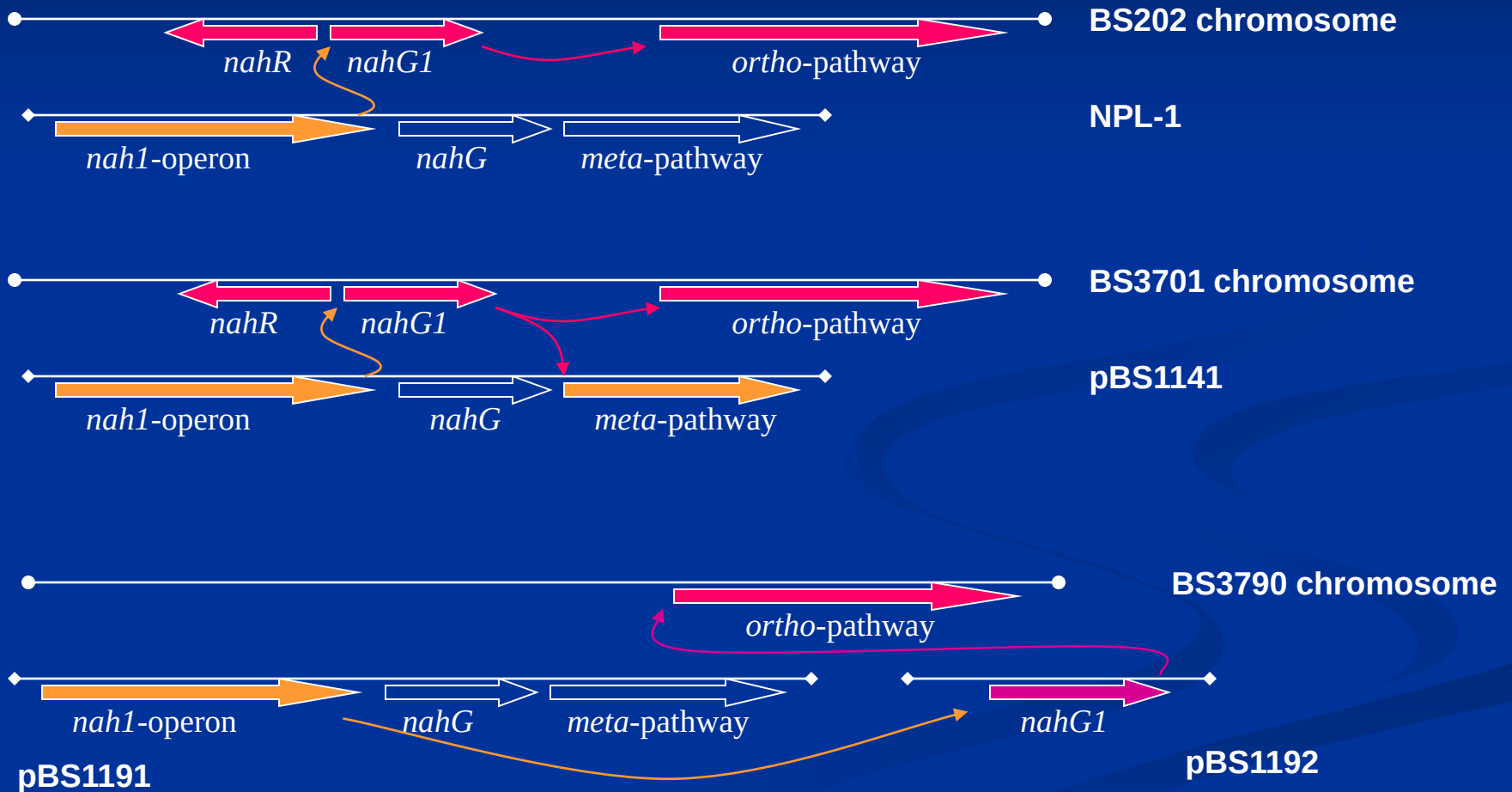
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Biodegradation by *P. putida* BS202

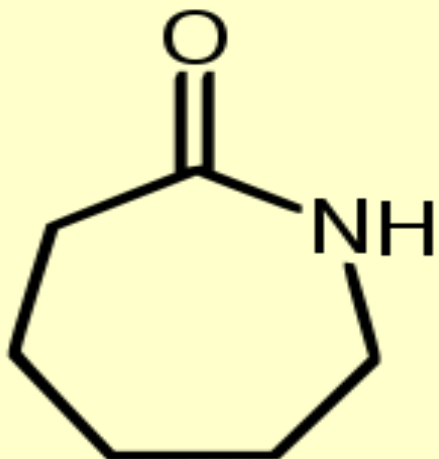


P. putida AK5 newly described Salicylate Degradation Pathway

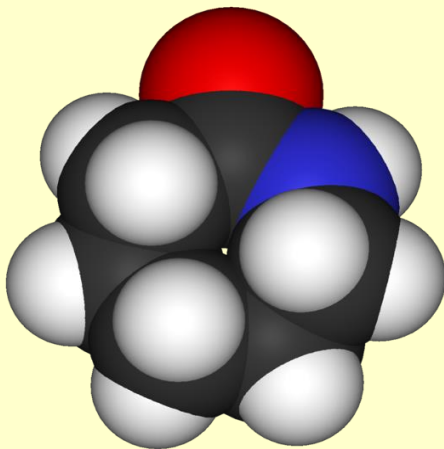


Organization of PAH catabolic genes in some *Pseudomonas putida* strains



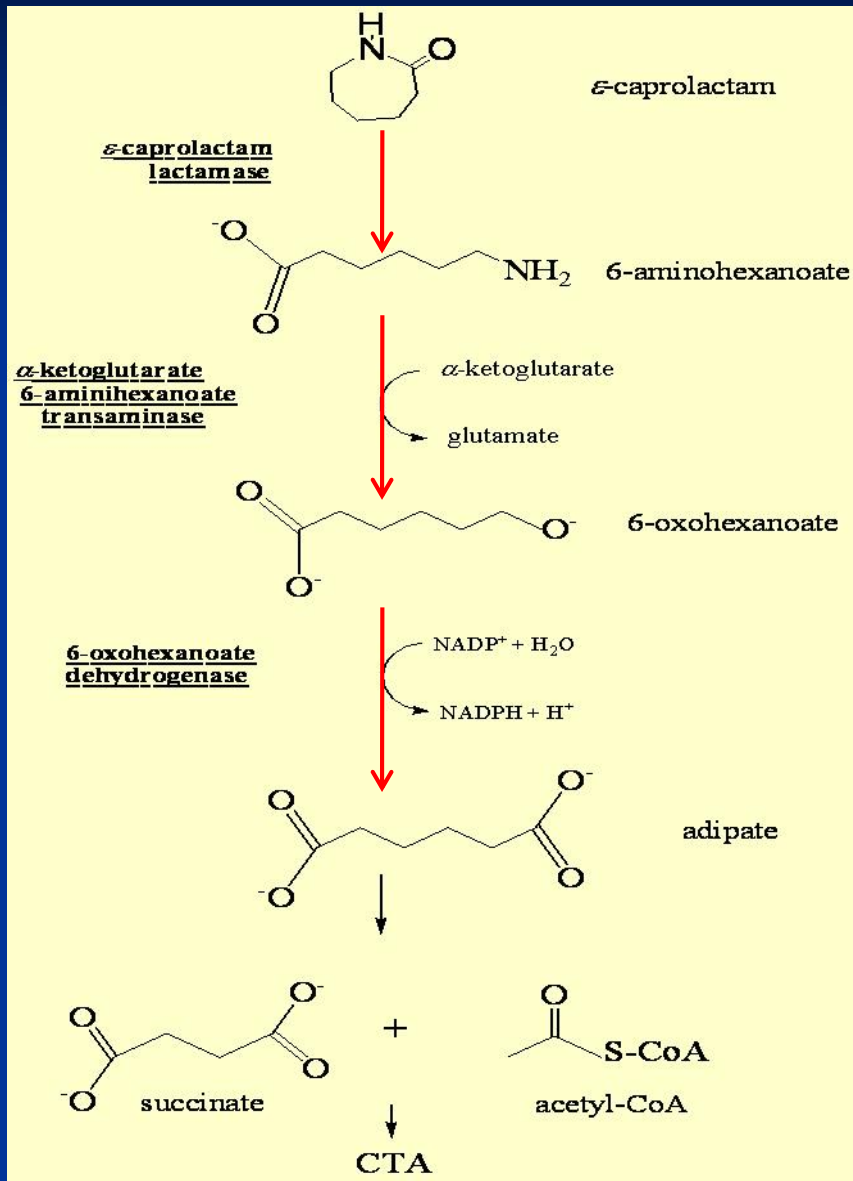


ϵ -Caprolactam (the lactam of 6-aminohexanoic acid) is one of the widespread environmental pollutants with annual worldwide production amounting to millions of tons



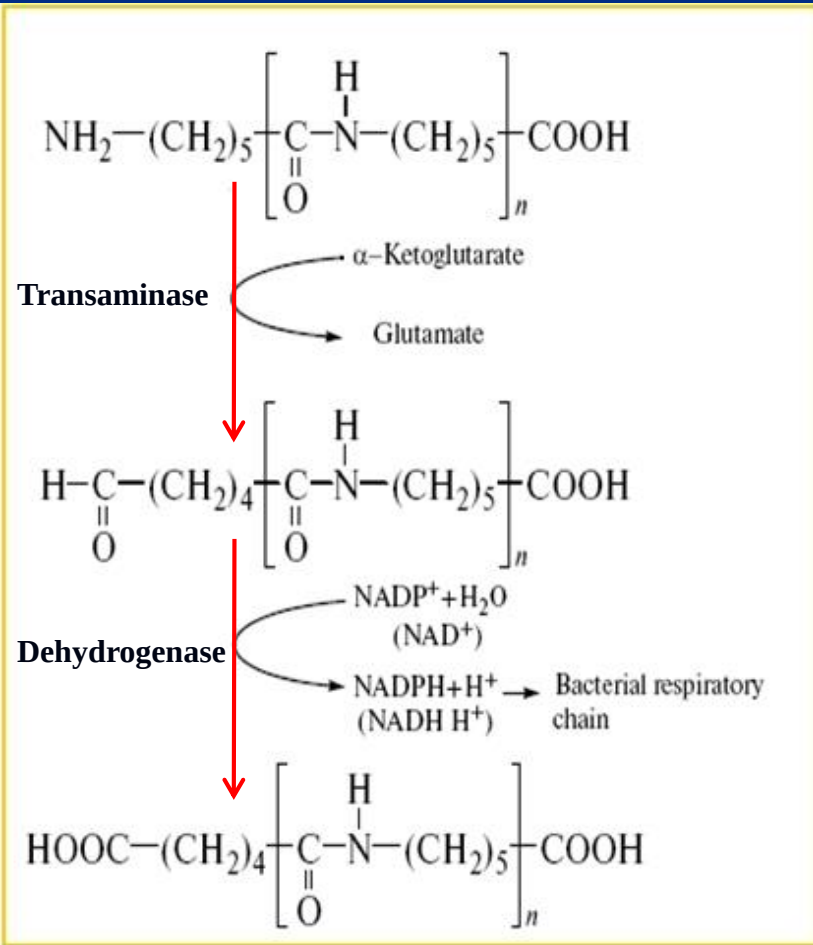
ϵ -Caprolactam is extensively used as a stock for production of polymer materials (**caprone, nylon-6, perlon**) for industry, agriculture, medicine, and household activity

ϵ -caprolactam biodegradation pathway



The caprolactam biodegradation proceeds through formation of 6-aminohexanoate and adipate; then breakdown products of adipic acid are oxidised in **tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle)**

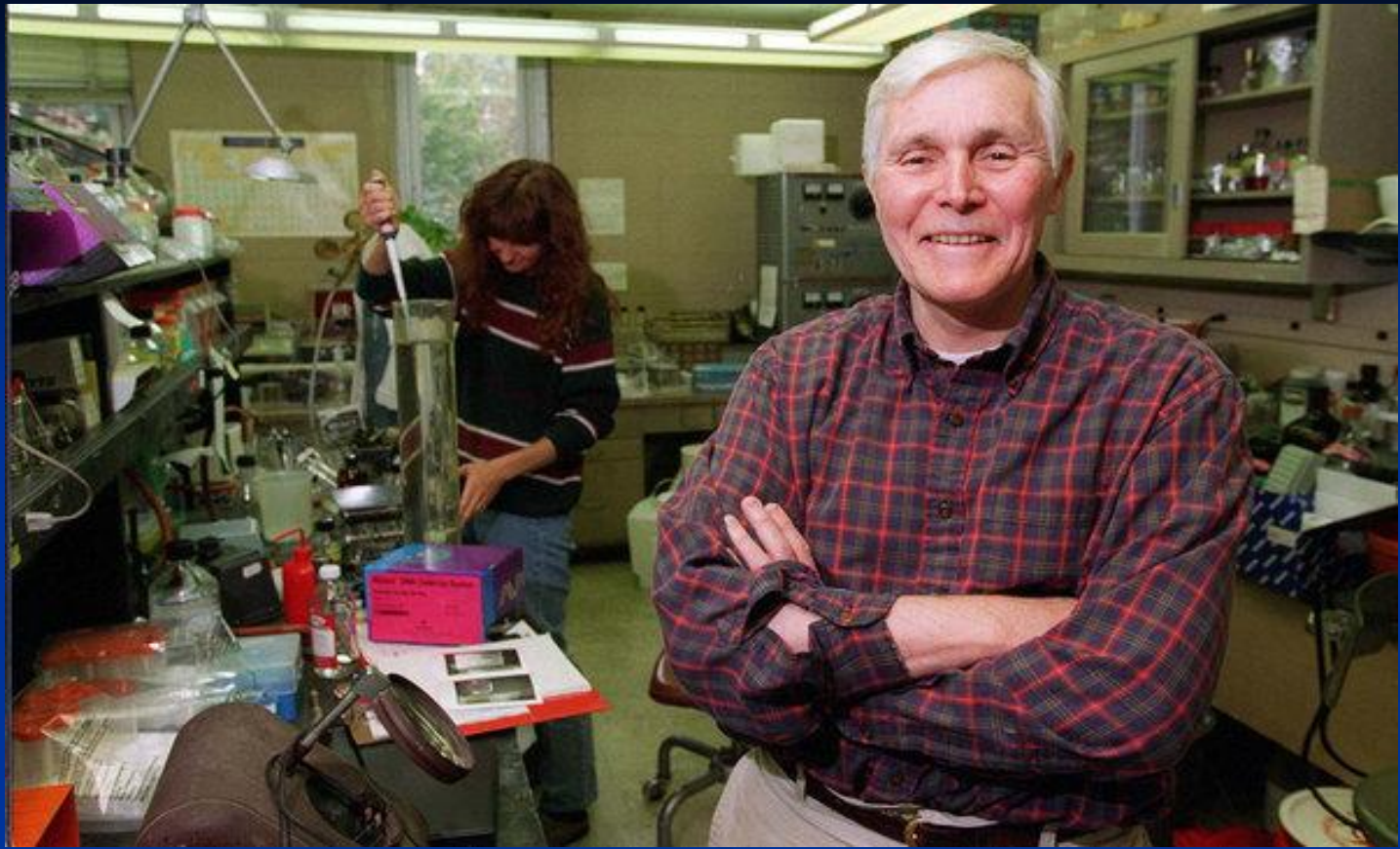
Preliminary scheme of transformation of linear ϵ -caprolactam oligomers by the ϵ -caprolactam-degrading bacteria



- Scheme of transformation of linear ϵ -caprolactam oligomers by ϵ -caprolactam-degrading bacteria is first proposed
- CAP- plasmid incodes transformation of linear ϵ -caprolactam oligomers due to broad substrate spesificities of key enzymes of caprolactam catabolism
- Biochemical reactions of microbial transformation of the ϵ -caprolactam linear oligomers to respective derivatives with terminal carboxyl groups have not been described previously

СПЯЩИЙ ГИГАНТ БИОЛОГИИ - МИР МИКРООРГАНИЗМОВ

Carl Woese, 1998



**Carl Woese (1928-2012) – американский микробиолог.
Работал в Университете Иллинойса в Урбана-Шампейн.
*По образованию физик.***

**Обосновал применение рРНК для реконструкции филогении
Выявил домен Archebacteria (Архебактерии, Археи) (Woese, Fox, 1977).**

Филогенетическая система
классификации плазмид по
группам несовместимости
Inc (incompatibility) groups

■ Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent?

A.M. Boronin.

FEMS Microbiol. Letters, 1992, 100, 461-468

R-plasmids of *Pseudomonas aeruginosa*

Inc group	Plasmid	Properties	Size (kb)
P1	pBS223	Tc Tra ⁺	61
P2	pBS12	Sm Cm Hg Mer Te Uv Tra ⁺	~400
P3	pBS73	Sm Cm Tc Km Hg Su Tra ⁺	88
P4	pBS95	Sm Su Ap Tra ⁻	13
P5	pBS11	Sm Su Hg Pmr Cr Tra ⁺	200
P6	Rms149	Sm Gm Cb Su Tra ⁺	49
P7	pBS14	Cm Tra ⁺	140
P9	R2	Sm Su Cb Uv Tra ⁺	68
P10	pBSRI	Km Gm Su Tp Hg Pmr Tra ⁺	65
P11	R151	Km Gm Sm Sp Su Cb Tp Tra ⁺	81
P12	R716	Sm Hg Tra ⁺	nd
P13	pM625	Sm Km Gm Su Cb Tp Bor Tra ⁺	nd
P4	pBS52	Sm Su Cb Tra ⁺	38
P14	pBS222	Tc Tra ⁺	17.2

Некоторые антибиотикорезистентные штаммы флуоресцирующих псевдомонад , изолированные из очистных сооружений г. Пущино на разных этапах очистки

Обозначение штамма	Фенотип*	Характеристика плазмид	<i>int1</i> / <i>su1</i> / <i>qacEΔ1</i>	Размер кассеты, пн
1C-5	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Rif ^R Cm ^R Caz ^R Fep ^R		-/-/-	
1K-1	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R Rif ⁺ Caz ^R Fep ^R	Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R Int1	+ / + / +	~1000
1T-31	Tc ^R Sm ^R Caz ^R Fep ^R	IncN * *	+ / + / +	~1400
1T-50	Tc ^R Sm ^R Ak ^R Fep ^R	IncN	+ / - / -	
2G-2	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Caz ^R Mer ^R Cb ^R	IncP-9	- / - / -	
2G-7	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R Mer ^R	IncP-9 Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R	- / - / -	
2S-6	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Caz ^R Fep ^R Cb ^R	Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R Int1	+ / + / +	~1500

2S-9	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R	IncP-9 Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R	-/-/-	
3C-32	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Ak ^R Tob ^R Fep ^R		+ / + / +	~1000
3C-33	Km ^R Tob ^R Caz ^R Fep ^R		+ / + / +	~2400
4C-25	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Ak ^R Tob ^R Caz ^R Fep ^R	IncN	+ / + / +	~1200
4G-3	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R Cm ^R	IncP-9 Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R Int1	+ / + / +	~1500
4T-40	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Ak ^R Tob ^R Caz ^R Fep ^R Mer ^R		-/-/-	
5C-1	Sm ^R Gm ^R Caz ^R Fep ^R Mer ^R	IncN	+ / + / +	~750
5S-96	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Mer ^R Cb ^R	Tra ⁺ Sm ^R Gm ^R	+ / + / +	~1500

* Tc^R, Km^R -устойчивость к тетрациклину, канамицину, Cb^R – устойчивость к карбенициллину, Sm^R – устойчивость к стептомицину, Cm^R, Gm^R, Rif^R – устойчивость к хлорамфениколу, гентамицину, рифампицину, Ak^R – устойчивость к амикацину, Tob^R – устойчивость к тобрамицину, Caz^R – устойчивость к цефтазидиму, Fep^R – устойчивость к цефепиму, Mer^R – устойчивость к меропенему.

Tra⁺ - способность плазмид к конъюгационному переносу.

* * Группа несовместимости плазмиды.

Plasmids Encoding the Degradation of Naphthalene

Plasmid	Properties	Incompatibility group	Transfer to <i>P.putida</i> frequency	Size (kb)
NPL-1	Nah ⁺	IncP-9β	10 ⁻³	100
pBS2	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7/9β	10 ⁻⁴	130
pBS101	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7	10 ⁻³	50
pBS240	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	10 ⁻⁴	160
pBS216	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9δ	10 ⁻³	85
pOV17	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9δ	10 ⁻⁴	85
pBS243	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7/9β	10 ⁻⁴	160
pBS213	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7	10 ⁻⁴	150
pBS218	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7(2)	10 ⁻⁴	160
pBS219	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7(2)	10 ⁻⁴	180
pBS215	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-? Not P-2, 7, 9	10 ⁻⁵	150
pBS242	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-? Not P-2, 7, 9	10 ⁻⁵	150
pBS1191	Nah ⁺	IncP-9β	10 ⁻⁷	100
pBS1141	Nah ⁺	IncP-9β	10 ⁻⁴	100
pBS1181	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	10 ⁻⁶	110
pHK43	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7	ND*	100
pHK72	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	ND	85
p8C	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	ND	120
p15C	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	ND	120
p24C	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	ND	120
p25C	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	ND	120

ND – not determined.

Characteristics of some *CAP*– plasmids from the collection

Plasmid	<u>Carbon source</u>			Molecular mass, kb	Transfer frequency	Incompatibility group	Resistance to heavy metal
	CAP	AHA	ADA				
BS262	+	+	+	450	10^{-7}	IncP-2	Te, Hg
BS265	+	+	+	140	10^{-6}	IncP-9	Hg
BS268	+	+	+	100	10^{-6}	IncP-9	Hg, Sn
BS276	+	+	+	70	10^{-9}	IncP-7, IncP-9	--
BS266	+	+	+	450	10^{-7}	IncP-2	Te, Sn
BS263	+	+	+	450	10^{-7}	IncP-2	Te, Sn
BS269	+	+	+	100	10^{-7}	IncP-9	Hg, Sn
BS264	+	+	+	450	10^{-7}	IncP-2	Te, Sn
BS267	+	+	+	140	10^{-7}	IncP-9	Hg, Sn
BS270	+	+	+	100	10^{-7}	IncP-7, IncP-9	Hg, Sn
BS271	+	+	+	450	10^{-7}	IncP-2	Te, Hg, Cr

Designations: Hg, mercuric chloride; Te, potassium tellurite; Sn, organotin compounds; Cr, potassium bichromate;
 CAP-caprolactam, AHA – aminohexanoic acid, ADA – adipic acid

■ Pseudomonas plasmids.

C.M. Thomas, A.S. Haines, I.A. Kosheleva, A.M. Boronin
In: Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory.
Wiley-VCH, 2008, 293-330

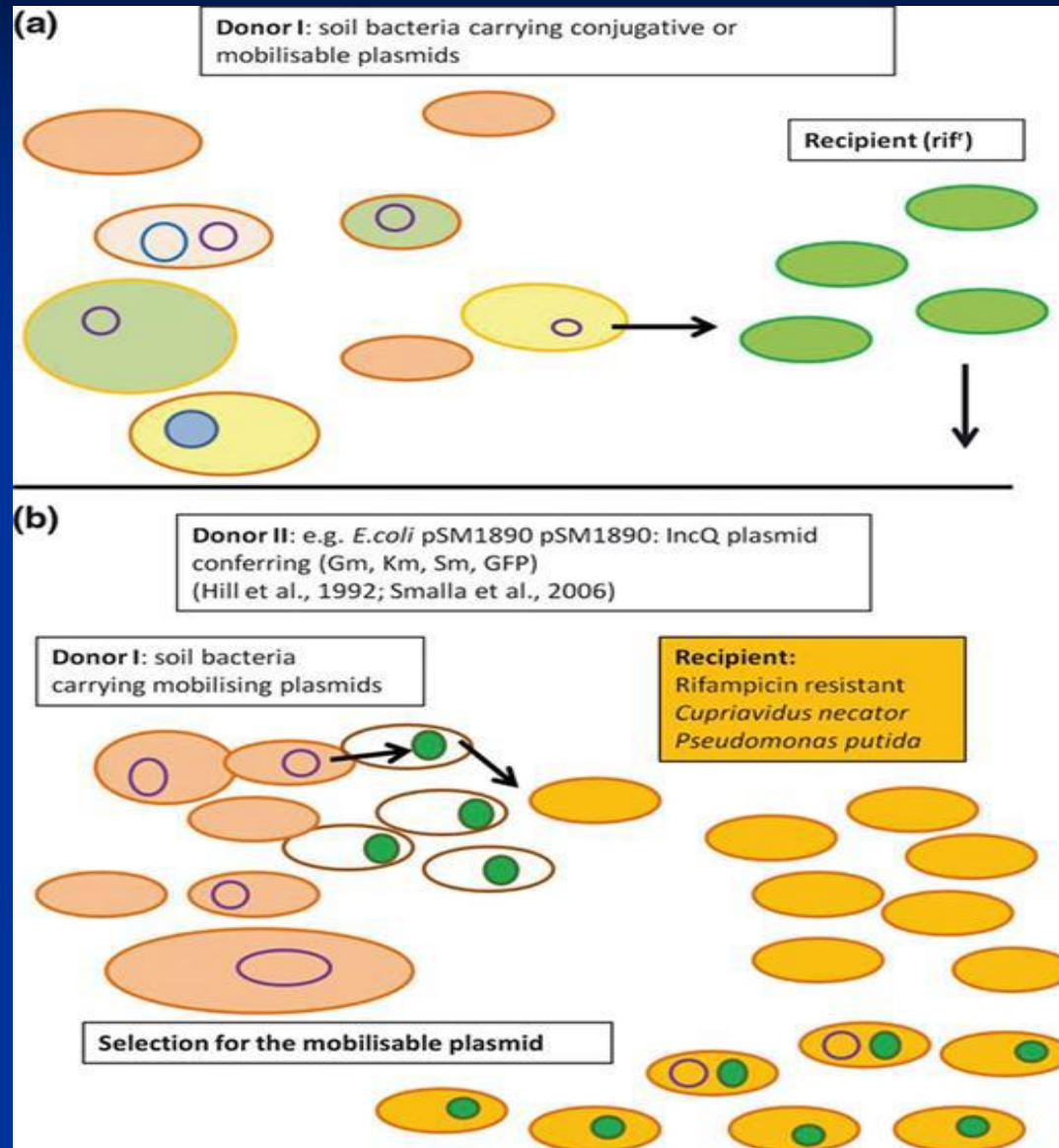
Группы несовместимости плазмид, способных к поддержанию в бактериях рода *Pseudomonas*

Группа несовместимости и подгруппы	Представители	Основные характеристики
IncP-1 6 подгрупп (α , β , γ (расширенная), δ , ϵ , ζ)	R-плазмиды: RK2, R751, pB2, pQKH54. D-плазмиды: pAC25, pEMT3, pJP4, pUO1	Конъюгативные плазмиды биodeградации ксенобиотиков (в т.ч. галогенированных поллютантов) и резистентности к антибиотикам и тяжелым металлам. Очень широкий круг хозяев, что связано с пластичностью репликативного аппарата.
IncP-2	R-плазмиды: pMG1, pMG5, pOZ176. D-плазмиды: OCT, CAP, CAM.	Обычно очень крупные (200-500 т.п.н.) D- или R-плазмиды, базовый репликон не описан. Конъюгативные, кодируют устойчивость к солям теллура и (часто) других тяжелых металлов.
IncP-3 (IncA/C, подгруппы IncA/C ₁ и IncA/C ₂)	R-плазмиды: pIP1202, RA1, R667, pBS73, p2039, pUO-SVR3.	Крупные конъюгативные/неконъюгативные плазмиды резистентности. Обычно несут и гены устойчивости к ртути. Имеют широкий круг хозяев. Получили название «эпидемических» плазмид.
IncP-4 = (IncQ) IncQ-1 α , IncQ-1 β , IncQ-1 γ , IncQ-2 α , IncQ-2 β , IncQ-2 γ	RSF1010, R300B, R1162, pDN1, pIE1130, pTF-FC2 pTC-F14, pRAS3	Небольшие (обычно до 14 т.п.н.) R- или криптические мобилизуемые плазмиды с экстремально широким кругом хозяев. Репликация по типу D-петли.

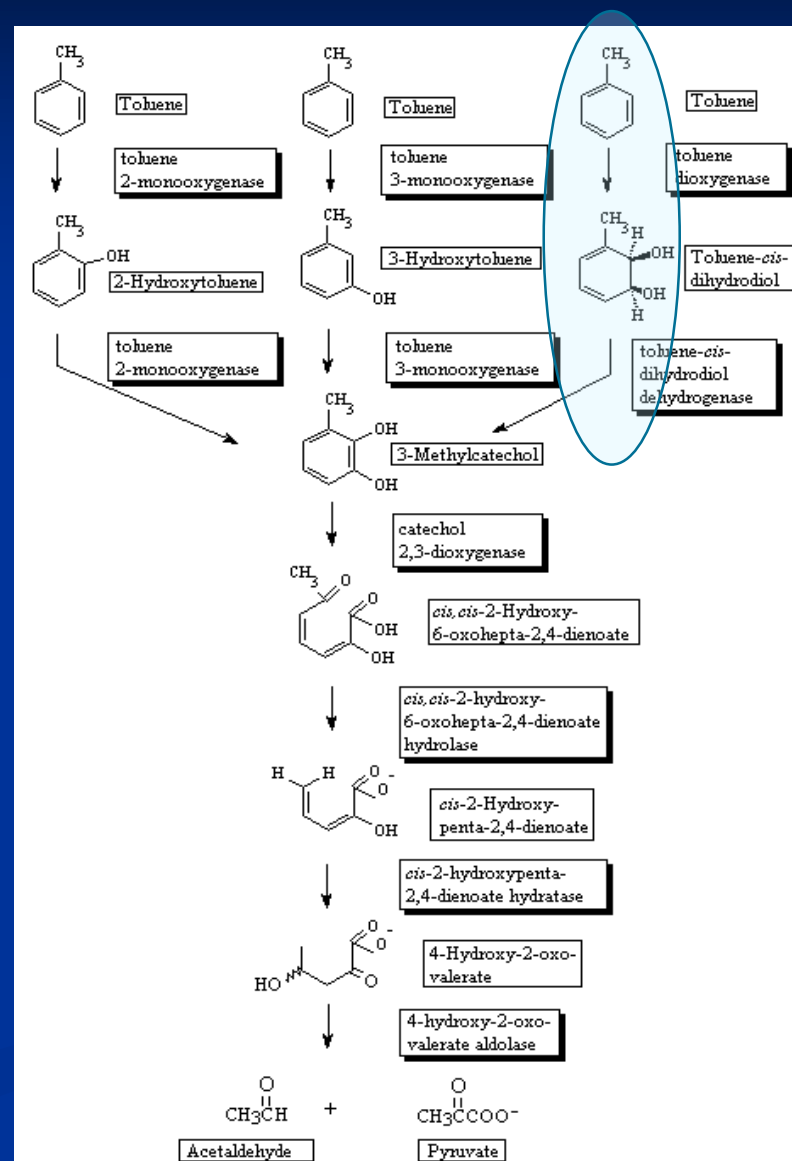
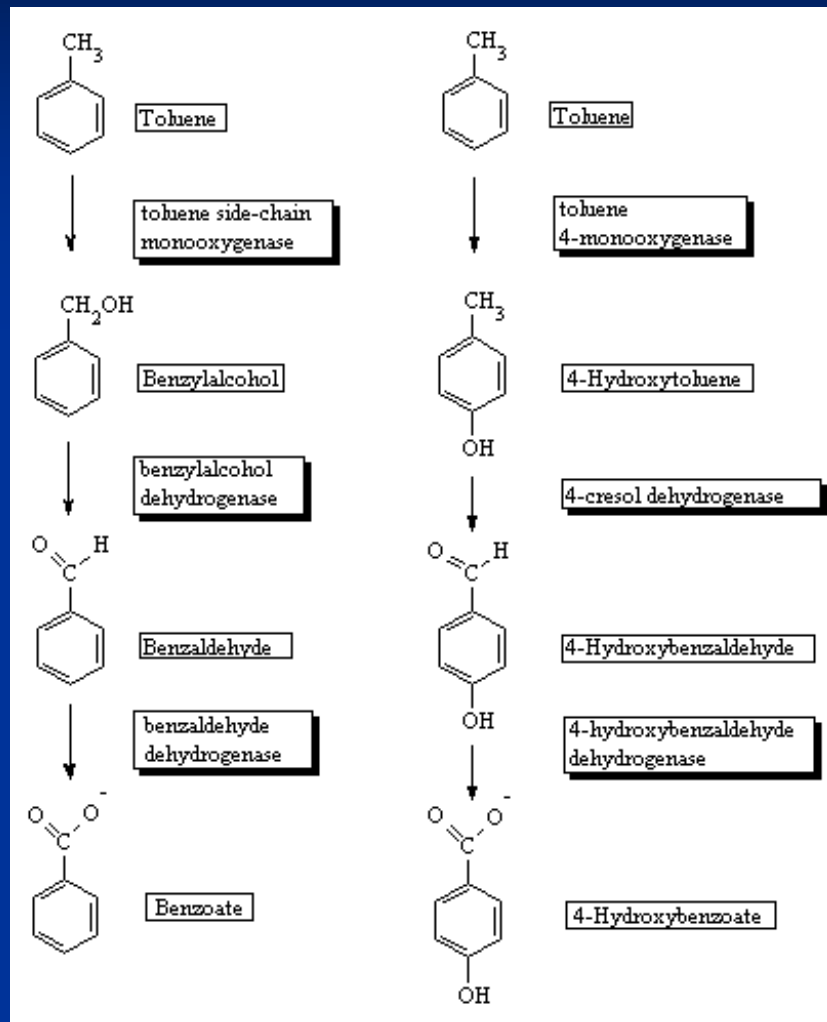
IncP-5	Rms163, Rms176.	Крупные конъюгативные плазмиды антибиотикорезистентности.
IncP-6 (IncG/U)	Rms149, RA3, pFBAOT6, pRAS1.	Конъюгативные или мобилизуемые (Rms149) плазмиды антибиотикорезистентности (содержат интегроны) с широким кругом хозяев. 79% генома Rms149 представлено МГЭ.
IncP-7 (подгруппы α , β , γ , δ).	D-плазмиды: pND6-1, pWW53, pL6.5, pDK1 pCAR1. R-плазида – Rms148.	Конъюгативные/неконъюгативные, крупные (в среднем 70-200 т.п.н.), низкокопийные, узкий круг хозяев. Системы репликации и сегрегации уникальны.
IncP-8	FP2	Кодирует устойчивость к солям ртути; половой фактор <i>P.aeruginosa</i> (конъюгативна, мобилизует хромосому).
IncP-9 2 ветви: pDTG-ветвь (подгруппы δ , θ , ζ , ι) pWWO-ветвь (подгруппы α , β , γ , ε , η)	D-плазмиды: NAH7, pSN11, pBS216, pNL60, pOV17, pSVS15. D-плазмиды: NPL-1, pBS2, pBS265 R-плазмиды: R2, pMG18, pNL15, pM3.	Широко распространенные в различных популяциях флюоресцирующих псевдомонад R-, но чаще, D-плазмиды большого размера, конъюгативные, с умеренным кругом хозяев.

IncP-10	R91-5	Конъюгативная плазмида устойчивости к карбенициллину (55 т.п.н.) с экстремально узким кругом хозяев (только <i>P.aeruginosa</i>).
IncP-11	R151	33-т.п.н. плазмида мультirezистентности, детерминанты которой находятся в интегрене класса 1.
IncP-12	R716	165 т.п.н., кодирует устойчивость к солям ртути и стрептомицину, узкий круг хозяев.
IncP-13	pMG25, pQM1.	Крупные конъюгативные R-плазмиды с узким кругом хозяев. pQM1 кодирует устойчивость к солям ртути и UV.
IncP-14	pBS222	17,2 –т.п.н. плазмида устойчивости к тетрациклину с широким кругом хозяев. Конъюгативна, но мобилизуется с большей эффективностью.

Exogenous isolation of plasmids



Toluene Degradation Pathways





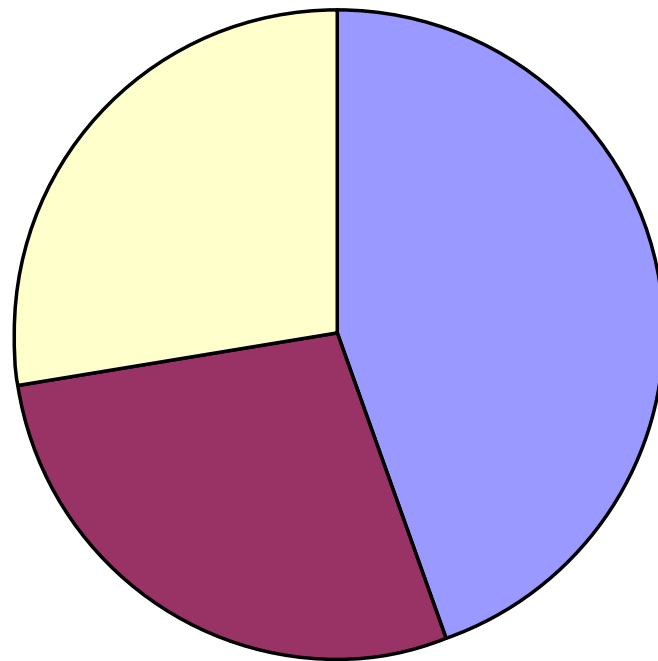
Exxon Valdez Oil Spill, Alaska, 1989





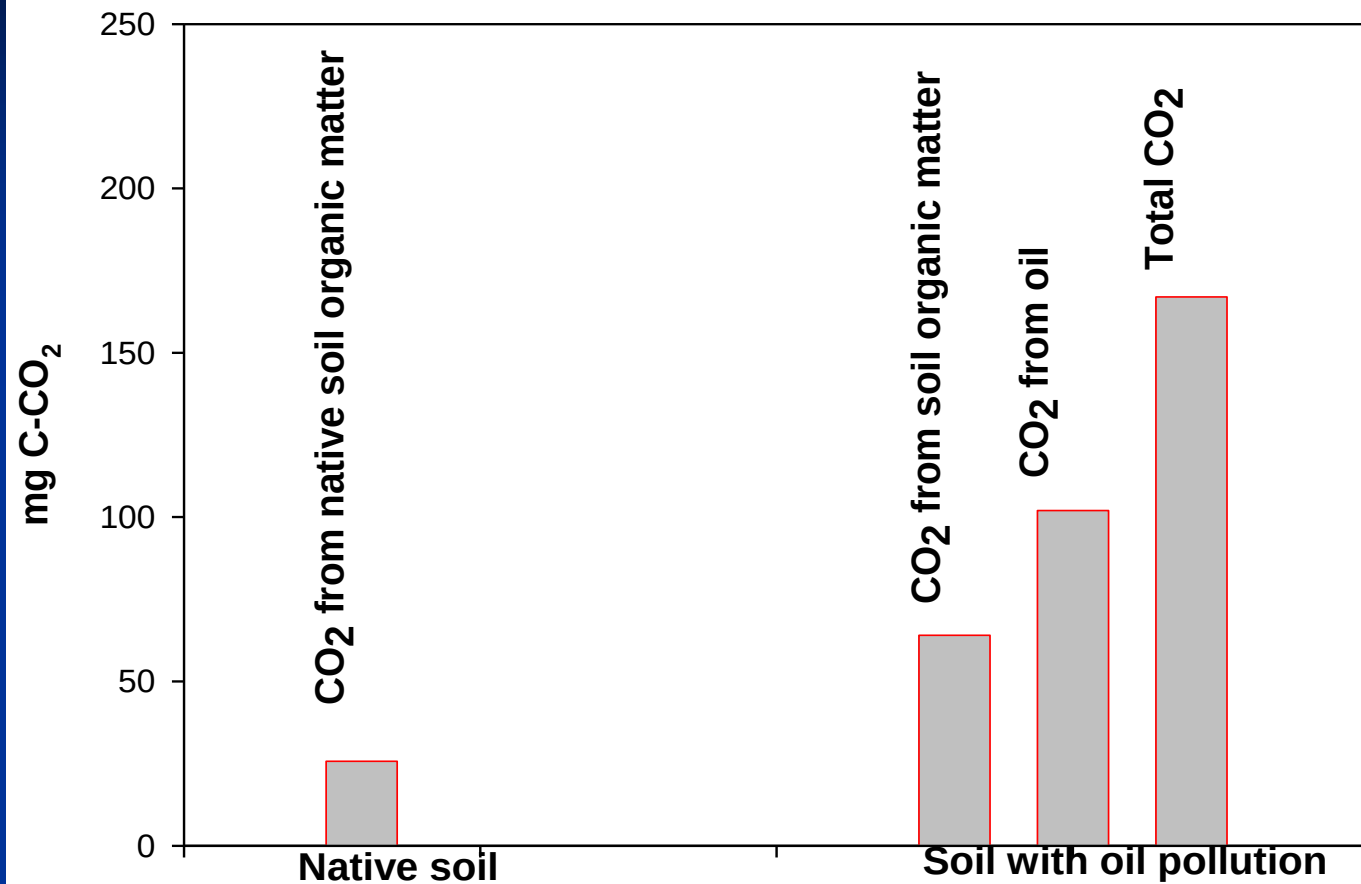


Culturable bacteria from tar pits



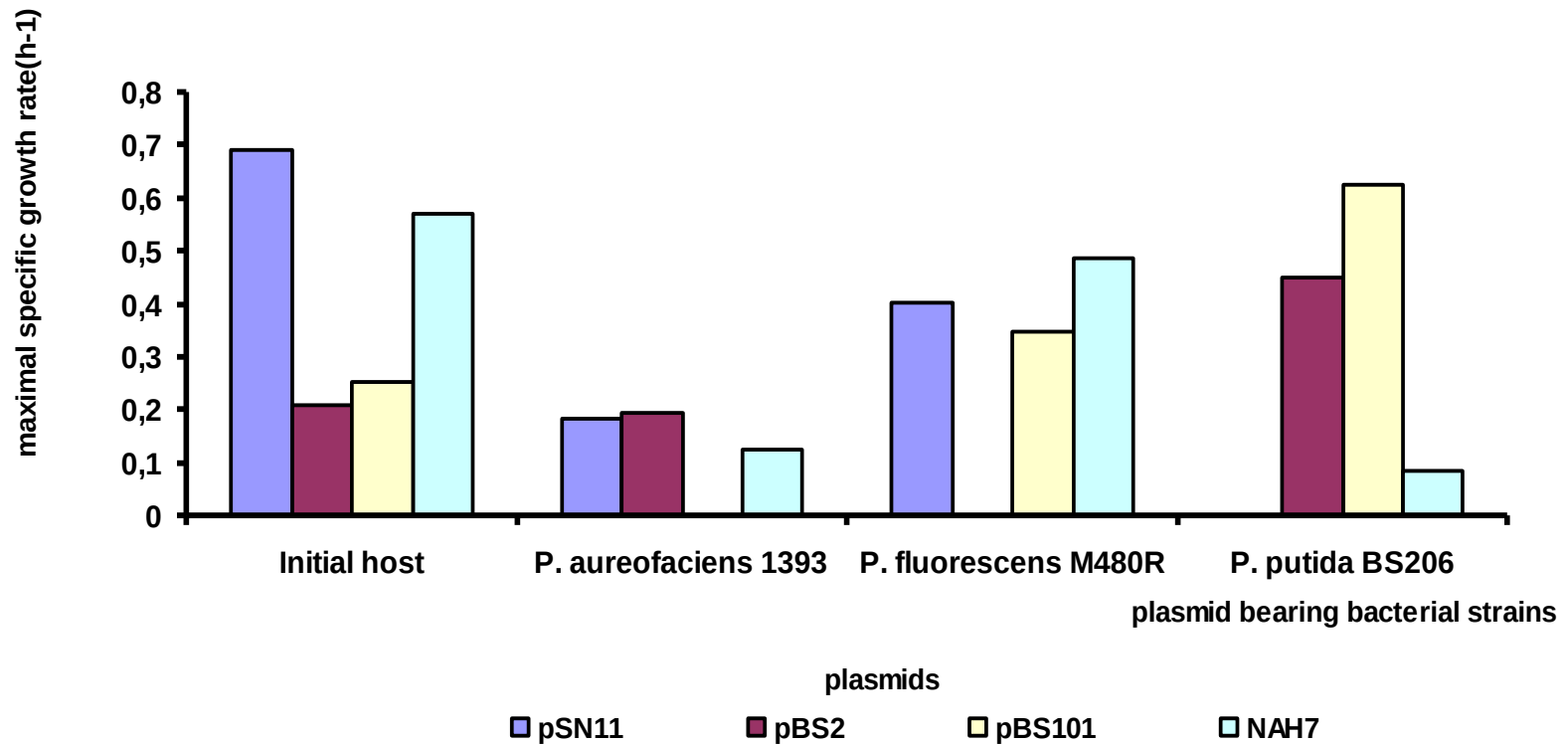
Genus

- Bacillus
- Citrobacter
- Pseudomonas



- Quantities of microbial CO₂ emission from arable soil with and without the crude oil pollution determined by isotopic ratio mass spectrometry (IRMS)

Specific Growth Rates of Plasmid Bearing Bacterial Strains in Batch Culture on Naphthalene

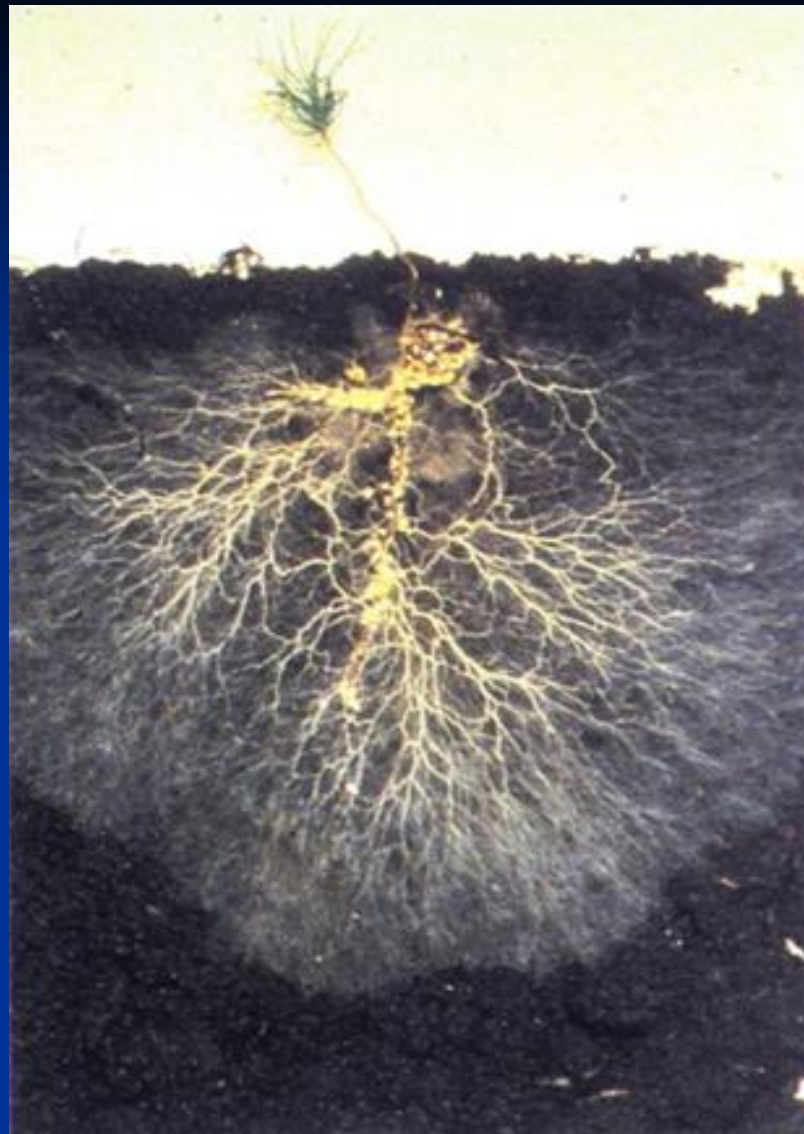


Diversity of Microorganisms from Oil Slimes

THERMUS THERMOPHILUS_SUBGROUP
THERMUS THERMOPHILUS_SUBGROUP
THERMUS THERMOPHILUS_SUBGROUP
AZOSPIRILLUM
LIPOFERUM_SUBGROUP
METHYLOSINUS
TRICHOSPORIUM_SUBGROUP
RHODOFERAX
FERMENTANS_SUBGROUP
RHODOFERAX
FERMENTANS_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
AQUASPIRILLUM
PSYCHROPHILUM_SUBGROUP
BURKHOLDERIA GLATHEI_SUBGROUP
BACILLUS
STEAROTHERMOPHILUS_SUBGROUP
LEPTOSPIRILLUM
FERROOXIDANS_SUBGROUP
METHYLOSINUS
TRICHOSPORIUM_SUBGROUP
METHYLOBACTERIUM
ORGANOPHILUM_SUBGROUP
IODOBACTER FLUVIATILE
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP

NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
NITROSOMONAS
EUROPAEA_SUBGROUP
RHODOFERAX
FERMENTANS_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM
THERMOBUTYRICUM_SUBGROUP
CHROMOBACTERIUM
VIOLACEUM_SUBGROUP
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
NEISSERIA
GONORRHOEAE_SUBGROUP
VARIOVORAX PARADOXUS_SUBGROUP
BURKHOLDERIA GLATHEI_SUBGROUP
DEHALOCOCCOIDES
ETHENOGENES_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM BOTULINUM_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM BOTULINUM_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM
COCHLEARIUM_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM
COCHLEARIUM_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM
AURANTIBUTYRICUM_SUBGROUP
HYDROGENOPHILUS
THERMOLUTEOLUS_SUBGROUP

COMAMONAS TERRIGENA_SUBGROUP
RHODOFERAX
FERMENTANS_SUBGROUP
BURKHOLDERIA GLATHEI_SUBGROUP
ACHROMATIUM_ASSEMBLAGE
ACHROMATIUM_ASSEMBLAGE
GEOBACTER
METALLIREDUCTENS_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM
AURANTIBUTYRICUM_SUBGROUP
CLOSTRIDIUM
AURANTIBUTYRICUM_SUBGROUP
MESORHIZOBIUM LOTI_SUBGROUP
NITROSOSPIRA
MULTIFORMIS_SUBGROUP
NITROSOSPIRA
MULTIFORMIS_SUBGROUP
HYDROGENOPHILUS
THERMOLUTEOLUS_SUBGROUP
COMAMONAS TERRIGENA_SUBGROUP
COMAMONAS TERRIGENA_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
ACIDOVORAX AVENAE_SUBGROUP
BURKHOLDERIA GLATHEI_SUBGROUP
ACHROMATIUM_ASSEMBLAGE
CLOSTRIDIUM
ALGIDICARNIS_SUBGROUP
BURKHOLDERIA CEPACIA_SUBGROUP

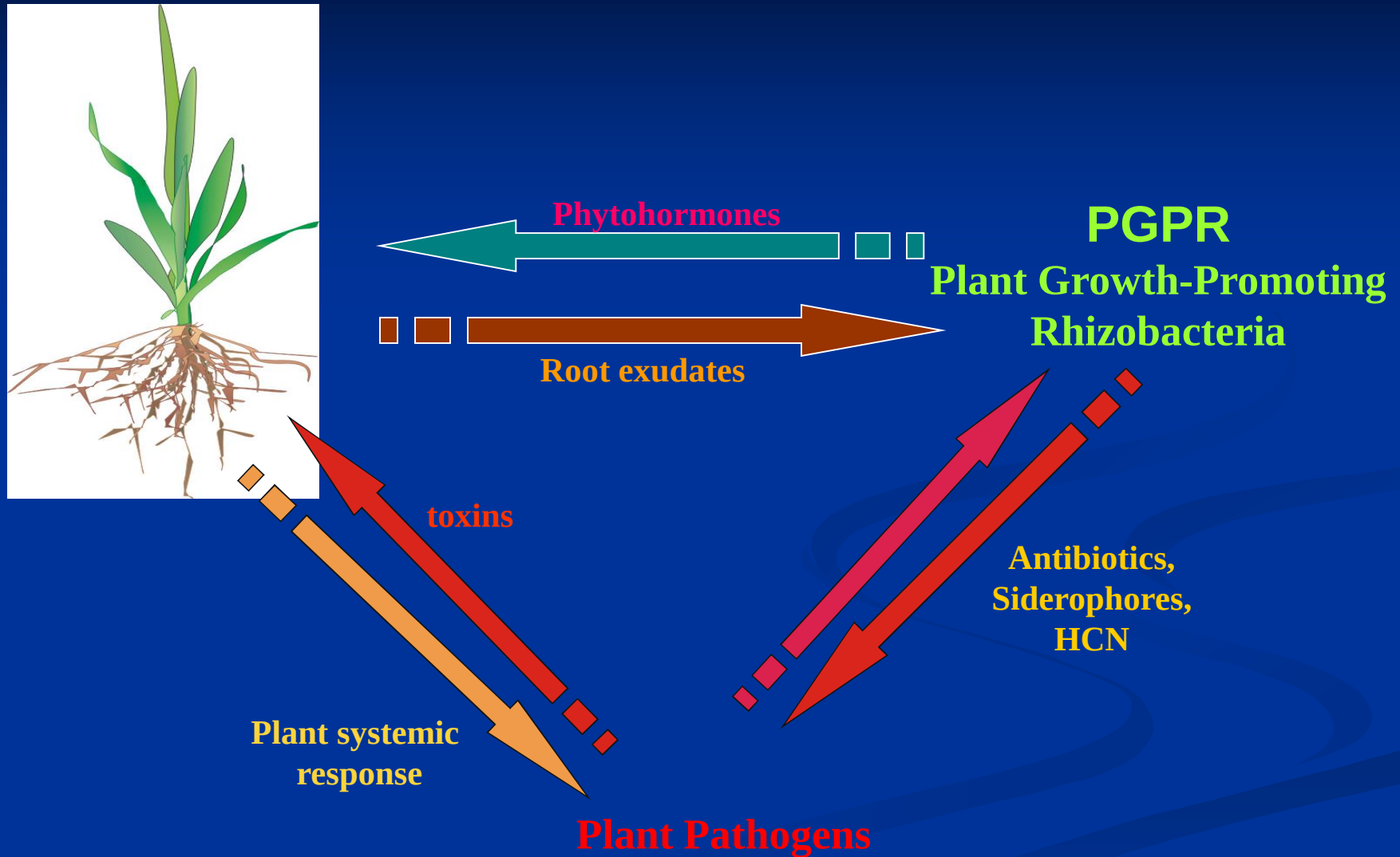


The plant rhizosphere.

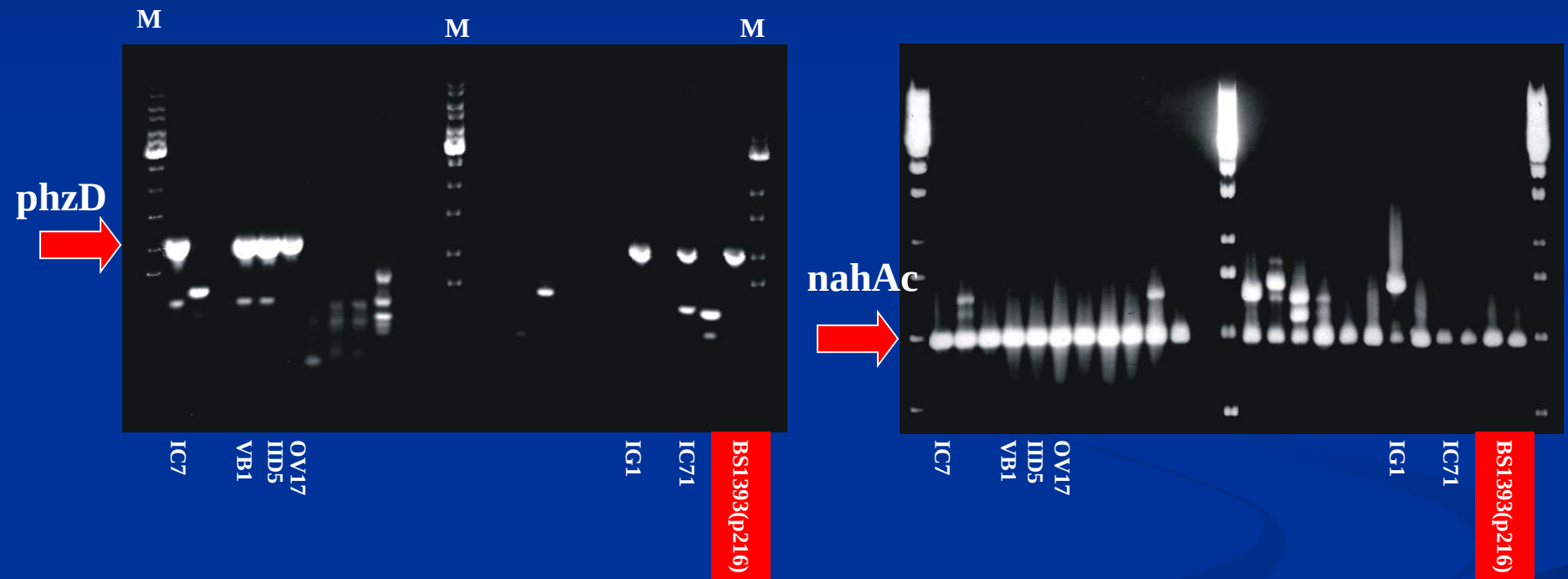
Reprinted with permission from

<http://www.nativeplantsalliance.net/graphics/>

Plant-Microbial Interactions in Rhizosphere | BPM



Natural rhizosphere strains combining both degradative abilities and plant growth promoting properties (PCR analysis)

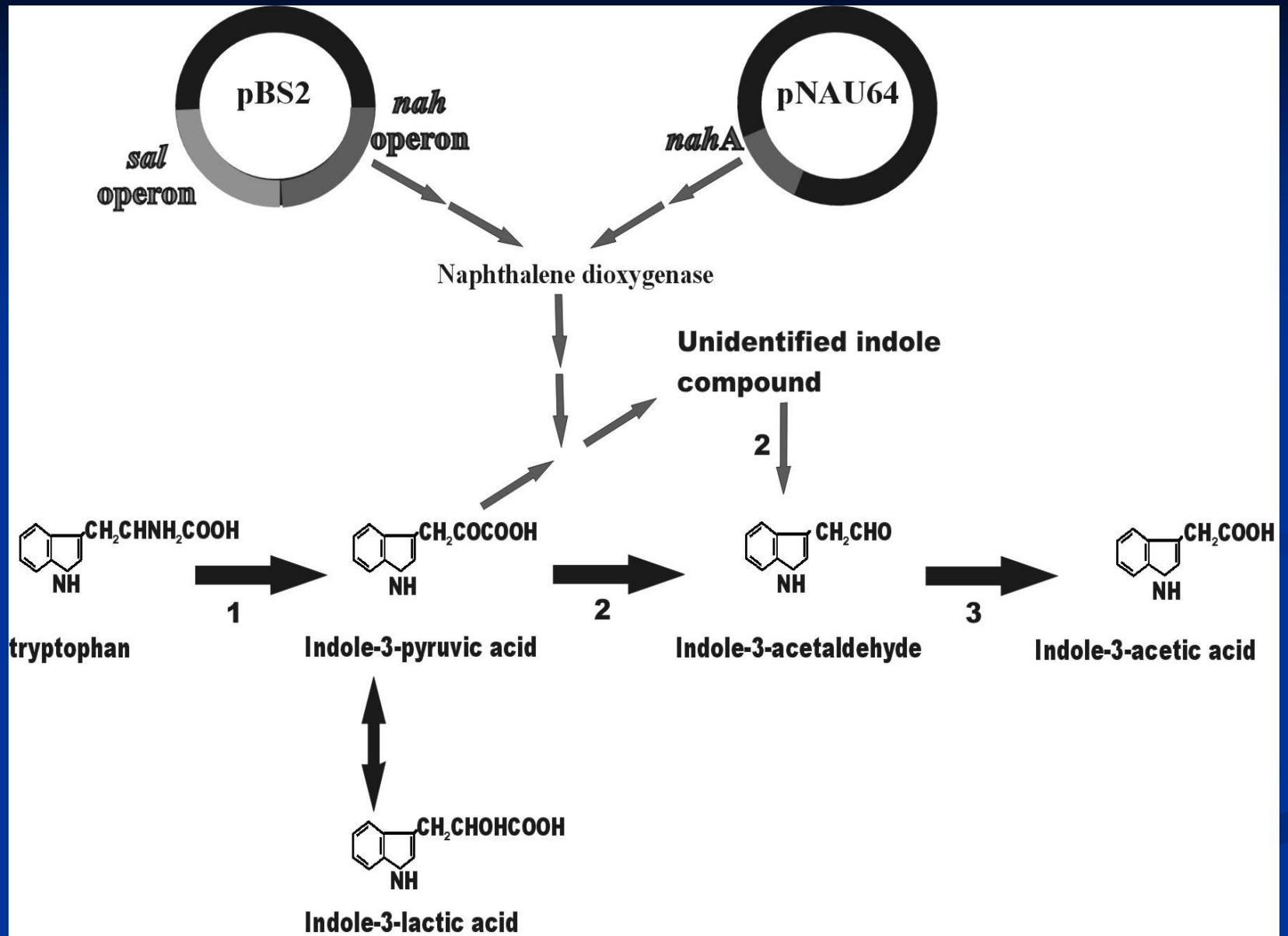


Strains harboring both phenazine antibiotic synthesis and polycyclic aromatic hydrocarbons degrading systems

Влияние плазмидосодержащих вариантов штамма *P. putida* 53a на рост растений в присутствии нафталина (1г/кг)

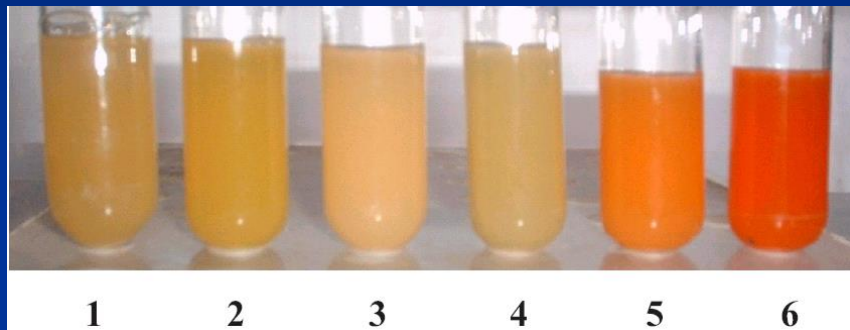


P. putida 53a 53a(pBS216) 53a(pOV17) 53a контроль

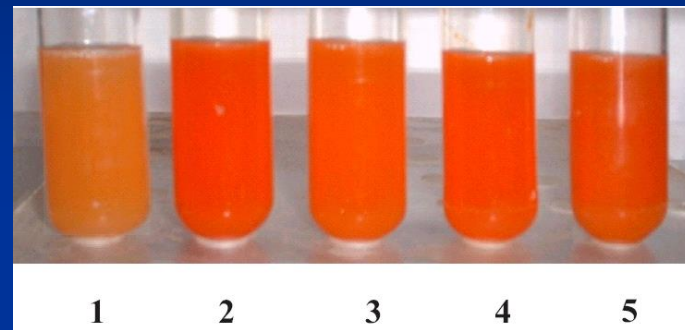


Involvement of naphthalene dioxygenase in the biosynthesis of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas putida*

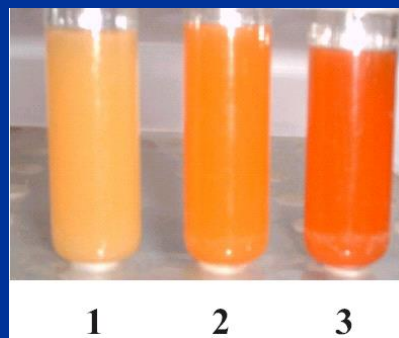
Влияние плазмид биодegradации на биосинтез феназиновых антибиотиков



1 – *P. fluorescence* 2-79, 2 – *P. fluorescence* 2-79(pBS216)
3 – *P. chlororaphis* PCL1391, 4 – *P. chlororaphis* PCL1391(pBS216)
5 – *P. aureofaciens* 1217, 6 – *P. aureofaciens* 1217(pBS216)



1 – *P. aureofaciens* BS1393, 2 – *P. aureofaciens* BS1393(NAH7), 3 – *P. aureofaciens* BS1393(pBS216),
4 – *P. aureofaciens* BS1393(pBS3), 5 – *P. aureofaciens* BS1393(SAL)



1 – бесплазмидный вариант штамма *P. aureofaciens* strain OV17,
2 – *P. aureofaciens* OV17(pOV17),
3 – *P. aureofaciens* OV17(pBS216)

Effect of seed bacterization on growth of winter rye



Pseudomonas aureofaciens **BS1393**



Control

Докладчик благодарит сотрудников лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН:

И.А. Кошелеву, Т.Ю. Измакову, Т.З. Есикову, О.И. Сизову, Т.О. Анохину, С.Л. Соколова, А.Б. Гафарова, А.Е. Филонова В.В. Кочеткова и др.,

усилиями которых получены изложенные в докладе данные.

Спасибо за внимание!