

Bacterial Plasmids in Fundamental and Applied Science

Внехромосомные генетические элементы у бактерий

A. M. Boronin

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS,
Pushchino State University, Pushchino, Russia.

Плазмиды

- **Плазмиды** - внехромосомные элементы наследственности, способные к автономной репликации.

Термин введен Ледербергом в 1952 году.

- **Эписомы** – генетические элементы, способные реплицироваться в двух альтернативных состояниях: в интегрированном в хромосому и независимо от хромосомы.
- **Конъюгативные плазмиды** – способны обеспечивать перенос ДНК путем конъюгации.
- **Неконъюгативные плазмиды** – не способны обеспечивать перенос ДНК путем конъюгации.
- **Мобилизуемые плазмиды** – способны передаваться в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид.
- **Криптические плазмиды** – плазмиды, фенотипические признаки для которых не установлены.

Плазмиды

- **F - плаزمида** – прототип “fertility factor” – ответственный за конъюгационный перенос в штаммах *E. coli*.
- **F’ – плазмида** – дериват F – плазмиды, содержащий сегменты бактериальной хромосомы.
- **Hfr – штаммы** – (high frequency of recombination) – штамм, несущий в составе хромосомы плазмиду и, следовательно, способный осуществлять ориентированный перенос хромосомных генов в подходящий реципиент.
- **R – плазмиды**
- **RTF – фактор** – часть плазмиды резистентности, способная осуществлять конъюгационный перенос генов резистентности.

Плазмиды

- Структура - кольцевые или линейные молекулы ДНК размером от 2 до 600 т.п.н.
- Число копий – от 1 до 1000 (малокопийные и мультикопийные)
- Круг хозяев – узкий круг (**nhr** – narrow host range), широкий круг хозяев (**bhr** – broad host range)
- Способность к конъюгационному переносу (конъюгативные, неконъюгативные, мобилизуемые)
- Группы несовместимости (**Inc** – incompatibility):
 - 14 групп в системе *Pseudomonas* (IncP-1 – IncP-14)
 - 30 групп в системе *Enterobacteriaceae*

Плазмиды

- Контролируемый фенотип:
 - Устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам. R – плазмиды (resistance).
 - Деградация органических соединений. D – плазмиды (degradative)
 - Конъюгационный перенос. F – factor (fertility)
 - Продукция токсических соединений (антибиотики, бактериоцины, колицины). ColE1 – плазида (colicin)
 - Криптические плазмиды (фенотип неизвестен и плазмиды малого размера)
 - Взаимодействие с эукариотами. Ti – плазмиды (tumor inducing)
 - Другие свойства – устойчивость к UV, продукция H₂S, чувствительность к NaCl, системы рестрикции – модификации, фиксация азота.

Плазмиды

- **Конъюгация** – процесс обмена генетической информацией между бактериальными клетками, обеспечиваемый плазмидами, путем переноса генетического материала из клетки донора в клетку реципиента.
- **Транskonъюгант** – бактериальная клетка, получившая генетический материал путем конъюгации.
- **Поверхностное исключение** – конъюгационный перенос между плазмидосодержащими клетками происходит с меньшей на 2 порядка эффективностью, чем между донором и бесплазмидной клеткой. За этот эффект отвечают гены *tra* – системы (*traS* и *traT*).
- **Несовместимость плазмид (Inc)** – неспособность двух разных плазмид стабильно сосуществовать в одной бактериальной клетке.
- **Донор – специфические фаги** – фаги, инфицирующие только те штаммы, которые содержат конъюгативные плазмиды.
- **Число копий плазмиды** – количество молекул плазмиды на бактериальный геном.
- **Строгий контроль репликации** – плазмидная репликация связана с репликацией хромосомы.

Обозначение плазмид

- Префикс “p”
- «Исторические» обозначения:
 - RSF1010, R100, NAH7.
- R100 фенотип – Tc Cm Sm Su Tra
- Генотип – $tet^+ cat^+ aadA^+ sul^+ tra^+$

Молекулярная организация плазмид

- Базовый репликон (basic replicon):
 - *ori* (origin)
 - *inc/cop* - ген (ы)
 - *rep* – ген
- Жизненно – важные структуры плазмиды (backbone segment)
 - система разрешения коинтегратов (*mrs* - multimer resolution system),
 - система активного распределения плазмид (*par* – partitioning),
 - система постсегрегационной гибели клетки (PSK – post segregational killing).
 - система рестрикции – модификации (RM).
- Система конъюгационного переноса.
- Гены резистентности.
- Гены биодegradации.
- Другие гены.

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-xylenol	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	–

Incompatibility Groups of Pseudomonas Degradative Plasmids

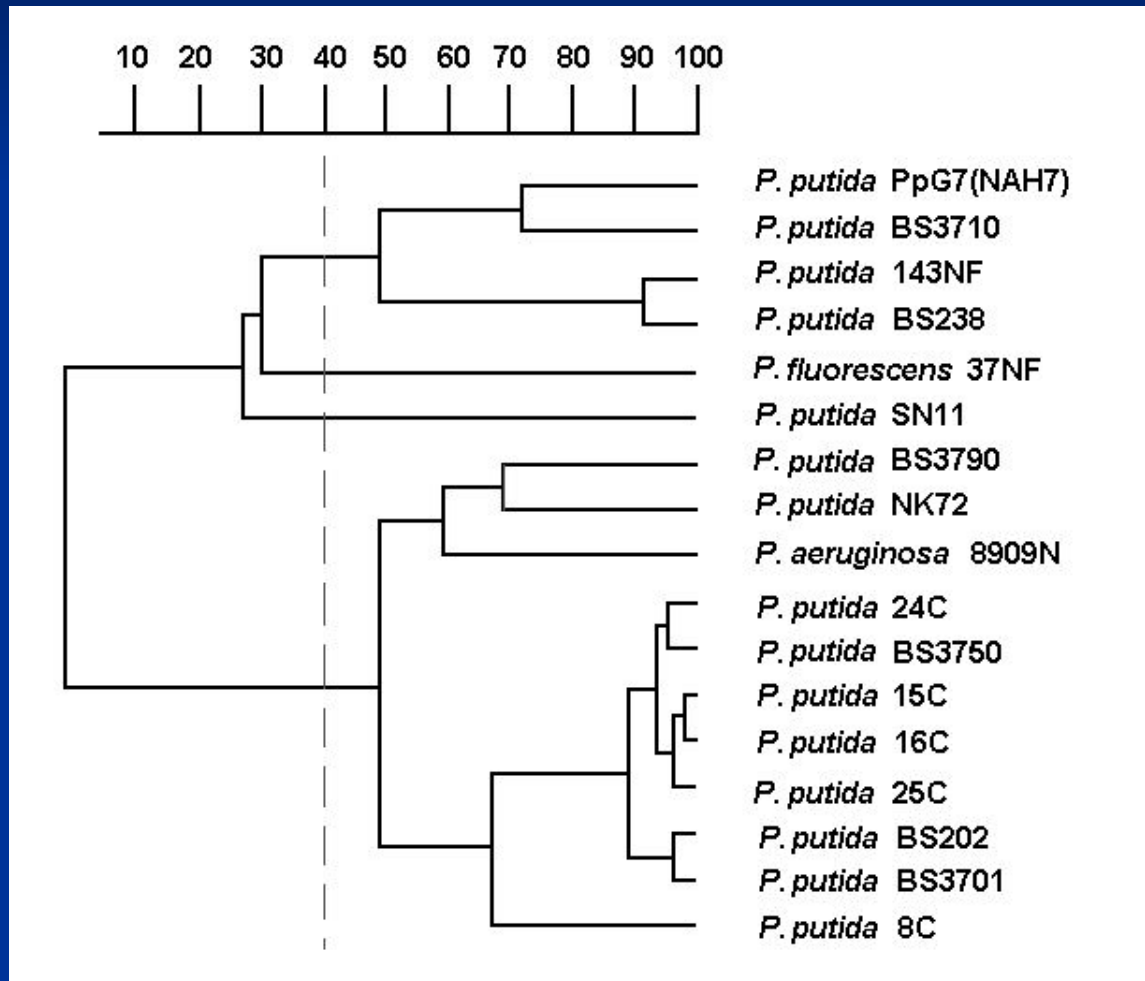
Incompatibility group	Plasmid	Substrate
P2	CAM	Camphor
	OCT	Octane
	pBS263, pBS264 pBS266, pBS271	ϵ -Caprolactam, ϵ -Aminocaproic acid
P7	pBS2, pBS3, pBS211, pBS213, pBS214, pBS217, pBS243, pBS4	Naphthalene
	pND50	<i>p</i> -Cresol
P9	NAH7, pND140, pND160, pWW60, NPL-1, NPL-41, pBS212, pBS216, pBS240, pBS244, pBS248, pBS2	Naphthalene
	pBS262, pBS265, pBS267, pBS268	ϵ -Caprolactam, ϵ -Aminocaproic acid
	pBS1004	<i>p</i> -Toluenesulfonic acid

Plasmids Encoding the Degradation of Naphthalene

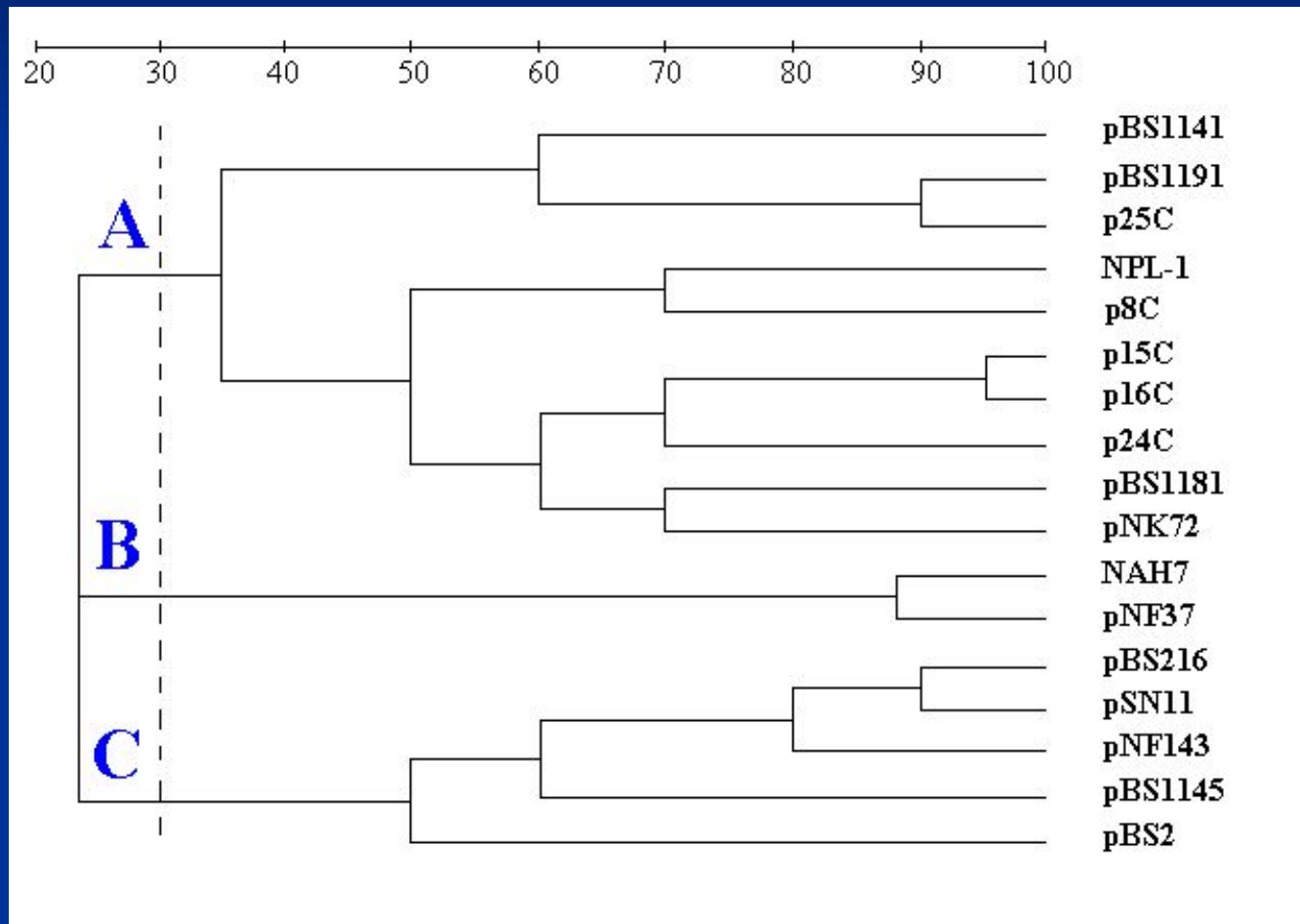
Plasmid	Properties	Incompatibility group	Transfer to <i>P.putida</i> frequency	Size (kb)
NPL-1	Nah ⁺	IncP-9β	10 ⁻³	100
pBS2	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7/9β	10 ⁻⁴	130
pBS101	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-7	10 ⁻³	50
pBS240	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9β	10 ⁻⁴	160
pBS216	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9δ	10 ⁻³	85
pOV17	Nah ⁺ Sal ⁺	IncP-9δ	10 ⁻⁴	85
pBS243	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.

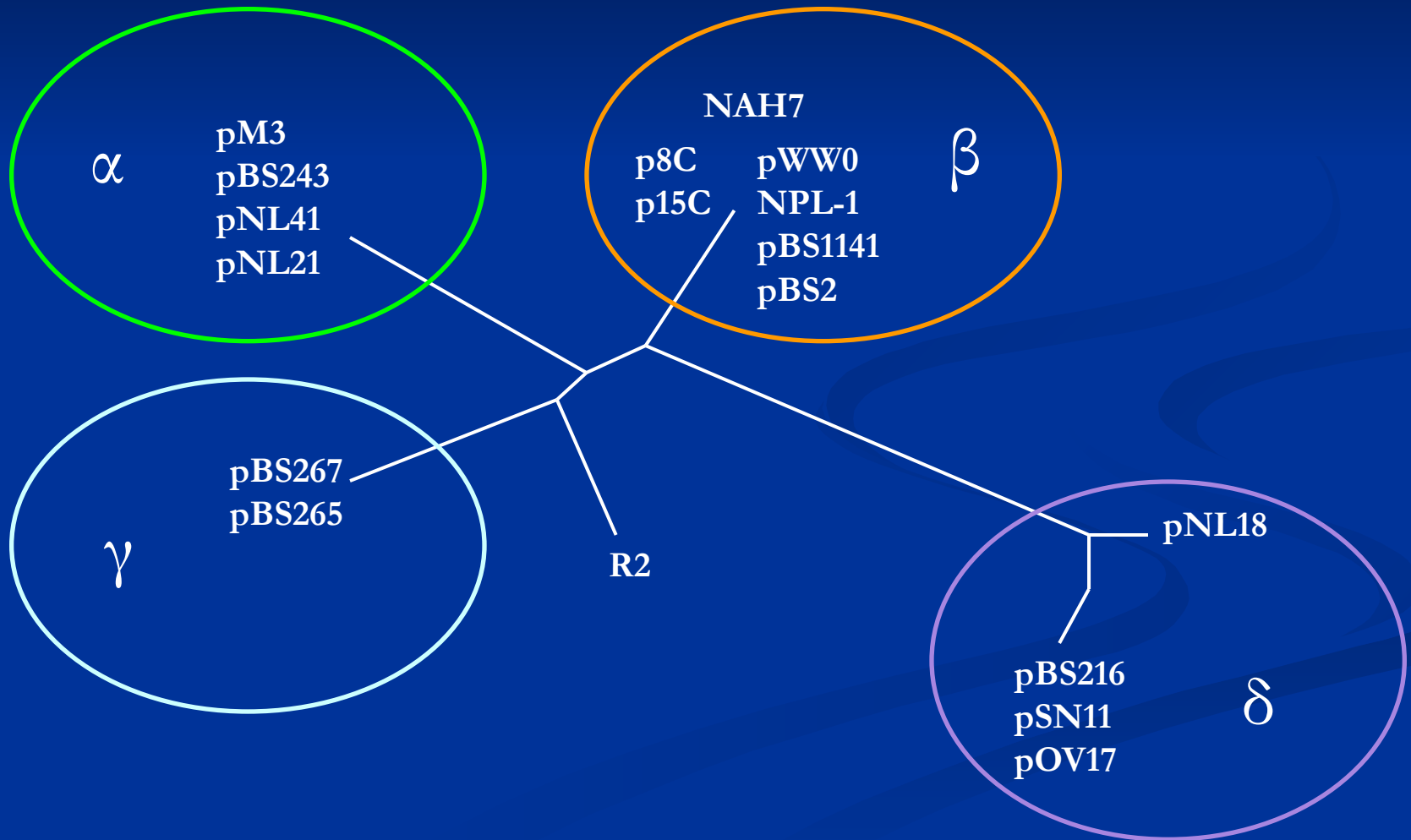
Diversity of *Pseudomonas* Strains Harboring IncP-9 Plasmids on the Basis of REP-PCR



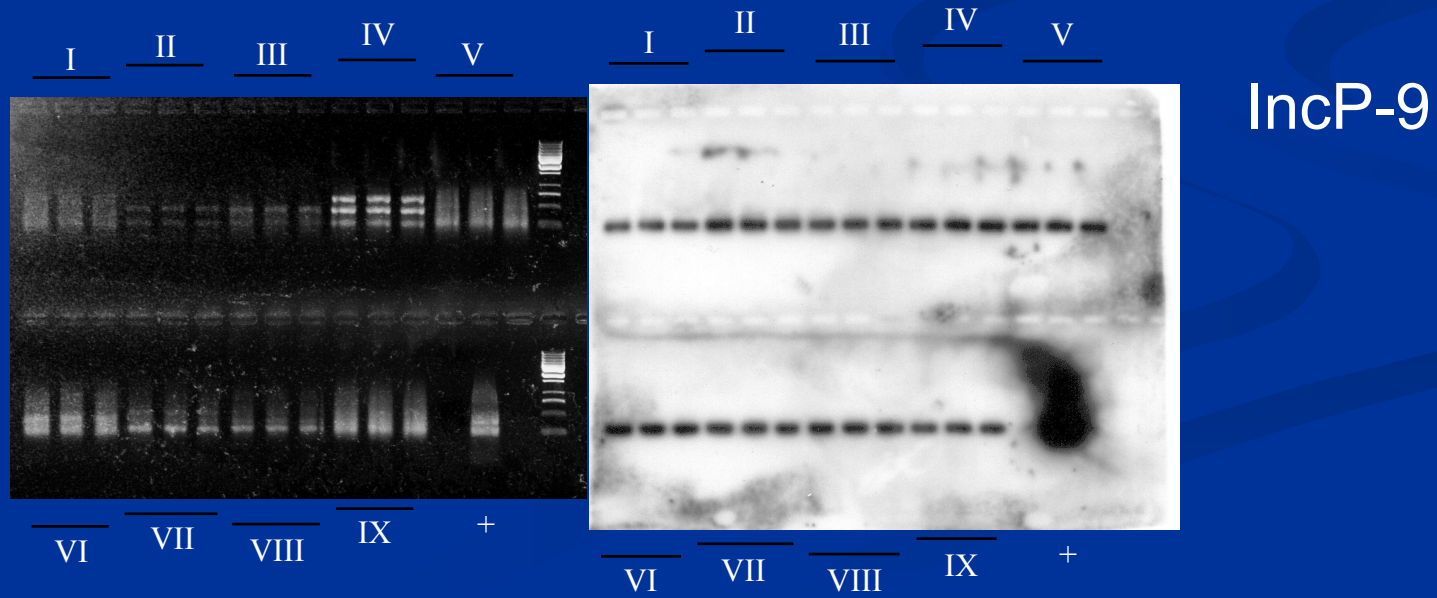
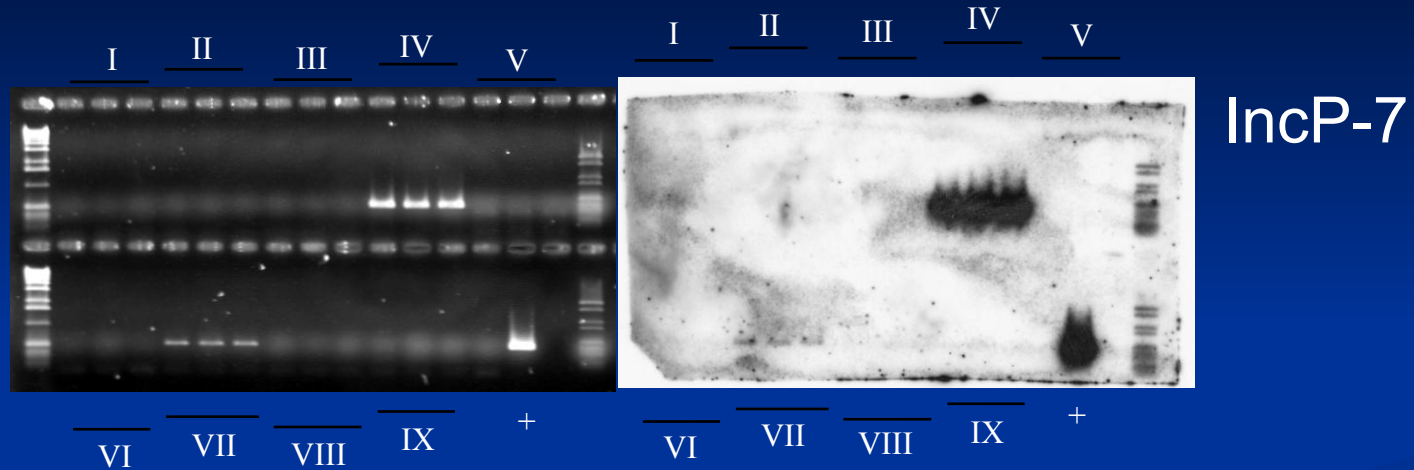
Diversity of the Naphthalene Catabolic Plasmids Belonging to IncP-9 Group on the Basis of RFLP Analysis



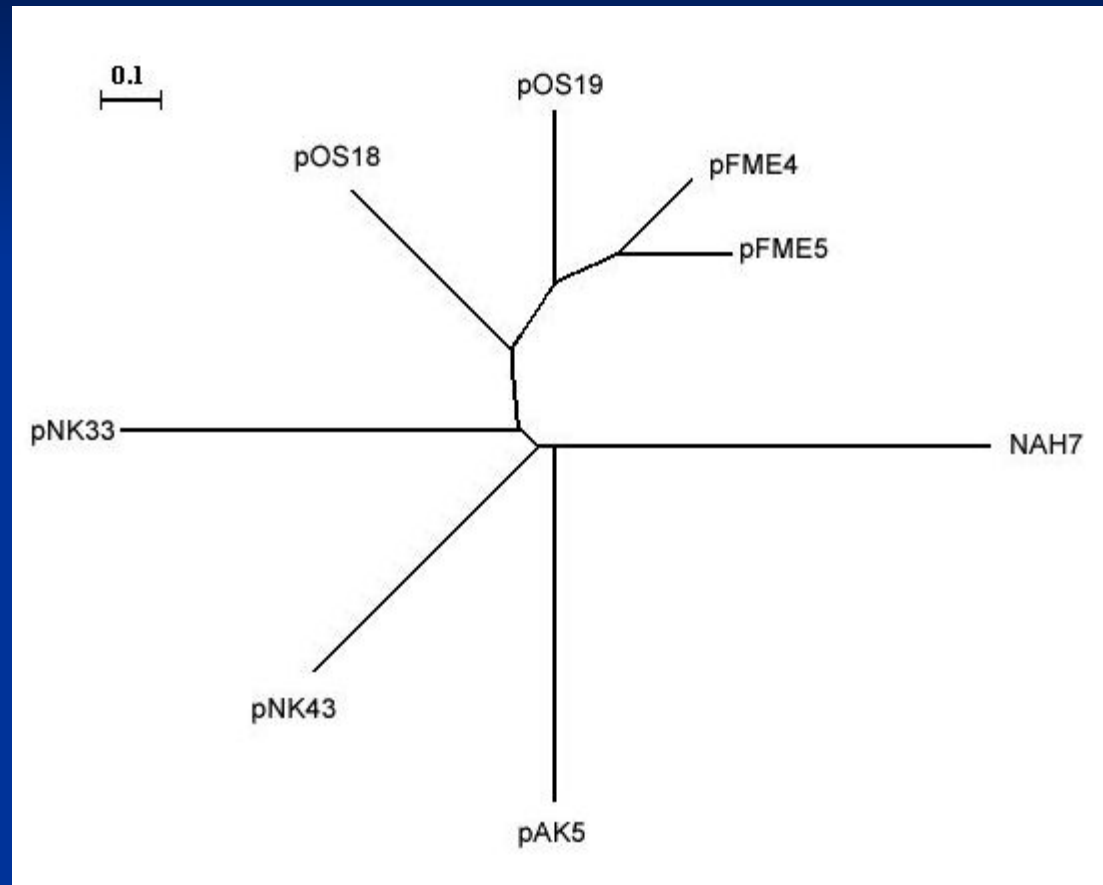
Phylogenetic Tree of IncP-9 Plasmid Group Created on the Basis of rep-Gene Sequences



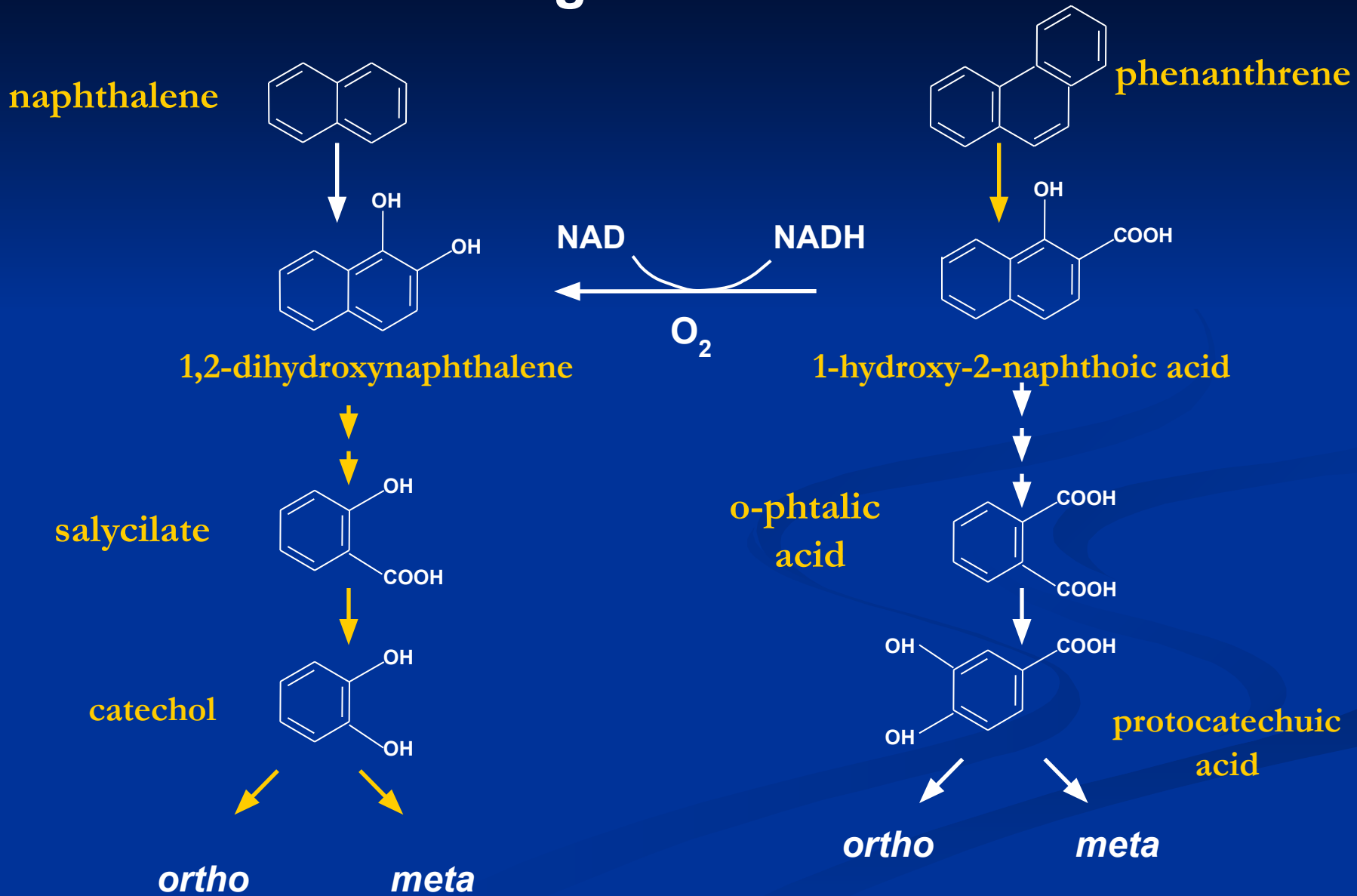
PCR and Blots of Total Soil DNA with DIG-labeled *rep*-genes



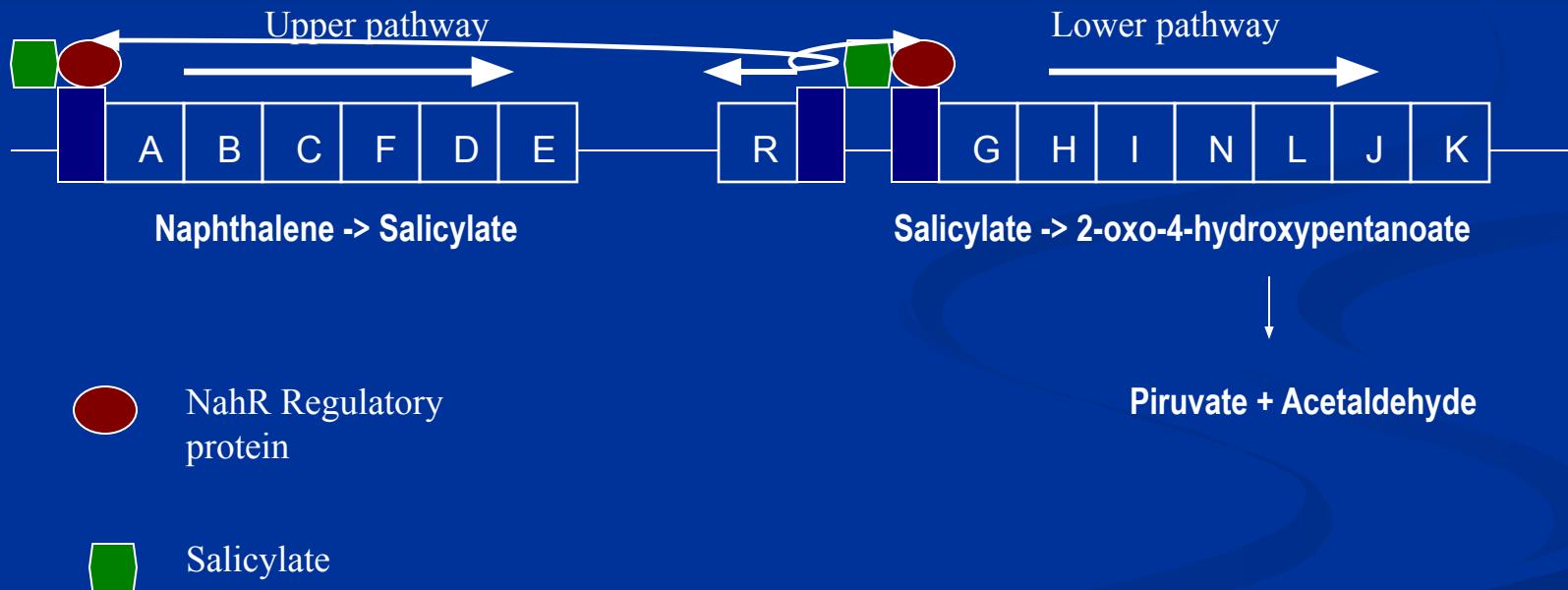
Phylogenetic Tree of IncP-7 Naphthalene Degrading Plasmids Based on RFLP



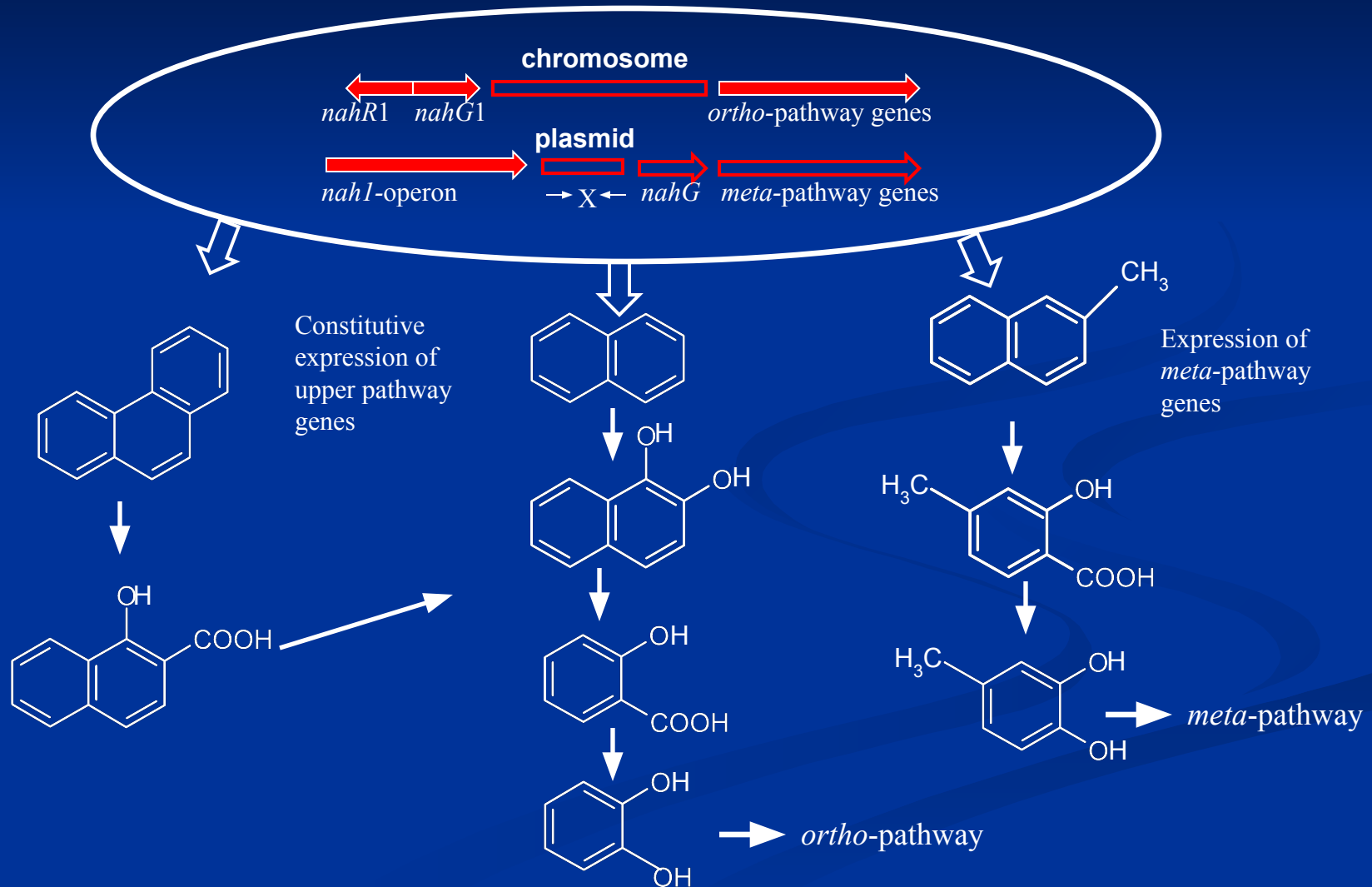
Pathways of Naphthalene and Phenanthrene Degradation



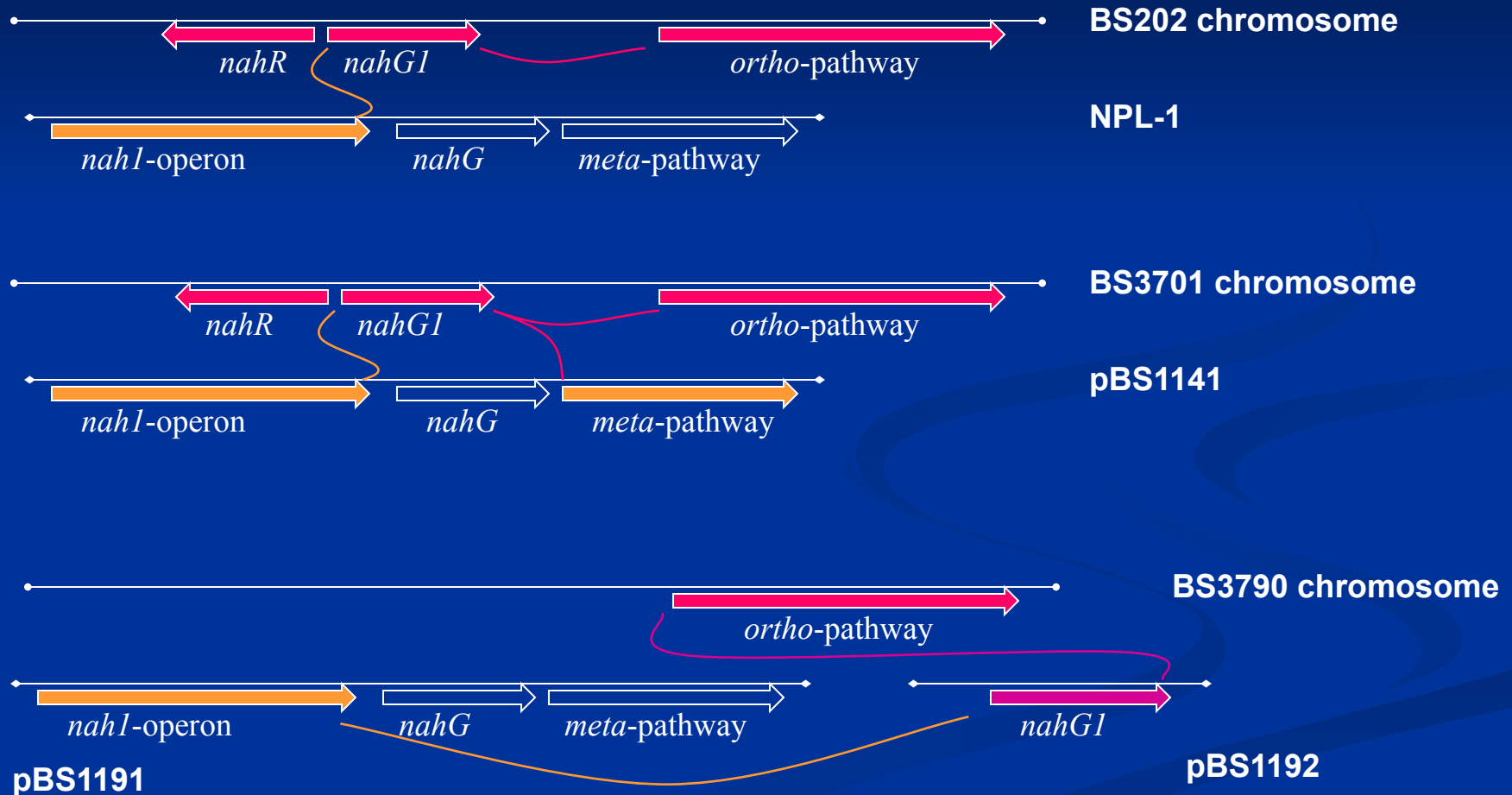
NAH Catabolic Gene Organization and Regulation



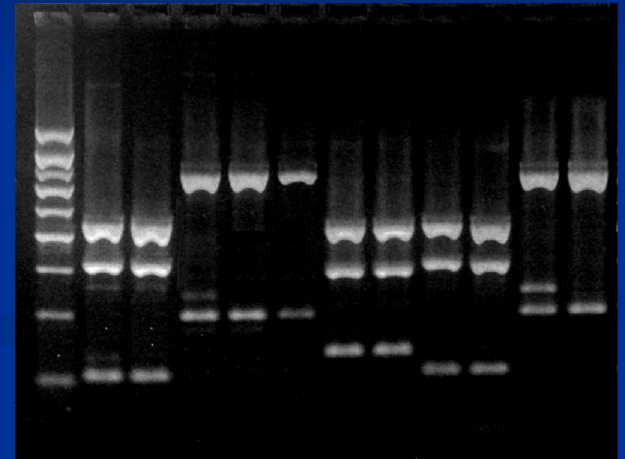
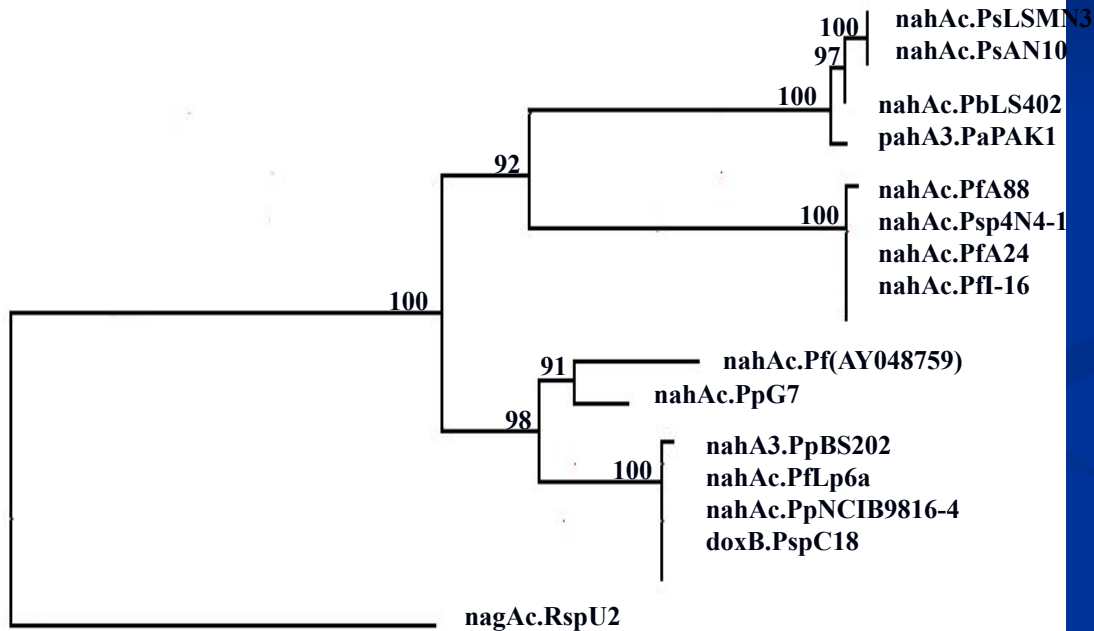
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Biodegradation by *P. putida* BS202



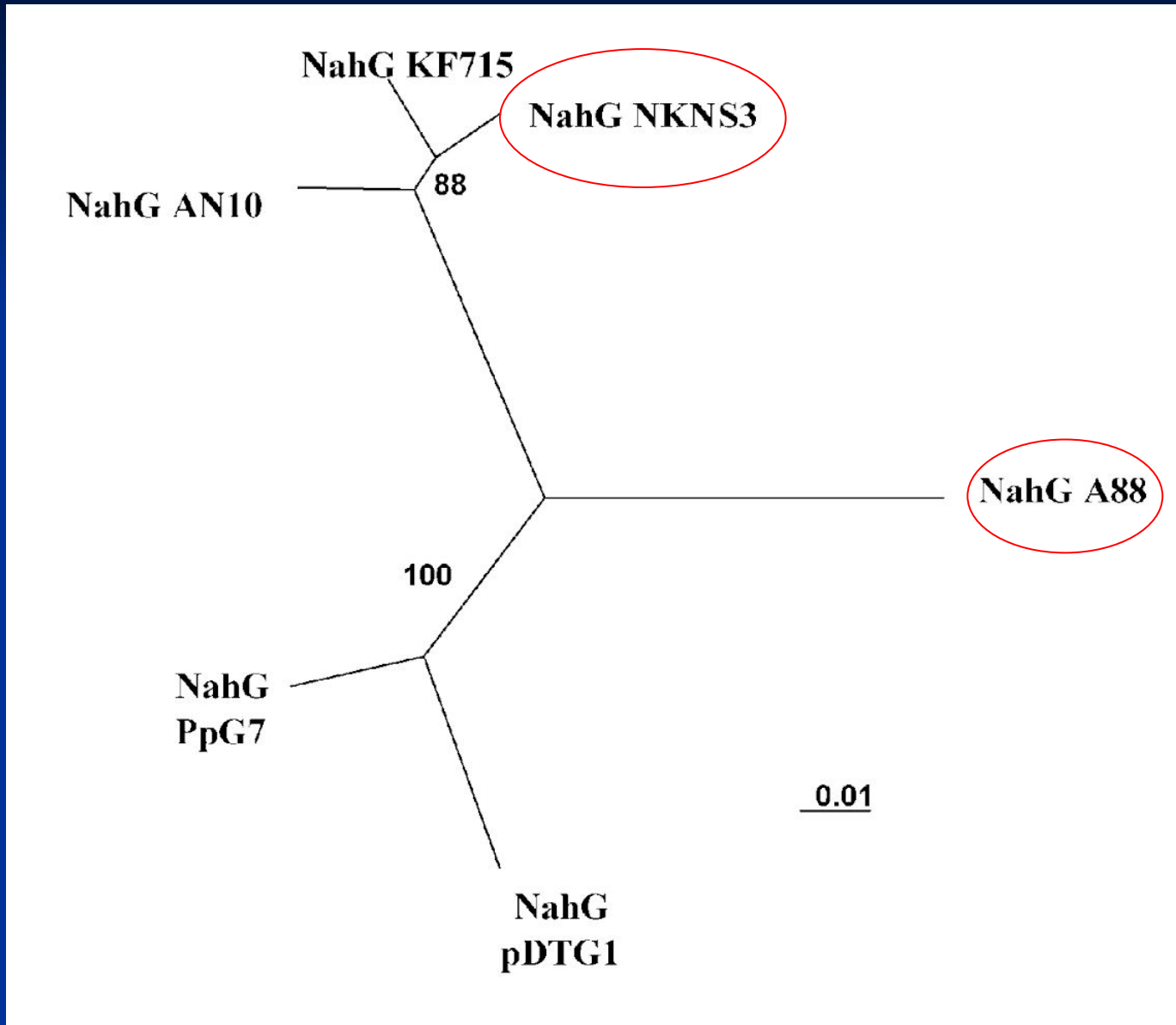
Organization of PAH catabolic genes in some *Pseudomonas putida* strains



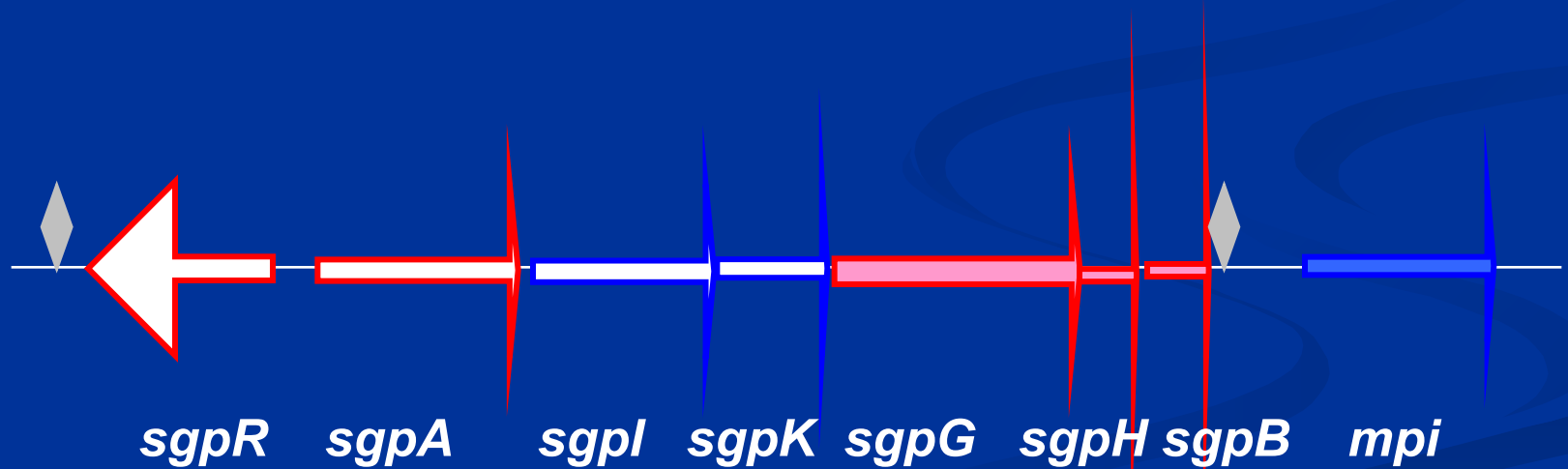
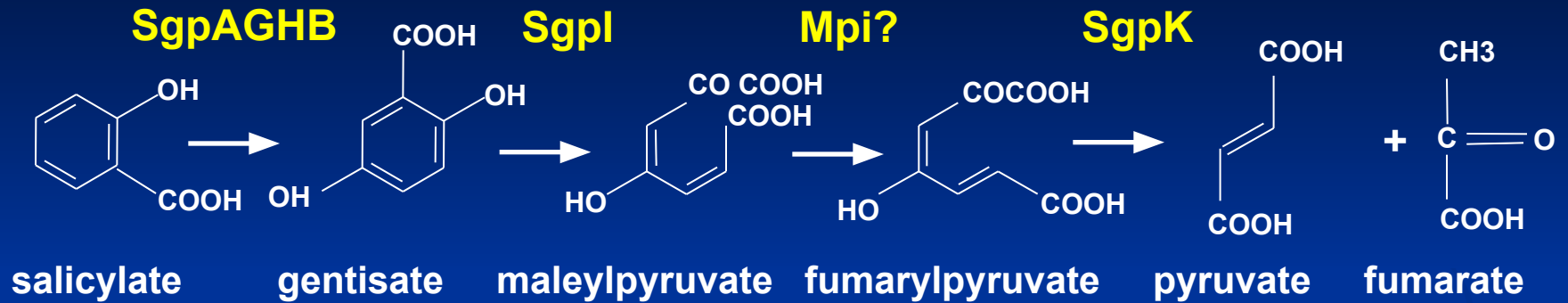
Diversity of *Pseudomonas nahAc* genes (RFLP analysis)



Distance Tree of Classic NahG Subtypes Based on Cluster Analysis of AA Sequences

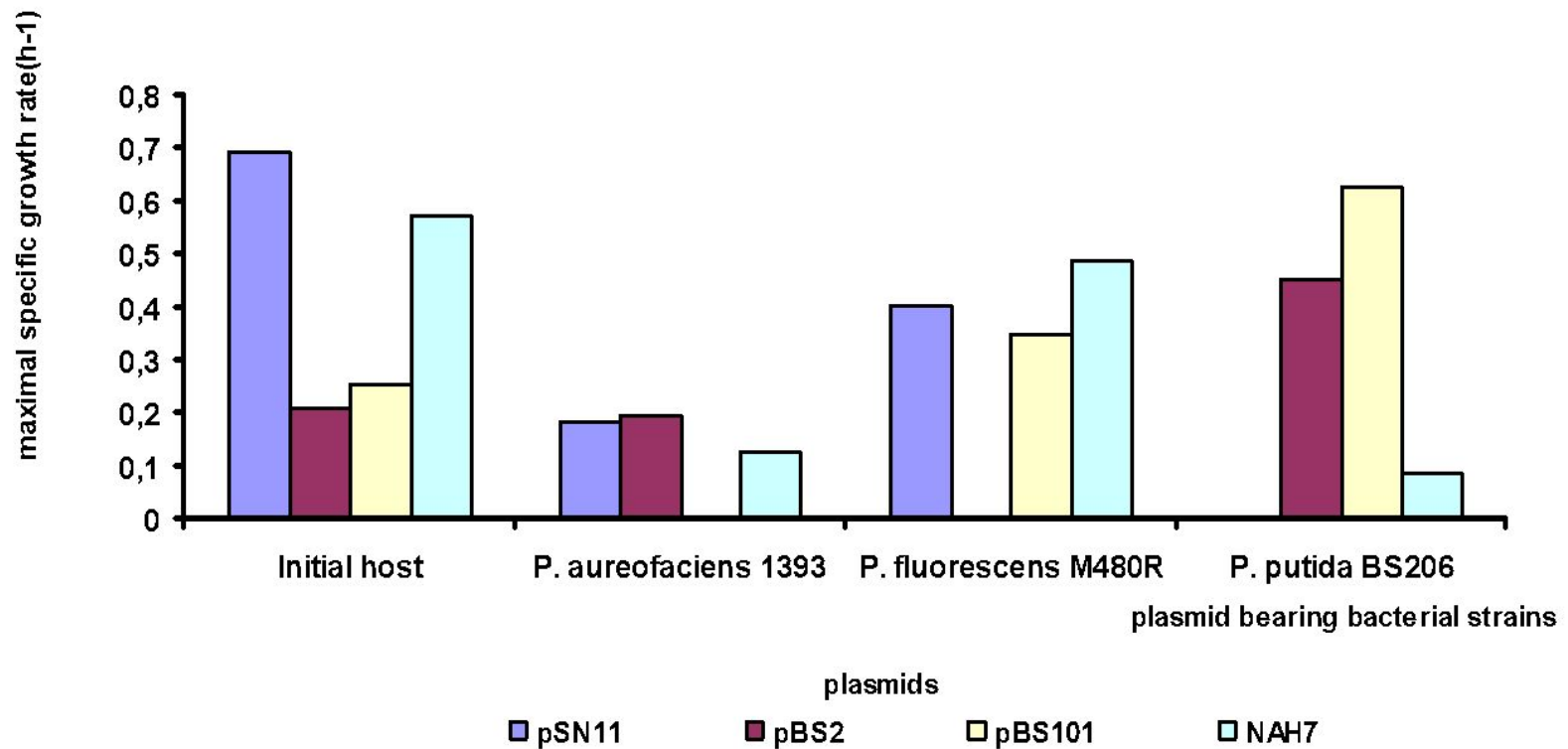


P. putida AK5 newly described Salicylate Degradation Pathway

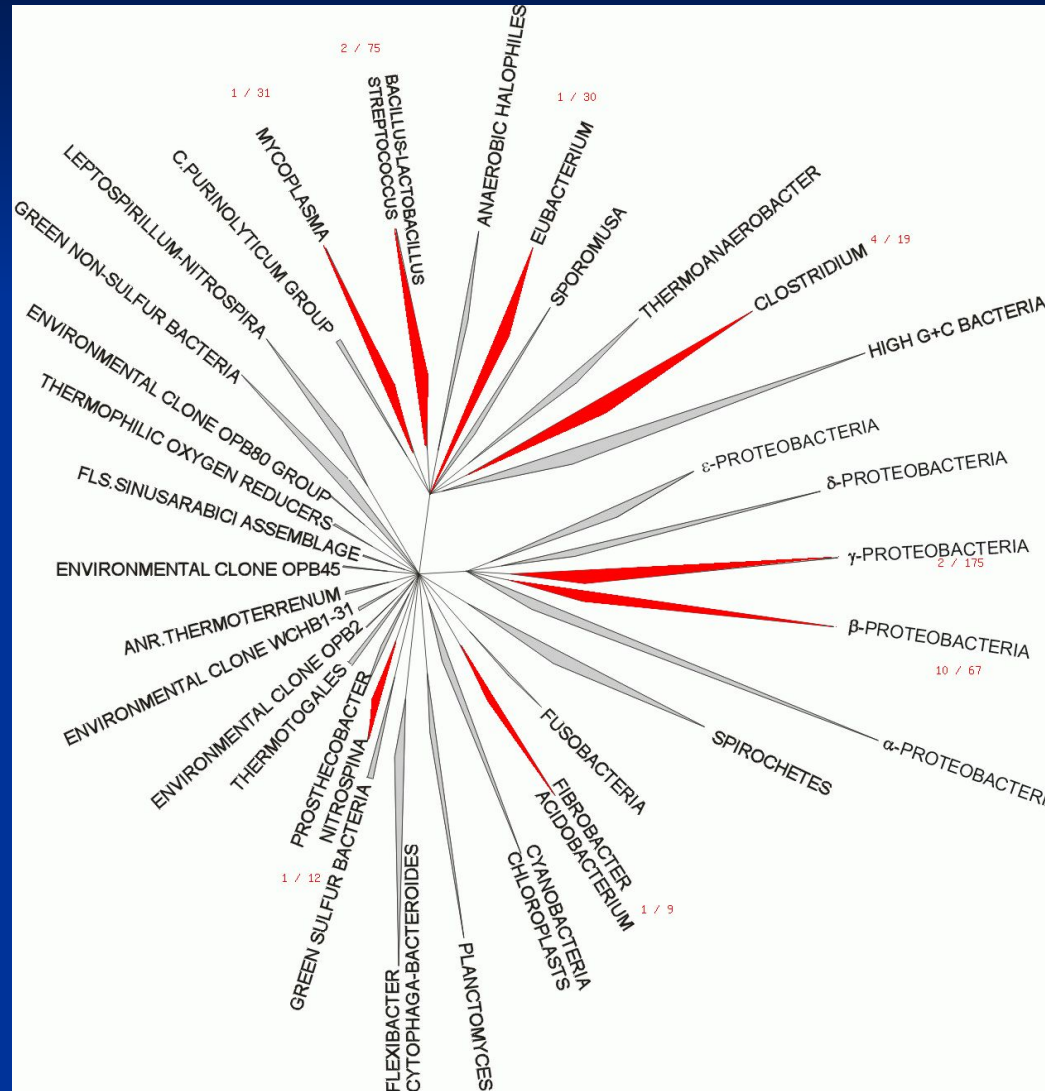


- Is there a degradative (D) “superplasmid” capable of determining the most efficient degradation of a particular organic compound?
- Is there a bacterium which is the optimal host for that plasmid from the viewpoint of the expression of degradative genes?
- Is there an “ideal” combination of a D-plasmid and a bacterial host?

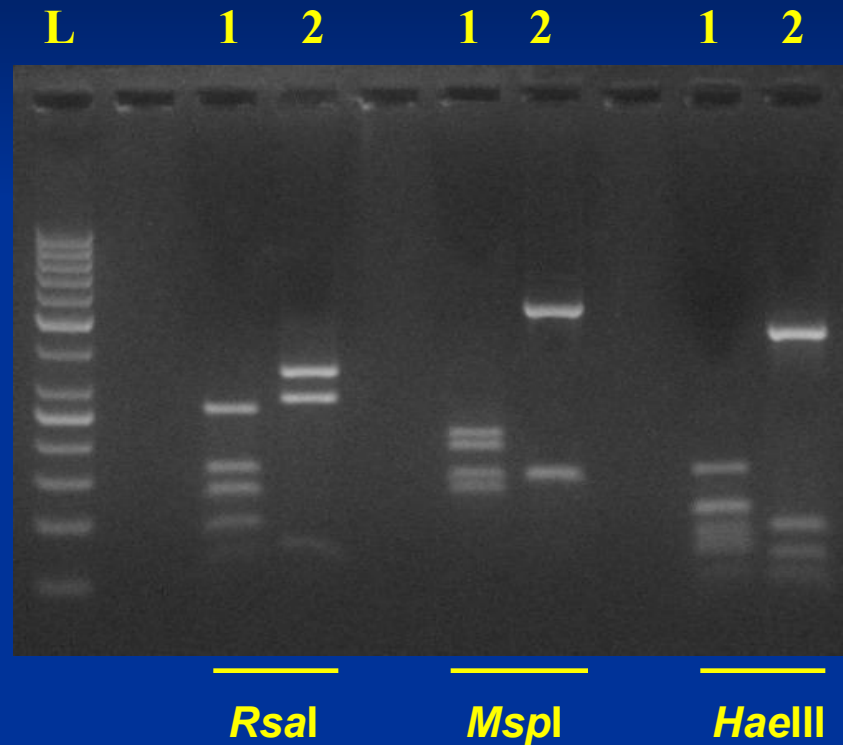
Specific Growth Rates of Plasmid Bearing Bacterial Strains in Batch Culture on Naphthalene



Diversity of Microorganisms from Oil Slimes



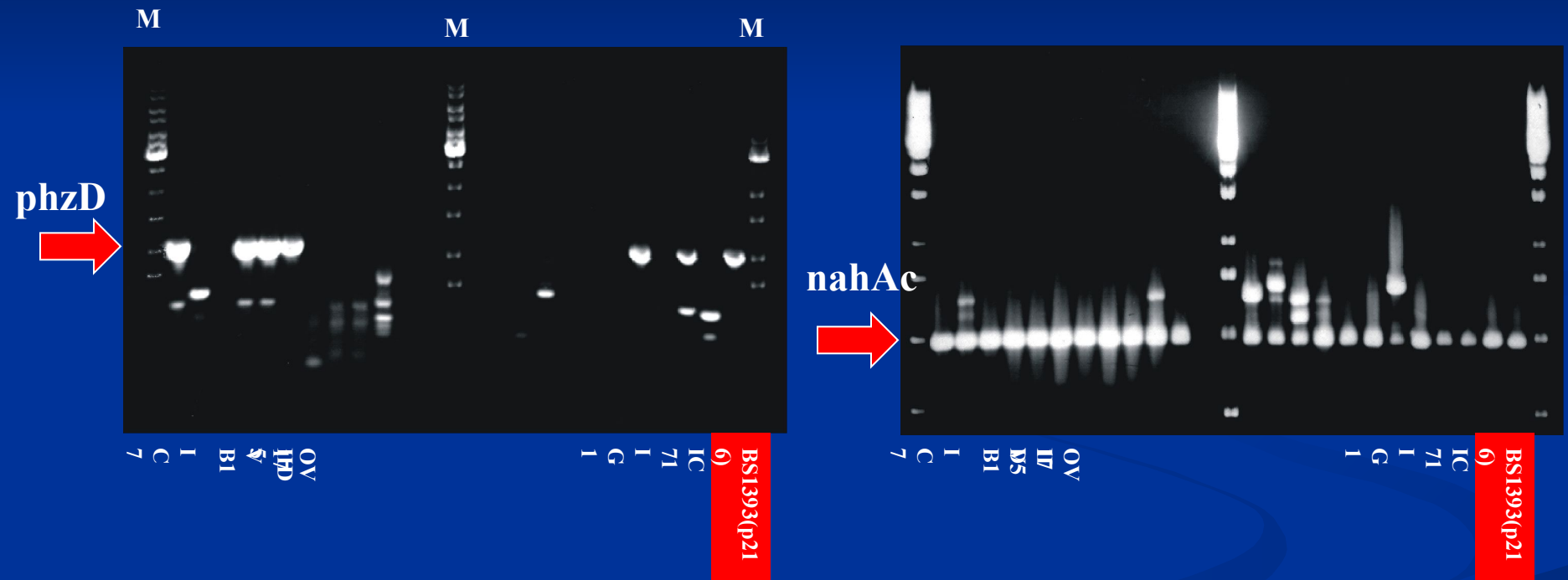
Two *nahU* Gene (salicylate hydroxylase) Subtypes Restriction Patterns



L – 50bp Ladder (“Fermentas”)

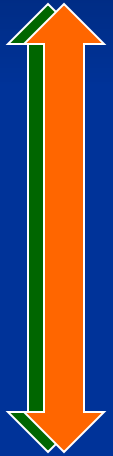
1 - *P. putida* g20f, 2 - *P. putida* NS12 (ND6 subtype).

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

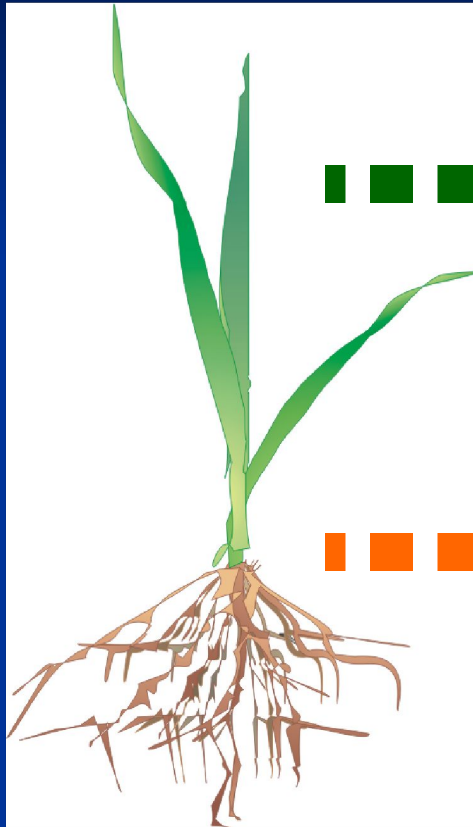


Strains harboring both phenazine antibiotic synthesis and polycyclic aromatic hydrocarbons degrading systems

Plant



Rhizosphere
bacteria
Pseudomonas



PHYTOREMEDIATION



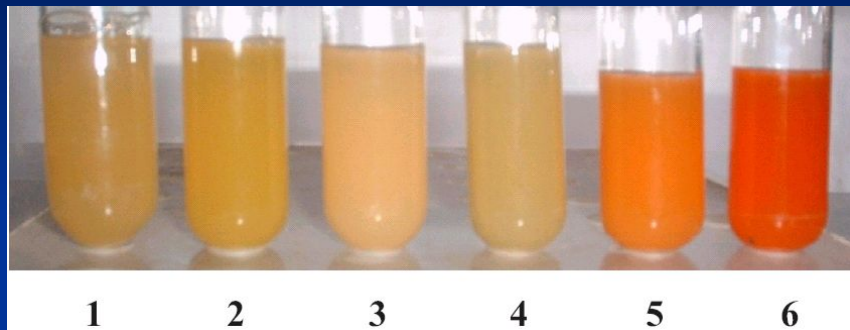
ACCUMULATION
OF POLLUTANTS

BIOREMEDIATION

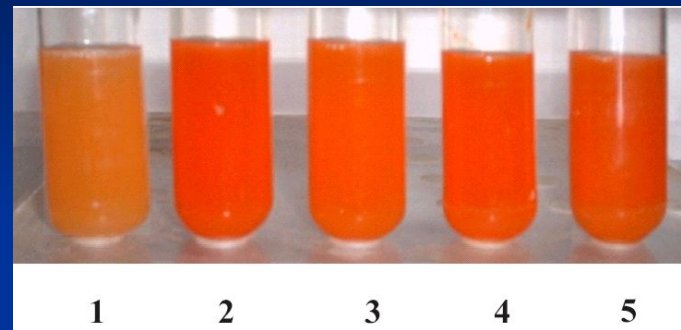


DEGRADATION
OF TOXIC
ORGANIC
COMPOUNDS

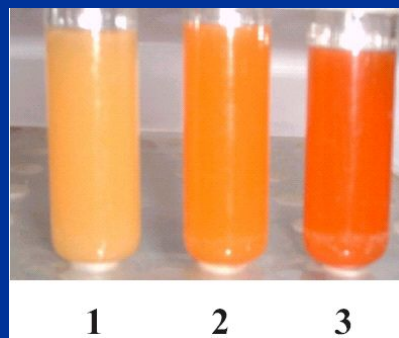
Effect of naphthalene degradative plasmids on biosynthesis of phenazine antibiotics by PGPR *Pseudomonas*



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

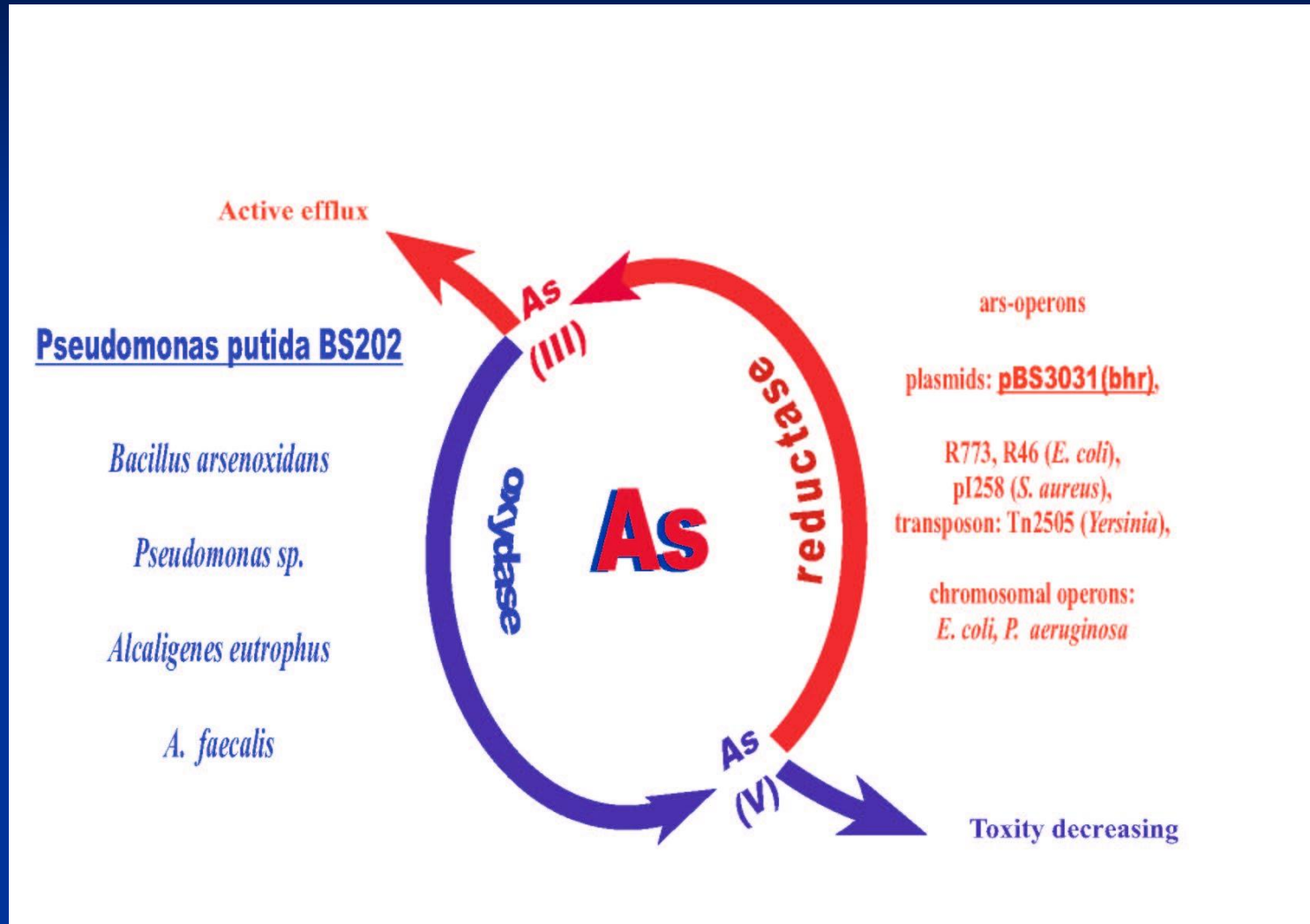


1 - *P. aureofaciens* BS1393, 2 - *P. aureofaciens*
BS1393(NAH7), 3 - *P. aureofaciens*
BS1393(pBS216), 4 - *P. aureofaciens*
BS1393(pBS3), 5 - *P. aureofaciens* BS1393(SAL)

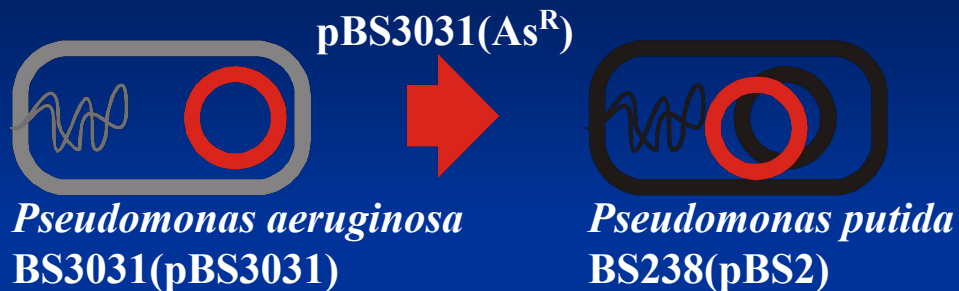


1 – plasmid less variant of the
P. aureofaciens strain OV17,
2 - *P. aureofaciens*
OV17(pOV17),
3 - *P. aureofaciens*
OV17(pBS216)

Mechanisms of arsenic resistance in microorganisms



COMBINATION OF ABILITY TO UTILIZE POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND RESISTANCE TO ARSENIC COMPOUNDS



Growth on naphthalene



■ *Pseudomonas putida* BS238(pBS2)

■ *Pseudomonas putida* BS238(pBS2+pBS3031)

Oil Contamination in Western Siberia



The view of
oil-contaminated site.

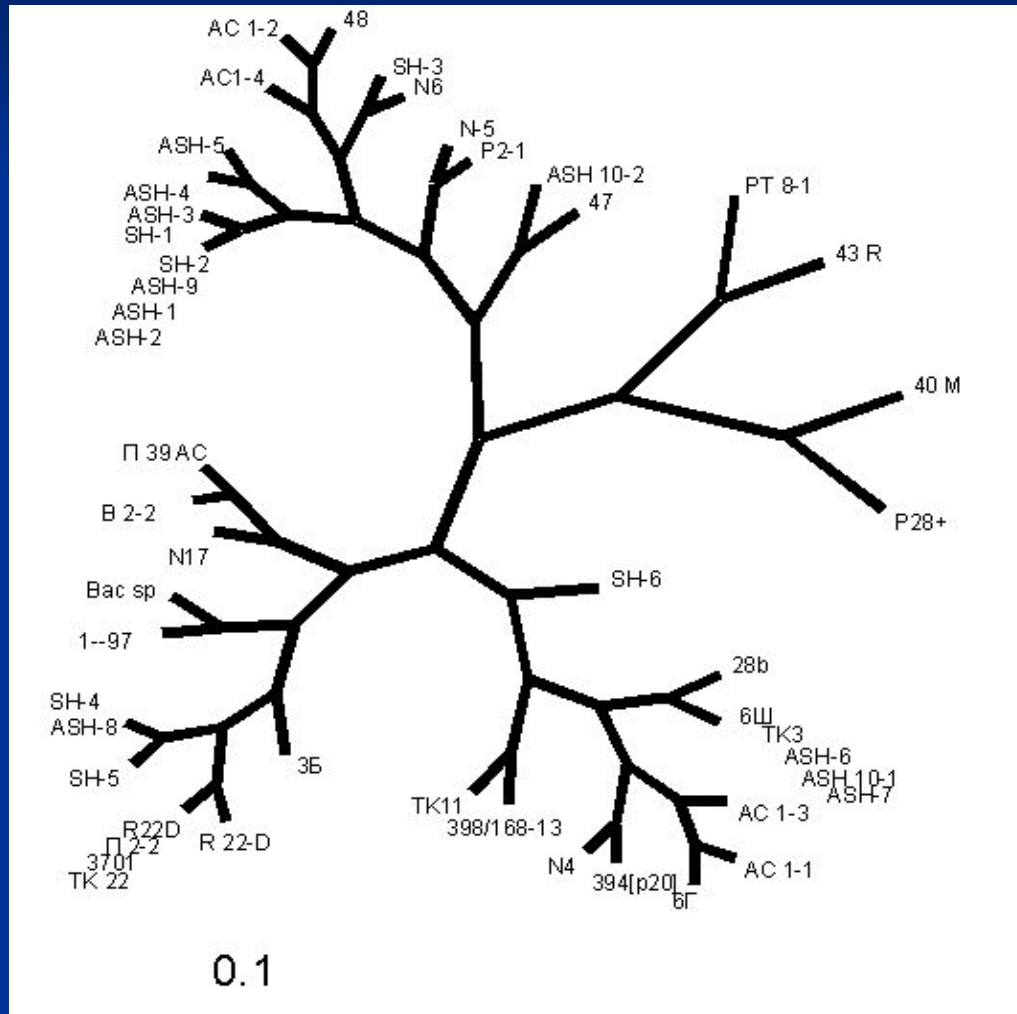
July, 1999.

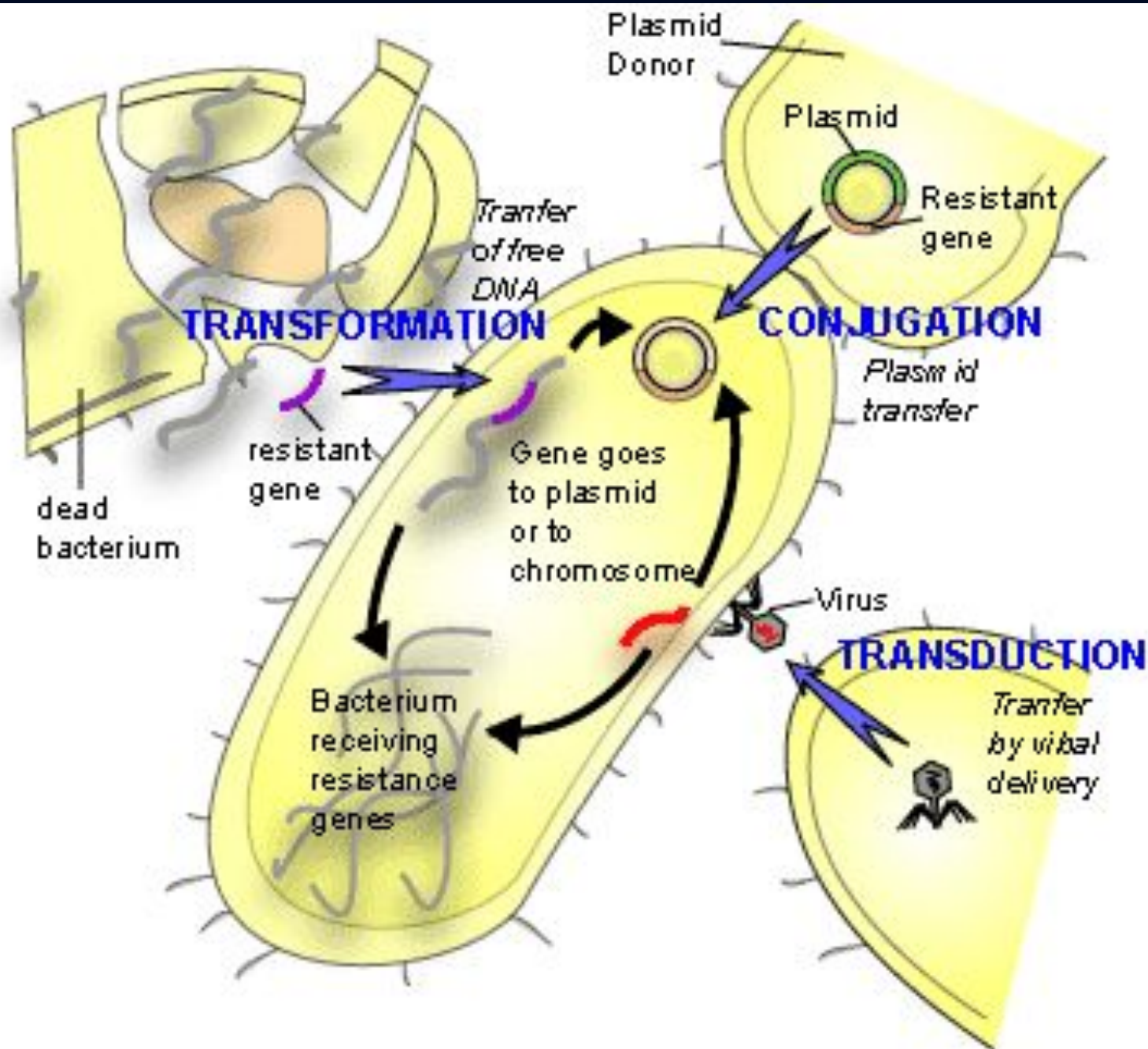


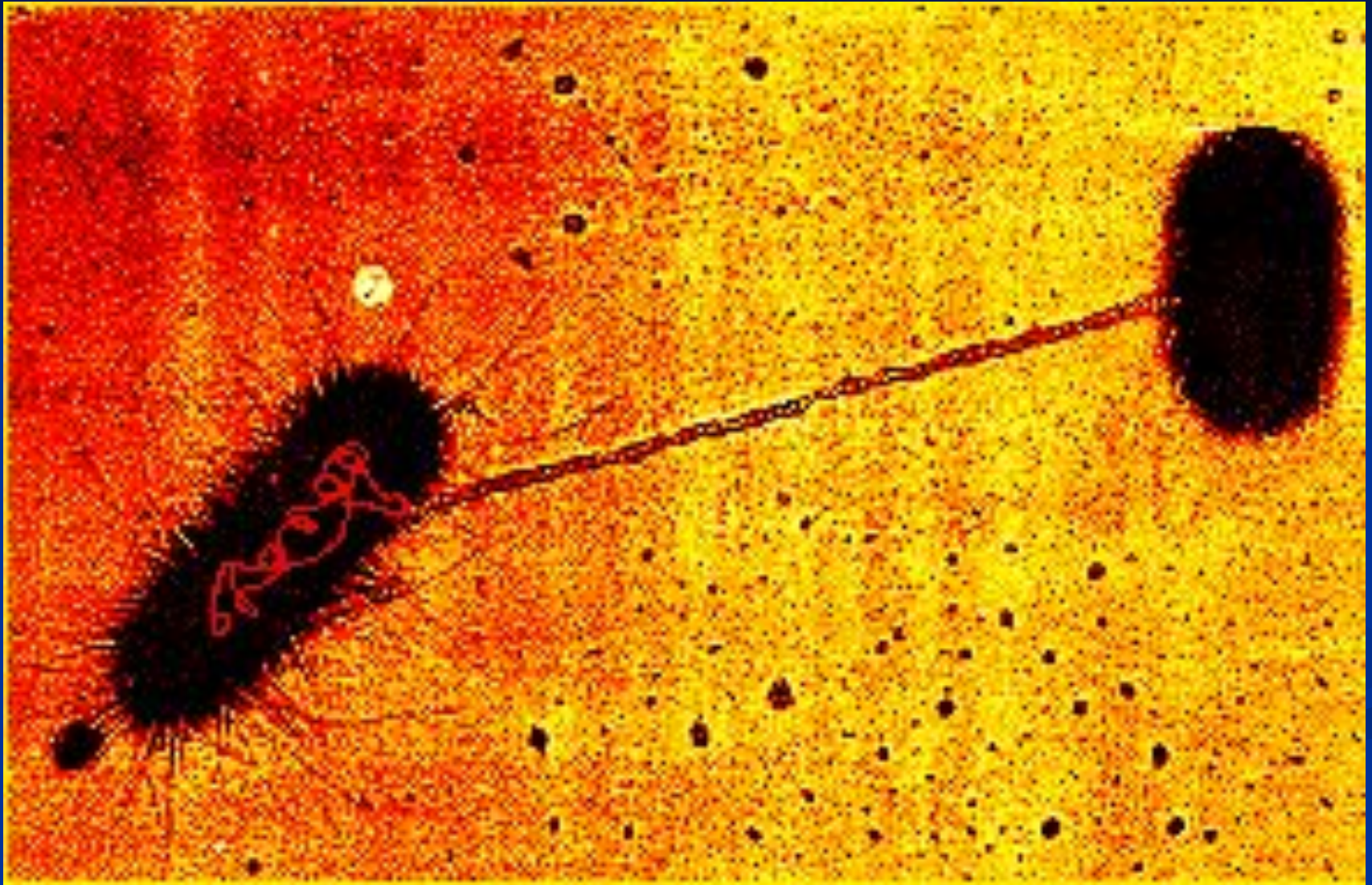
Extreme Environmental Factors

- Toxic chemical agents
- Heavy metals
- Radionuclides
- UV-light
- Low or high pH values
- High salinity
- Water deficiency
- Oxygen deficiency

Dendrogram of Oil-degrading Strains Based on Their Catabolic and Physiological Properties



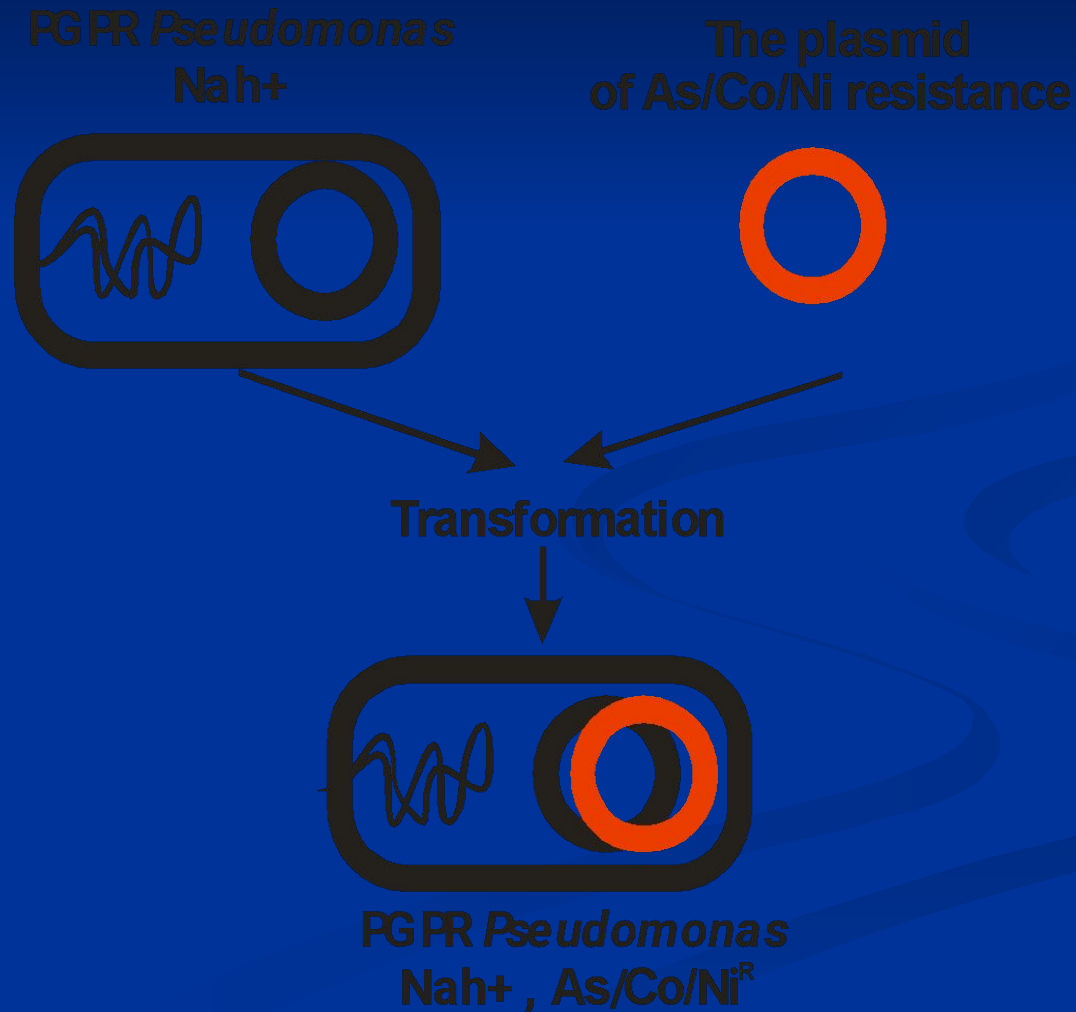




R-plasmids of *Pseudomonas aeruginosa*

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

The construction of multifunctional PGPR *Pseudomonas*



- The effect of crude oil hydrocarbons on microbial processes in soils, providing CO₂ emission into atmosphere, has been studied. The total CO₂ emission from oil-containing soil samples to atmosphere during 47 days of observation was 6.8-fold more than from native soil. At the same time, the amount of metabolic CO₂ produced due to soil organic matter mineralization was about 38 % of the total CO₂ flow and that due to utilization of oil hydrocarbons reached 62 %.

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.

Thank you!