

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной генетики

Российской академии наук

На правах рукописи

ПОПОВА Александра Антоновна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
БАКТЕРИЙ - ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И НЕБЕЛКОВОЙ
АМИНОКИСЛОТЫ БЕТА-N-МЕТИЛАМИН-L-АЛАНИНА**

Специальность 03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
О.А. Кокшарова

Москва-2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
I. ВВЕДЕНИЕ	8
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1. Летучие вещества бактерий-антагонистов.....	15
1.1. Аспекты конкурентной борьбы бактерий-антагонистов в ризосфере.....	15
1.2. Летучие вещества бактерий-антагонистов и их характеристики.....	16
1.3. Действие ЛОС на различные организмы.....	21
1.3.1. Действие ЛОС на грибы.....	21
1.3.2. Действие ЛОС на растения.....	23
1.3.3. Действие ЛОС на цианобактерии.....	25
1.3.4. Действие ЛОС на фитопатогенные бактерии.....	26
1.3.5. Действие ЛОС на животных и протистов.....	27
1.4. Малоизученные аспекты и перспективы биоконтроля заболеваний растений.....	28
2. Биоконтроль и Quorum sensing регуляция.....	29
3. Нейротоксичная небелковая аминокислота бета-N-метиламин-L-аланин и ее роль в биологических системах.....	31
3.1. Продуценты и пути распространения БМАА.....	32
3.2. Методы обнаружения БМАА в биологических образцах.....	33
3.3. Биосинтез, биотрансформация и транспорт БМАА.....	36
3.4. Действие БМАА на клетки эукариот и прокариот.....	38
3.5. Молекулярные механизмы действия БМАА.....	40
3.6. Возможные биологические роли БМАА.....	44
4. Ассимиляция азота у цианобактерий.....	46
4.1. Регуляция азотного метаболизма у цианобактерий.....	46
4.2. Механизм и регуляция образования гетероцист у цианобактерий.....	50
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	56
1. Организмы, питательные среды и условия культивирования.....	56
1.1. Бактериальные культуры.....	56
1.2. Культуры грибов.....	60
1.3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	60
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	61
2. Определение синтеза АГЛ.....	61
3. Выделение АГЛ из бактериальных культур.....	62
4. Идентификация АГЛ в культуральных экстрактах.....	62

5. Определение антагонистической активности при действии летучих веществ бактерий.....	63
5.1. Действие на фитопатогенные бактерии.....	63
5.2. Действие на цианобактерии.....	64
5.3. Действие на фитопатогенные грибы.....	64
5.4. Действие на нематод.....	64
5.5. Действие на <i>D. melanogaster</i>	65
6. Определение действия индивидуальных ЛОС на микроорганизмы, нематод и дрозофил.....	65
7. Анализ действия HCN.....	65
8. Исследование влияния кетонов на фотосинтетический аппарат цианобактерий <i>S. sp.</i> PCC 7942.....	66
9. Действие БМАА на рост <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120.....	66
9.1. Измерение оптической плотности.....	66
9.2. Измерение концентрации хлорофилла <i>a</i>	67
10. Измерение нитрогеназной активности <i>N. sp.</i> PCC 7120.....	67
11. Флуоресцентная микроскопия.....	68
12. Выделение геномной ДНК бактерий.....	69
13. Выделение плазмидной ДНК.....	69
14. Рестрикция ДНК.....	69
15. Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле.....	69
16. Очистка ДНК из агарозного геля и из реакционных смесей.....	70
17. ПЦР-амплификация.....	70
18. Лигирование фрагментов ДНК.....	71
19. Трансформация клеток <i>E. coli</i>	72
19.1. Получение компетентных клеток.....	72
19.2. Трансформация.....	73
20. Транспозонный мутагенез <i>Synechococcus sp.</i> PCC 7942.....	73
21. Селекция транспозонных мутантов <i>S. sp.</i> PCC 7942, устойчивых к кетонам.....	74
22. Клонирование и секвенирование генов <i>S. sp.</i> PCC 7942, определяющих чувствительность к действию 2-нонанона.....	74
23. Выделение РНК и синтез кДНК.....	74
24. ПЦР в реальном времени.....	75
25. Определение внутриклеточных концентраций ионов кальция в культуре <i>N. sp.</i> PCC 7120.....	75

25.1. Окрашивание флуоресцентным красителем Fura 2-AM.....	76
25.2. Измерение флуоресценции.....	76
25.3. Построение калибровочной кривой <i>in situ</i>	77
26. Статистический анализ.....	78
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	79
Глава 1. Биологическая активность летучих органических соединений	
почвенных бактерий.....	79
1. Скрининг штаммов, синтезирующих АГЛ, из коллекции почвенных бактерий <i>Pseudomonas</i>	80
2. Уточнение идентификации штаммов <i>Pseudomonas chlororaphis</i> с помощью секвенирования генов 16S рРНК	83
3. Идентификация генов двух QS систем с помощью ПЦР.....	83
4. Синтез АГЛ у штаммов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i>	84
5. Определение действия летучих веществ бактерий родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i> на различные микроорганизмы.....	86
5.1. Определение действия летучих веществ бактерий родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i> на фитопатогенные бактерии.....	86
5.1.1. Действие на <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	86
5.1.2. Действие на другие бактерии.....	88
5.2. Определение действия летучих веществ бактерий родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i> на цианобактерии.....	90
5.3. Определение действия летучих веществ бактерий на грибы.....	90
5.3.1. Действие на <i>Rhizoctonia solani</i>	91
5.3.2. Действие на <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	92
5.3.3. Действие на <i>Helminthosporium sativum</i>	92
5.3.4. Действие на другие грибы.....	93
6. Изучение влияния мутаций в генах ряда глобальных регуляторов экспрессии генов бактерий на синтез летучих веществ.....	94
7. Синтез HCN штаммами родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i>	96
8. Определение действия летучих веществ бактерий на дрожофилу.....	98
9. Определение действия летучих веществ бактерий на нематоды.....	98
10. Определение качественного состава смеси летучих веществ.....	99
11. Действие индивидуальных летучих соединений на различные прокариотические и эукариотические организмы.....	101
11.1. Действие ЛОС на микроорганизмы.....	101

11.2. Действие ЛОС на дрожифилу и нематоды.....	102
12. Изучение действия кетонов 2-нонанона и 2-ундеканона на фотосинтетический аппарат <i>S. sp.</i> PCC 7942.....	105
13. Инсерционный мутагенез с помощью транспозона и анализ генов цианобактерии <i>S. sp.</i> PCC 7942, определяющих чувствительность к кетонам.....	106
14. Направленная инсерционная инактивация генов SYNPC7942_RS06965 (NR401), SYNPC7942_RS03755 (NR 385), SYNPC7942_RS01785 (NR 365) и SYNPC7942_RS03785 (NR 359) в штамме дикого типа цианобактерии <i>S. sp.</i> PCC 7942.....	107
Глава 2. Биологическая активность небелковой аминокислоты бета-N-метиламнин-L-аланина (БМАА).....	112
1. Действие БМАА на рост <i>N. sp.</i> PCC 7120.....	112
2. Действие БМАА на дифференцировку гетероцист при росте цианобактерии на разных источниках азота.....	113
3. Действие БМАА на нитрогеназную активность <i>N. sp.</i> PCC 7120.....	116
4. Действие БМАА на экспрессию генов <i>N. sp.</i> PCC 7120, вовлеченных в процесс дифференцировки гетероцист и азотный метаболизм.....	119
4.1. Действие БМАА на экспрессию генов <i>N. sp.</i> PCC 7120 при азотном голодании.....	119
4.2. Действие БМАА на экспрессию генов <i>N. sp.</i> PCC 7120 в присутствии источников связанного азота.....	124
5. Действие БМАА на внутриклеточную концентрацию ионов кальция.....	130
6. Действие БМАА на размер клеток <i>N. sp.</i> PCC 7120.....	137
V. ВЫВОДЫ.....	139
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	140
VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141
БЛАГОДАРНОСТИ	174

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**(в алфавитном порядке)**

АГЛ – N-ацил-гомосеринлактон
АФК – активные формы кислорода
БМАА – бета-N-метиламин-L-аланин
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГОГАТ – глутаминоксоглутарат аминотрансфераза
ГС – глутаминсинтетаза
ДМСО – диметилсульфоксид
ДМДС – диметидисульфид
ДМТС – диметилтрисульфид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 α -КГ – альфа-кетоглутарат
ЛОС – летучие органические соединения
МС – масс-спектрометрия
НБА – Небелковые аминокислоты
НМДА – N-метил-D-аспартат
п.н. – пар нуклеотидов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
Aza-Trp – 7-азатриптофан
B2TA – бета-2-тиенилаланин
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
C6-ГЛ – N-гексаноил-гомосеринлактон
C4-ГЛ – N-бутаноил-гомосеринлактон
C8-ГЛ – N-октаноил-гомосеринлактон
C12-ГЛ – N-додеканоил-гомосеринлактон
Chl – хлорофилл
DCMU – 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина
GenBank – База данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)

GST – глутатионтрансфераза

HepR – heptanone resistant

MOPS – 3-морфолинопропансульфоновая кислота

MSX – L-метионинсульфоксимин

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NR – nonanone resistant

PBS – натрий-фосфатный буфер

3OC₆-ГЛ – N-(3-оксо-гексаноил)-гомосеринлактон

3OC₈-ГЛ – N-(3-оксо-октаноил)-гомосеринлактон

QS – Quorum Sensing

UGT – УДФ-глюкуронилтрансфераза

UndR – undecanone resistant

X-Gal – 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактозид

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В последние годы накапливается все больше данных, показывающих, что вторичные метаболиты бактерий могут проявлять разнообразные функции и оказывать плеiotропное действие на метаболизм бактерий, участвуя в регуляции клеточных процессов, в коммуникации бактерий и их взаимодействии с высшими организмами.

В моей работе были исследованы биологические активности двух типов вторичных метаболитов – 1) летучих органических соединений, синтезируемых почвенными бактериями, и 2) небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина, синтезируемой цианобактериями.

В настоящее время растущее внимание исследователей привлекает феномен синтеза летучих органических соединений (ЛОС) микроорганизмами. Стало известно, что микроорганизмы синтезируют огромное количество ЛОС, слабо изученных и совсем не изученных; многие из них не идентифицированы. Среди них вещества различной структуры: спирты, кетоны, альдегиды, кислоты, терпеноиды, серосодержащие соединения и др. Многие ЛОС проявляют антимикробное действие, другие стимулируют рост растений, бактерий, являются средством коммуникации бактерий («infochemicals») и т.д. О механизмах их действия и биосинтеза известно крайне мало. Изучение ЛОС микроорганизмов – новая развивающаяся область исследований. ЛОС, выделяемые микроорганизмами, являются ценным источником новых химических соединений с полезными для человека свойствами в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине.

Среди различных таксономических групп ризобактерий, стимулирующих рост растений, широким набором полезных для растений свойств выделяются ризосферные бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*, которые являются потенциальными объектами биотехнологии для разработки биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений на их основе. В настоящей работе были исследованы ЛОС этих двух родов бактерий (*P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*) и их действие на различные биологические объекты.

В ряду вторичных метаболитов особое место занимают небелковые аминокислоты. Небелковые аминокислоты, синтезируемые растениями и микроорганизмами, являются биологически активными веществами, участвующими во взаимодействии организмов с окружающей средой, они выполняют защитные и регуляторные функции, задействованы в передаче сигналов и в ответе на стресс. Они являются значительным резервом органического азота во многих экосистемах. Небелковые аминокислоты широко

распространены в природе и оказывают существенное воздействие на организмы животных и человека. Среди небелковых аминокислот обнаружена аминокислота бета-N-метиламин-L-аланин (БМАА), которая является опасным нейротоксином, образуемым цианобактериями.

В настоящее время основное внимание уделяют экологическому аспекту аккумуляции этой небелковой аминокислоты в скоплениях фитопланктона и медицинскому аспекту воздействия БМАА на нервную систему позвоночных. БМАА является структурным аналогом глутамата и связывается с глутаматными рецепторами в мозге человека и животных. Получено много свидетельств того, что накопление БМАА по цепям питания и его аккумуляция в организме человека и животных может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофической склероз. Поскольку синтез БМАА фитопланктоном представляет собой потенциальную угрозу для здоровья человека, не менее важным является фундаментальная проблема исследования процессов формирования и метаболизма цианотоксинов в природе, их функциональной значимости в микробных популяциях. Однако современные знания о причинах и условиях синтеза БМАА, чрезвычайно скудны. Сведений о регуляции образования БМАА и ее физиологической роли в цианобактериях практически нет.

Цели и задачи работы

Цель работы - изучить биологические функции, молекулярно-генетические и физиологические механизмы действия летучих органических соединений, продуцируемых почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и небелковой аминокислоты БМАА, синтезируемой цианобактериями.

Задачи исследования:

1. Изучить действие пула летучих органических веществ, синтезируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и их наиболее значимых индивидуальных летучих соединений на бактерии, грибы и беспозвоночных животных.
2. Изучить влияние мутаций в генах ряда глобальных регуляторов экспрессии генов бактерий на синтез летучих органических соединений.
3. Идентифицировать гены цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942, определяющие чувствительность клеток к действию ЛОС кетонов.
4. Изучить действие БМАА на морфологию и физиологию клеток азотфиксирующей цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120.
5. Изучить действие БМАА на экспрессию генов, продукты которых вовлечены в азотный метаболизм цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120.

Научная новизна и практическая значимость

В ходе работы был проведен анализ способности ряда бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* синтезировать летучие вещества; показано, что они обладают антагонистической активностью в отношении ряда прокариотических (гетеротрофные бактерии, цианобактерии) и эукариотических организмов (грибы, нематоды, дрозофилы). Впервые была исследована возможность некоторых глобальных регуляторов генной экспрессии микроорганизмов контролировать синтез летучих соединений у этих бактерий. Впервые было изучено действие индивидуальных ЛОС, выделяемых этими бактериями (кетонов, диметилдисульфида, 1-ундецена) на организмы различных таксономических групп, в том числе цианобактерии, дрозофилу и нематоды. Впервые были получены мутанты цианобактерии *Synechococcus* sp. 7942, устойчивые к действию кетонов 2-нонанона, 2-гептанона и 2-ундеканона. Идентифицированы гены, определяющие чувствительность этой цианобактерии к действию 2-нонанона и кодирующие муреин-пептид-лигазу, участвующую в процессе биогенеза клеточной стенки цианобактерий, ABC транспортер и белок, содержащий VRR-NUC домен, присутствующий в ферментах рестрикции-модификации. С точки зрения практической значимости, полученные данные могут быть полезны для разработки препаратов биологической защиты от фитопатогенов.

В ходе работы впервые было обнаружено, что небелковая аминокислота БМАА ингибирует образование гетероцист при истощении азота в среде и инициирует формирование гетероцистоподобных клеток на среде со связанным азотом в культуре нитчатой азотфиксирующей цианобактерии *N. 7120*. Было исследовано действие БМАА на экспрессию генов, вовлеченных в азотный метаболизм, и впервые показано, что БМАА участвует в регуляции дифференцировки клеток *N. 7120*. Полученные в работе данные имеют большое значение для дальнейших фундаментальных исследований молекулярных механизмов регуляции азотного метаболизма и клеточной дифференцировки азотфиксирующих цианобактерий, а также в экотоксикологических исследованиях, направленных на контроль за аккумуляцией БМАА в природе.

Положения, выносимые на защиту

1. Летучие вещества почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* ингибируют рост различных микроорганизмов и оказывают летальный эффект на беспозвоночных животных.
2. Кетоны (2-нонанон, 2-ундеканон, 2-гептанон) и диметилдисульфид (ДМДС) оказывают ингибиторное и летальное действие на про- и эукариотические организмы.

3. 2-нонанон оказывает плейотропное действие на клетки цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942. В мутантах *S.* sp. PCC 7942, устойчивых к действию 2-нонанона, инактивированы гены, которые в клетках дикого типа кодируют белки, участвующие в биогенезе клеточной стенки цианобактерий, метаболизме ДНК и АВС-транспорте.

4. Синтез фермента нитрогеназы, участвующего в процессе азотфиксации в клетках цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120, и дифференцировка гетероцист ингибируются небелковой аминокислотой бета-N-метиламин-L-аланином (БМАА).

5. БМАА регулирует экспрессию генов, продукты которых вовлечены в азотный метаболизм и клеточную дифференцировку цианобактерии *N.* sp. PCC 7120.

Апробация работы

Основные материалы диссертации были представлены на XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII и XXVIII Международных зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011-2016); VI Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Ростов-на-Дону, 2014); Всероссийском симпозиуме «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», (Москва, 2014); 5-м Конгрессе микробиологов Европы (FEMS) (Лейпциг, Германия, 2013); XIX, XX и XXII Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2012, 2013, 2015); Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова» (Москва-Пушино, 2011); IV Международной конференции «BioMicroWorld 2011» Торремолинос, Испания, 2011); Международной научной конференции «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее» (Москва, 2014); X Молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015); 5-м Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2015); II Международной научно-практической конференции, «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах» (Киров, 2015).

Публикации

Автором опубликована 21 печатная работа, в том числе 5 статей по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Публикации в научных журналах:

1. **Порова А.А.**, Koksharova O.A., Lipasova V.A., Zaitseva J.V., Katkova-Zhukotskaya O.A., Eremina S.Iu., Mironov A.S., Chernin L.S., Khmel I.A. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster* // Biomed. Res. Int. - 2014. - V. 2014. - 125704.
2. Зайцева Ю.В., **Попова А.А.**, Хмель И.А. Регуляция типа Quorum Sensing у бактерий семейства *Enterobacteriaceae* // Генетика. - 2014. - Т. 50(4). - С. 373–391.
3. Плюта В.А., **Попова А.А.**, Кокшарова О.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Способность природных кетонов взаимодействовать с бактериальными Quorum Sensing системами // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2014. - Т.4. - С. 10-13.
4. Karaushu E.V., Lazebnaya I.V., Kravzova T.R., Vorobey N.A., Lazebny O.E., Kiriziy D.A., Olkhovich O.P., Taran N.Y., Kots S.Y., **Порова А.А.**, Omarova E., Koksharova O.A. Biochemical and molecular phylogenetic study of agriculturally useful association of a nitrogen-fixing cyanobacterium and nodule *Sinorhizobium* with *Medicago sativa* L. // Biomed. Res. Int. – 2015. - V.2015. - 202597.
5. **Попова А.А.**, Кокшарова О.А. Нейротоксичная небелковая аминокислота бета-N-метиламин-L-аланин и ее роль в биологических системах // Биохимия. - 2016. - Т.81(8). - С. 1023-1035.

Основные материалы конференций

1. **Попова А.А.**, Цитрина А.А., Кокшарова О.А. Изучение изменений концентрации кальция в клетках цианобактерий при действии бета-N-метиламин-L-аланина (БМАА). Тезисы в сборнике «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 1-2 ноября 2016, с. 112-115.
2. **Попова А.А.**, Кокшарова О.А., Веселова М.А., Хмель И.А. Мутанты цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942, устойчивые к природным кетонам. Тезисы XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 8-11 февраля 2016 г., с. 148.
3. **Попова А.А.**, Кокшарова О.А. Новые аспекты регуляции процессов азотфиксации и клеточной дифференцировки цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 цианотоксином БМАА. Тезисы XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 8-11 февраля 2016 г., с. 149.

4. **Попова А.А.**, Кравцова Т.Р., Кокшарова О.А. Небелковая аминокислота БМАА как регулятор образования и репрессии гетероцист цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. X молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Россия, 27-30 октября 2015.
5. Лазебный О.Е., Лазебная И.В., **Попова А.А.**, Кокшарова О.А. Филогенетический анализ и эволюция глутаматного рецептора цианобактерий. Тезисы в сборнике Мат. 5-го Всероссийского симпозиума с международным участием «Автотрофные микроорганизмы», посвященного 90-летию со дня рождения академика РАН Елены Николаевны Кондратьевой. М., биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, место издания М.: МАКС Пресс, 2015.
6. **Попова А.А.**, Кравцова Т.Р., Кокшарова О.А. Регуляторный эффект БМАА на клеточную дифференцировку цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. II Международная научно-практическая конференция, посвященная 105-летию со дня рождения профессора Эмилии Адриановны Штиной «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах», Киров, Россия, 19-23 октября 2015.
7. **Попова А.А.**, Елисеева Ю.И., Кокшарова О.А. Изучение молекулярных механизмов и генетического контроля устойчивости клеток цианобактерий к бета-N-метиламин-L-аланину (БМАА). VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированные генетические симпозиумы, 2014. Ростов-на-Дону, ISBN 978-5-91291-018-0, стр.195-196.
8. **Ророва А.А.**, Koksharova O.A., Khmel I. A. Analysis and mechanism of action of bacterial volatile organic compounds on phototrophic microorganisms. International scientific conference in memoriam of the 80th anniversary of professor Mikhail V. Gusev «Physiology and biotechnology of oxygenic photoautotrophic microorganisms: looking into the future». 27-30 May, 2014. Moscow, Russia.
9. **Попова А.А.**, Кокшарова О.А. Генетический подход к изучению роли нейротоксина БМАА в клетках цианобактерий. «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва. Декабрь. 2014. Макс Пресс. 2014, ISBN 978-5-317-04881-5, стр.187.
10. **Ророва А.А.**, Koksharova O.A., Chernin L.S., Khmel I.A. Action of volatile organic compounds of *Pseudomonas* and *Serratia* on phytopathogenic fungi and bacteria. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013). Leipzig, Germany, July 21-25, 2013.
11. **Попова А.А.** Действие летучих органических веществ почвенных бактерий на микроорганизмы, дрозофилу, нематоды; Quorum Quenching эффект. Тезисы XX

Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013», Москва 8-12 апреля 2013, с. 206.

12. **Попова А.А.**, Липасова В.А., Кокшарова О.А., Хмель И.А. Действие летучих веществ бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на водоросли и цианобактерии. Тезисы IV Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии», Киев, 23-25 мая 2012, с. 239.
13. **Попова А.А.**, Липасова В.А., Хмель И.А., Кокшарова О.А. Биологическое действие летучих веществ почвенных бактерий. Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века», Москва, 24 мая 2012, с. 736.
14. **Попова А.А.** Действие летучих веществ почвенных бактерий на микроорганизмы. Тезисы XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Москва 9-13 апреля 2012, с. 176.
15. **Попова А.А.**, Липасова В.А., Хмель И.А., Кокшарова О.А. Эффект действия летучих веществ почвенных бактерий на микроорганизмы, дрозофилы и нематоды. Тезисы XXIV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 7-9 февраля 2012 г., с. 78.
16. **Popova A.A.**, Koksharova O.A., Chernin L.S., Khmel I. A. Volatile organic compounds of *Pseudomonas* and *Serratia* and their action on phytopathogenic fungi and bacteria. Book of abstracts of the IV International conference on environmental, industrial and applied microbiology, BioMicroWorld 2011. Torremolinos, Málaga, Spain, 14-16 September 2011, p. 535.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Летучие вещества бактерий-антагонистов

1.1. Аспекты конкурентной борьбы бактерий-антагонистов в ризосфере

Микробный антагонизм является одной из форм взаимоотношений микроорганизмов в одной экологической нише, а бактериями-антагонистами считаются бактерии, подавляющие рост других организмов.

Установлено, что бактерии-антагонисты играют важную роль в подавлении заболеваний растений, вызванных фитопатогенными микроорганизмами [Cook *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2000; Whipps, 2001; Weller *et al.*, 2002]. Вследствие этого, понимание особенностей и механизмов действия бактерий-антагонистов может содействовать развитию успешных методов биологического контроля [Kai *et al.*, 2007].

Механизмы, отвечающие за антагонистическую активность, включают ингибирование патогенов, конкурирование за места обитания, компоненты питания и минералы, паразитизм [Handelsman и Stabb, 1996; Bloemberg и Lugtenberg, 2001; Bais *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2003; Haas и Defago, 2005]. Это обычная стратегия бактерий-антагонистов для ингибирования фитопатогенов с помощью выделения противомикробных метаболитов, которыми являются антибиотики, токсины и биологические поверхностно-активные вещества [Raaijmakers *et al.*, 2002].

Значимым инструментом конкурентной борьбы является синтез антибиотиков. Штамм *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, выделенный из ризосферы пшеницы, является эффективным агентом биологического контроля за счет ингибирования роста гриба *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, вызывающего заболевание пшеницы [Pierson и Thomashow, 1992]. Продуцирование трех феназиновых антибиотиков обеспечивает этому штамму способность к антагонистическому подавлению других организмов в ходе конкурентной борьбы. Было выяснено, что, кроме феназинов, эти бактерии синтезируют экзопротеазы, сидерофоры и синильную кислоту, которые также могут участвовать в их антагонистическом действии [Chancey *et al.*, 1999].

Вышеперечисленные соединения участвуют в процессе подавления заболеваний у растений [Zhang и Pierson, 2001]. Различные штаммы *Enterobacter* spp. используются в качестве эффективных агентов биоконтроля, обладающих антагонистической активностью относительно многих фитопатогенных грибов. Некоторые изоляты *Enterobacter cloacae* защищают от разных гнилей и довсходовой гибели саженцы гороха, свёклы, хлопка и огурцов, которые вызываются *Pythium* spp., а также от других повреждений растений, причиной которых являются грибы [Chernin *et al.*, 1995]. Штаммы почвенных бактерий *Enterobacter agglomerans*, являющиеся антагонистами многих фитопатогенных грибов,

обладают хитинолитической активностью и экскретируют комплекс хитинолитических ферментов [Hadar *et al.*, 1983; Nelson, 1988; Sneh *et al.*, 1984; Chernin *et al.*, 1995]. Как эффективные агенты для биоконтроля развития фитопатогенных грибов в литературе описываются, штаммы *P. fluorescens* и *S. plymuthica*, способные к синтезу антибиотиков [Ovadis *et al.*, 2004; Dandurishvili *et al.*, 2011].

Несколькими исследователями было показано, что на рост грибов могут оказывать влияние летучие органические соединения (ЛОС) почвенных бактерий [Alström, 2001; Wheatley, 2002]. Исследование образования ЛОС в почве сопровождается сложностями, сопряженными с огромным количеством разнообразных параметров, влияющих на их формирование. Кроме различий в составе почвенных сообществ, образование микробных ЛОС в почве сильно зависит от доступности кислорода, компонентов питания и от физиологии микроорганизмов. Доступность питательных веществ и кислорода, в свою очередь, зависит от таких экологических факторов, как влажность почвы, ее структура или микробная активность [McNeal и Herbert, 2009].

Доступность кислорода была признана одним из основных параметров, определяющих тип продуцируемых ЛОС. В аэробных условиях энергия расходуется на рост клеток и лишь следовые количества тратятся на образование вторичных метаболитов, к которым могут относиться и ЛОС. При микроаэробных и анаэробных условиях разнообразие и количество выделяемых ЛОС значительно увеличивается [Stotzky и Schenck, 1976; Seewald *et al.*, 2010]

1.2. Летучие вещества бактерий-антагонистов и их характеристики

Микроорганизмы продуцируют множество различных летучих органических соединений в ходе расщепления органических веществ. Таким образом, ЛОС являются побочными продуктами разных путей вторичного метаболизма и могут быть просто продуктами жизнедеятельности и вместе с этим играть роль сигнальных молекул [Maughofer *et al.*, 2006]. Доказано, что вторичные метаболиты участвуют в наземной коммуникации между живыми организмами, и было показано, что они также важны и в коммуникации в почве [Rasmann *et al.* 2005]. В работе [Kai *et al.*, 2007] изучались малые органические молекулы (молекулярная масса <300 Д), характеризующиеся высоким давлением паров и поэтому легко переходящие в летучее состояние. Такие ЛОС могут действовать в широком диапазоне расстояний и области их активности распространяются от ближних взаимодействий до взаимодействия на значительных расстояниях за счет воздушной диффузии, включая перемещение в почвенных порах [Wheatley, 2002].

Выделение ЛОС бактериями-антагонистами изучалось также с точки зрения получения ресурса, обладающего противогрибковой активностью [Kai *et al.*, 2007]. В статье [Pare и Tumlinson, 1999] были опубликованы данные о количественном измерении ЛОС, испускаемых различными видами сельскохозяйственных растений в лабораторных условиях, а в исследовании [Ryu *et al.*, 2004] показаны результаты выделения ЛОС ризобактериями, стимулирующими рост растений.

Как показали результаты исследований, летучие органические соединения с малым молекулярным весом, такие как терпеноиды, фенилпропаноиды, остатки жирных кислот функционируют как сигналы для коммуникации вне и внутри организмов [Kai *et al.*, 2007; Schöller *et al.*, 2002; Wheatley, 2002; Pare и Tumlinson, 1999; Piechulla и Pott, 2003].

Эти соединения могут оказывать негативный или положительный эффект на организмы, воспринимающие сигнал. Так, сложная смесь летучих лактонов и терпеноидов (включая геосмин), обладающая антибиотическими свойствами, была обнаружена у морских видов *Streptomyces* [Dickschat *et al.*, 2005]. В исследовании [Schöller *et al.*, 2002] было изучено 26 видов *Streptomyces* и идентифицировано в общем 120 различных ЛОС, включающих алканы, алкены, спирты, сложные эфиры, кетоны, сульфосодержащие соединения и терпеноиды, из которых 10% остались неопределенными. Однако, ЛОС выделялись из разных видов *Streptomyces* в различных комбинациях [Schöller *et al.*, 2002]. Были выделены первые ферменты и гены, вовлеченные в процесс биосинтеза геосмина у этих видов [Gust *et al.*, 2003; Cane и Watt, 2003].

Количество определяемых соединений различалось у разных штаммов. Показано, что широкий спектр ЛОС может быть получен из некоторых штаммов рода *Serratia* и *Pseudomonas. trivialis* 3Re2-7, меньше различных ЛОС синтезируют *Staphylococcus epidermidis* 2P3-18, *P. xuorescens* L13-6-12 и *S. rhizophila* P69, и совсем не было обнаружено присутствие ЛОС в газовых продуктах *B. subtilis* B2g, *B. cepacia* 1S18 и *S. maltophilia* R3089 [Kai *et al.*, 2007].

Большое влияние многие вещества, синтезируемые бактериями-антагонистами, оказывают на организмы сообществ ризосферы, такие как грибы, растения и другие бактерии. Особенный интерес в этом контексте представляет широкий спектр ЛОС, синтезируемый видами *Serratia*, многие из которых являются специфичными для данного рода. Кроме фенилэтанола, который может обладать цитотоксическими эффектами [Etschmann *et al.*, 2002], с большой вероятностью можно утверждать, что виды *Serratia* также синтезируют транс-9-гексадец-1-ол, диметилтрисульфид (ДМТС) и бензилнитрил. Грибы *Phallus impudicus* выделяют ДМТС. Показано, что это вещество привлекает мух, это способствует распространению спор. ДМТС выделяют также многие виды *Streptomyces* и

грамотрицательные бактерии, растущие на говядине [Borg-Karlson *et al.*, 1994; Schöller *et al.*, 2002; Dainty *et al.*, 1989].

Фенилэтанол выделяют такие антагонисты, как *Serratia* spp., *S. epidermidis*, *S. rhizophila*. Фенилэтанол известен как компонент цветочных ароматов (роз, гиацинтов, жасмина, нарциссов и лилий), но это соединение также входит в газовые продукты синтеза бактерий (*Mycobacterium* spp., *Brevibacterium linens*, *Streptomyces* spp.) и грибов (*Saccharomyces* spp., *Phellinus* spp., *Ischnoderma benzoni*) [Etschmann *et al.*, 2002; Schöller *et al.*, 2002]. Антимикробные эффекты β -фенилэтанола обусловлены изменением проницаемости цитоплазматической мембраны, изменением транспортных систем для аминокислот и сахаров и ингибированием синтеза макромолекул [Kai *et al.*, 2007; Lucchini *et al.*, 1993; Etschmann *et al.*, 2002].

Соединения с индексом RI 1386, выделяемые видами *Serratia*, с большой вероятностью можно соотнести с сесквитерпенами. Большой интерес вызывает возможность однозначно выяснить, присутствуют ли терпеноиды среди летучих продуктов синтеза бактерий-антагонистов, так как терпеноиды широко известны как защитные агенты [Gershenson и Kreis, 1999; Arimura *et al.*, 2004].

У штаммов бактерий, вызывающих индукцию системной резистентности растений с помощью эмиссии ЛОС, в наибольшем количестве выделяются 2,3-бутандиол и ацетон. Эти летучие спирты являются продуктами альтернативного восстановительного пути превращения пирувата, обеспечивающего альтернативный источник NAD^+ в анаэробных условиях. Условия окружающей среды, в которых бактерии существуют в почве, также близки к анаэробным, таким образом, метаболизм пирувата идет именно по пути образования 2,3-бутанола и ацетона [Ramos *et al.*, 2000]. Присутствие 3-гидрокси-2-бутанона и 2,3-бутандиола сильно отличает качественный и количественный состав летучих смесей, выделяемых штаммами, активно индуцирующими системную резистентность растений, от тех, что синтезируют штаммы, не активирующие системную резистентность [Ryu *et al.*, 2004].

В работах [Ryu *et al.* 2003, 2004] было показано, что широко известные низкомолекулярные органические соединения 2,3-бутандиол и ацетон, выделяемые некоторыми штаммами *Bacillus subtilis*, стимулируют рост растений. Интересно, что бактерии *B. subtilis* также синтезируют приблизительно 20 других ЛОС, которые не оказывают на рост растений никакого эффекта. Бутандиол и ацетон, как правило, синтезируются и секретируются бациллами при культивировании на глюкозе. После потребления глюкозы бациллы могут использовать бутандиол и ацетон в процессе дальнейшего метаболизма. Эти соединения служат в качестве питательных ресурсов, что

создает благоприятные условия для бацилл в их экологической нише. То, что выделение бактериями ЛОС может обеспечивать дополнительные эффекты, например, действие на растения (стимуляция роста), является новым и перспективным аспектом для изучения.

Получение мутантов с нокаутированными генами ацетолактатсинтазного оперона, контролирующего предпоследнюю ступень в образовании ацетоина (превращение пирувата в ацетолактат) и ацетолактатдегидрогеназу, фермента, превращающий ацетоин в 2,3-бутандиол, ведет к снижению уровня 2,3-бутандиола и ацетоина у линий мутантов *B. subtilis* [Ramos *et al.*, 2000].

Установлено, что для активности ЛОС важна не только химическая структура, но и оптическая конфигурация соединения. В исследовании [Ryu *et al.*, 2004] было выяснено, что из трех оптических стереоизомеров 2,3-бутандиола основным активным соединением является 2R,3R-бутандиол.

Соединения 2,3-бутандиол и 3-гидрокси-2-бутанон (ацетоин) в равной степени синтезируются разными штаммами *Bacillus subtilis* GB03 и *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a. Додекан, 2-ундеканон, 2-тридеканон и 2- тридекан-1-ол синтезируются только клетками штамма *Bacillus subtilis* GB03, тогда как было обнаружено, что тетраметилпирозин синтезируется этим штаммом в наибольшем количестве по сравнению с *B. amyloliquefaciens* IN937a и *E. coli*. Додекан и ундекан выделяются у штаммов в малых количествах, в отличие от деканала. В составе ЛОС, выделяемых штаммом *S. plymuthica* C-48, используемым для биоконтроля, были обнаружены 3-фенилэтанол и транс-9-гексадецен-1-ол. В составе летучих продуктов синтеза *P. fluorescens* L13-6-12 обнаружен ундецен [Kai *et al.*, 2007].

В работе [Siess *et al.*, 1997] говорится об интересной роли серосодержащих органических соединений, подавляющих развитие рака у животных. Многие исследователи выдвигали предположения о том, что хемопреентивные агенты, ингибирующие канцерогенез, могут изменять метаболизм предшественников канцерогенов. Эти агенты могут повышать их детоксикацию с помощью увеличения количества ферментов II фазы процесса ксенобиотической детоксикации, таких как глутатионтрансферазы (GST), УДФ-глюкуронилтрансферазы (UGT), сульфотрансферазы и др., или при уменьшении уровней ферментов I фазы, таких как цитохромы P450 [Guengerich, 1992; Wattenberg *et al.*, 1993; Siess *et al.*, 1997]. Были получены результаты, показывающие, что аллил сульфиды, полученные из чеснока, повышают уровень ферментов фазы II (GST, UGT) и ингибируют цитохром P450 2E1 [Siess *et al.*, 1997].

Бактериальные ЛОС и готовый препарат с диметидисульфидом (ДМДС, $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$) оказывают бактериостатическое подавление роста *Agrobacterium* [Dandurishvili *et al.*,

2011]. В смеси ЛОС, выделяемых бактериями, с помощью масс-спектрометрии было обнаружено около 20 соединений, но только 3 из них синтезируются в большом количестве, относительно других, штаммами *P. fluorescens* и *S. plymuthica*. Среди летучих веществ, выделяемых этими штаммами, были обнаружены такие сульфосоединения, как метантиол, тиометилацетат и ДМДС. Другое сульфидное летучее соединение, триметилдисульфид, синтезируется в гораздо меньших количествах по сравнению с ДМДС и двумя другими названными выше сульфосоединениями.

Исследовательской группой Чернина Л.С. (неопубликованные данные) было установлено, что ДМДС подавляет рост не только бактериальных штаммов *Agrobacterium*, но также и мицелиальный рост некоторых фитопатогенных грибов, включая *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* и *Sclerotium rolfsii*.

Было установлено, что ДМДС играет защитную роль при биологических повреждениях растений [Kyung *et al.*, 2001]. Два других сульфосоединения, метантиол и метилтиол ацетат, описывались ранее как продукты синтеза некоторых растений и микроорганизмов и составляющие их аромата [Dirinck *et al.*, 1981; Schulz и Dickschat, 2007]. В литературе также есть указания на то, что диметилтрисульфид синтезируется некоторыми растениями и микроорганизмами и обладает антимикробной активностью [Kai *et al.*, 2009; Kyung *et al.*, 2001].

Из приведенных выше данных следует, что бактерии-антагонисты, продуцирующие ДМДС и другие летучие вещества с антимикробной активностью, могут считаться природными фумигантами, природа и эффективность биоконтроля которых напрямую связана с синтезом ими летучих веществ [Zhang *et al.*, 2007].

При изучении разложения бытовых отходов оказалось, что к синтезу некоторых ЛОС имеют отношение бактерии *Lactococcus lactis*. Исследование эмиссионного образца ЛОС, выделенного из чистой культуры *L. lactis*, подтвердило присутствие в смеси масляной кислоты, диметилсульфида, изопрена и бутанона [Mayrhofer *et al.*, 2006]. Исследование ЛОС, синтезируемых клетками бактерий *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. и *Enterobacter* spp., выявило видоспецифические различия в продуцировании ДМДС, диметилтрисульфида и изопрена [Schöller *et al.*, 1997]. При исследовании 26 видов *Streptomyces* было обнаружено, что они выделяют 120 различных ЛОС, среди которых изопрен, ацетон, бутанол, метилпропанол, метилбутанол, метилбутенол, циклопентанон, ДМДС, фенилэтанол и геосмин [Schöller *et al.* 2002].

Подавление фитопатогенов в почве за счет ЛОС, выделенных микроорганизмами (или растениями), может стать альтернативой обычным бактерицидам и фунгицидам и может способствовать уменьшению рисков для здоровья людей и животных. Примерами

фунгицидных ЛОС также являются 1-октен-3-ол, моно- и сесквитерпены, нонановая кислота, триметиламин и ДМДС, которые синтезируются актиномицетами и бактериями родов *Bacillus* и *Pseudomonas* [Wilkins и Parkkalle, 1996; Schöller *et al.*, 1997].

1.3. Действие ЛОС на различные организмы

1.3.1. Действие ЛОС на грибы

Бактериальные ЛОС могут функционировать как противогрибковые вещества [Alström, 2001; Wheatley, 2002]. Первая работа о микробных веществах, воздействующих на рост и развитие грибов, была опубликована в 1966 году [McCain, 1966]. В ней представлены данные о том, как летучие вещества бактерий *Streptomyces griseus* уменьшают споруляцию *Gleosporium aridum* и вызывают образование склероций у *Sclerotium cepivorum* и *Rhizoctonia solani* [McCain, 1966].

Эффекты бактериальных ЛОС, производимые на грибы, могут выражаться в стимуляции образования плодового тела, прорастании спор, ингибировании мицелиального роста, а также стимуляции или сокращения споруляции [Kai *et al.*, 2009]. На мицелиальный рост оказывают воздействие за счет синтеза ЛОС 250 почвенных бактериальных изолятов, из них самыми активными антагонистами роста грибов являются бактерии *Citrobacter freundii* и *Pseudomonas fluorescens* [Wheatley, 2002].

Было установлено, что биологически активные ЛОС также продуцируются видами бактерий *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Ensifer*, *Lysobacter*, *Planomicrobium*, *Sporosarcina* и *Stenotrophomonas* [Zou *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2009]. К потенциальным бактериям-антагонистам грибов, относят также виды *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium* и *Agrobacterium* [Fernando *et al.*, 2005; Vespermann *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2007].

ЛОС одного бактериального штамма оказывают неодинаковые эффекты на разные грибы и ингибируют их в различной степени, поэтому результаты взаимодействий будут специфическими для разных комбинаций грибов и бактерий. Эти различия могут быть обусловлены следующими причинами: разные грибы могут по-разному реагировать на разные компоненты смесей летучих соединений; могут различаться сайты связывания и воздействия молекул; грибы могут обладать разными способностями к детоксикации [Kai *et al.*, 2009].

Наблюдения за грибным мицелием, находящимся под воздействием летучих соединений *Bacillus subtilis*, под микроскопом выявили отклонения в образовании гиф и конидий [Chaurasia *et al.*, 2005]. Продольные и поперечные септы полностью исчезли у *Alternaria alternate*, а конидии стали толстостенными и сферической или неправильной формы. Под воздействием ЛОС у грибов *Fusarium oxysporum* и *Phytium afertile* наблюдался

лизис гиф, вакуолизация, грануляция структуры мицелия [Chaurasia *et al.*, 2005; Kai *et al.*, 2009].

Кроме морфологических изменений, в организме гриба происходят также изменения на молекулярном уровне. Так, у *Phanaerochaete magnolia* в присутствии бактериальных ЛОС изменяется ферментативная активность: лакказная активность прекращается полностью, в то время как тирозиназная активность увеличивается, оба явления скорее всего вызваны регуляцией экспрессии генов [Mackie и Wheatley, 1999].

Род *Serratia* включает грамотрицательные гамма-протеобактерии, которые существуют в тесной связи с корнями растений. *S. plymuthica* обладает антигрибковой активностью против широкого спектра фитопатогенных грибов, таких как *Fusarium culmorum*, виды *Pythium*, *R. solani* и *Verticillium dahliae* [Kurze *et al.*, 2001].

Мицелиальный рост гриба *Fusarium culmorum* ингибируется диметилдисульфидом, небольшие эффекты наблюдаются в отношении этого гриба при воздействии ундецена-1. Также различной степени эффекты на грибы демонстрируют различные амины, бензальдегид, циклогексанол, деканаль, 2-этил-1-гексанол, нонаналь, бензотиазол, диметилтрисульфид, метилпиразин, 2,5-диметилпиразин, фенилендиамин, 4-октилбензойная кислота, некоторые алканы, алкены, альдегиды и спирты со средней и большой длиной цепи [Chuankun *et al.*, 2004; Fernando *et al.*, 2005; Kai *et al.*, 2009].

Летучие соединения *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Stenotrophomonas* spp. сильно ингибируют рост *R. solani*. Было показано, что ЛОС случайно выбранных почвенных штаммов бактерий стимулирует или ингибирует темп роста *Trichoderma viridae*, *Phaenaerochaete magnoliae*, *Phytophthora cryptogea*, *Gaeumannomyces graminis* и *Microdom nivale* [Wheatley, 2002]. 21 штамм почвенных бактерий (*Serratia proteamaculans*, *Pseudomonas putida*, *P. acidovorans*, *P. chlororaphis*, *Stenotrophomonas* spp. и *Alcaligenes* spp.), выделенных из корней рапса, подавляют патогенный гриб *V. Dahlia* [Alström, 2001], а летучие вещества *Pseudomonas* spp. действуют на рост гриба *Sclerotinia sclerotiorum* [Fernando *et al.*, 2005]. Пул смеси ЛОС, синтезируемых бактериями *Pseudomonas*, выделенными из рапса и соевых бобов, ингибирует активность и развитие *Sclerotia*, а также аскоспор и мицелиальный рост *Sclerotinia sclerotiorum* в лабораторных условиях, так же, как и в поле. Бензотиазол, циклогексанол, н-деканаль, диметилтрисульфид, 2-этил-1-гексанол и нонаналь полностью ингибируют мицелиальный рост и образование гриба *Sclerotia*, а также снижают уровень заболеваемости растений [Fernando *et al.*, 2005].

Таким образом, ранее проводившиеся исследования доказывают, что существуют индуцируемые летучими органическими соединениями взаимодействия между бактериями и грибами. Такие взаимодействия могут быть специфичными для определенных видов, но

также ЛОС многих микроорганизмов могут оказывать эффект на нескольких членов экологического сообщества. Эти взаимодействия колеблются от почти полного подавления мицелиального роста до небольшого ослабления роста, а также приводят к морфологическим отклонениям в мицелии и конидиях [Chaurasia *et al.*, 2005].

ЛОС бактерий-антагонистов могут участвовать в различных физиологических процессах, таких как ингибирование лакказной активности некоторых грибов [Maskie и Wheatley, 1999], изменение процесса нитрификации [Bending и Lincoln, 2000], минерализации азота [Smolander *et al.*, 2006]. Эффекты некоторых ЛОС могут быть ощутимы на больших расстояниях [Minerdi *et al.*, 2008]. ЛОС бактерий могут также участвовать в эктосимбиотических взаимоотношениях в экологических нишах, когда симбиотический партнер находится вне клеток другого. Бактерии родов *Serratia*, *Achromobacter*, *Bacillus* и *Stenotrophomonas*, находясь в таком симбиозе с мицелием гриба *Fusarium oxysporum* MSA 35, вызывают у него появление воздушных гиф, микроконидий, изменение формы и проявление антагонистических свойств в отношении растений. Группой Minerdi было показано, что эти свойства проявляются только в ассоциации с бактериями [Minerdi *et al.*, 2008].

1.3.2. Действие ЛОС на растения

Растениям приходится выдерживать большое количество различных биотических и абиотических экологических стрессов в ходе их роста и развития. Так, широко распространенный почвенный фитопатогенный гриб *Rhizoctonia solani* наносит серьезный ущерб многим экономически важным сельскохозяйственным и садовым культурам, а также деревьям по всему миру [Sneh *et al.*, 1996].

Впервые о том, что два типичных представителя ЛОС, выделяемых бактериями, а именно 2,3-бутандиол и ацетон, стимулируют рост растений, было опубликовано в статье [Ryu *et al.*, 2003]. В этой работе рассматривалось воздействие ЛОС, образуемых видами бактерий рода *Bacillus*, на *Arabidopsis thaliana*. Но биологические функции других 38 органических соединений, включающих спирты, альдегиды, кислоты, сложные эфиры, кетоны, углеводороды, S-содержащие соединения и CO₂, выделяемые *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, остаются пока невыясненными [Frag *et al.*, 2006].

С другой стороны, были выявлены сильные ингибиторные эффекты штаммов бактерий *P. fluorescens* L13-6-12, *P. trivialis* 3Re2-7, *S. Odorifera* 4Rx13, *S. plymuthica* HRO-C48, *S. maltophilia* R3089, *S. rhizophila* P69, *S. odorifera* 4Rx13, (*Serratia* spp. и *Stenotrophomonas* spp.) на *A. thaliana* и проросток раскрытый (сон-траву), хотя конкретные участвующие биологически активные соединения пока неизвестны [Kai *et al.*, 2009].

Наличие информации о полном геноме растения *A. thaliana* позволило выявить, что под воздействием ЛОС *B. subtilis* 600 генов *A. thaliana* меняют свою экспрессию. Эти изменения относятся к модификациям клеточной стенки, первичному и вторичному метаболизму, реакции на стресс и регуляции гормонов. Эти данные включают регуляцию гомеостаза ауксина и увеличение клеток, что свидетельствует о том, что бациллы стимулируют рост растений [Zhang *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2009].

Ризосферные бактерии, способствующие росту растений, относятся к почвенным микроорганизмам, образующим колонии на корнях. Такие бактерии применяются для большого спектра сельскохозяйственных культур с целью усиления их роста, увеличения всхожести семян, веса растений и контроля заболеваний [Клоерпер *et al.*, 1991; Клоерпер *et al.*, 1980]. Всхожесть семян канолы (разновидность рапса, выведенного в Канаде), обработанных этими бактериями перед посадкой, увеличивается на 10-40% [Клоерпер *et al.*, 1991], растительная масса обработанных корнеплодов картофеля возрастает в среднем на 80% к моменту средней зрелости [Клоерпер *et al.*, 1980].

Предполагаемые механизмы стимуляции роста растений ризосферными бактериями включают синтез этими бактериями веществ, совпадающих с гормонами растений, а именно индолил-3-уксусной кислоты [Loper *et al.*, 1986], цитокинина [Timmusk *et al.*, 1999] и гиббереллина [MacDonald *et al.*, 1986], разложение выделяемого растениями этилена за счет 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы, фермента, синтезируемого бактериями [Glick, 1999] и увеличение количества минералов и азота в почве [Lin *et al.*, 1983].

Кроме того, низкомолекулярные растительные летучие вещества такие, как терпены, жасмонаты и компоненты зеленых листьев, к синтезу которых способны и бактерии, были признаны потенциальными сигнальными молекулами для растений и организмов других трофических уровней [Farmer, 2001; Farag и Pare, 2002], но роль, которую играют летучие вещества бактерий в развитии растений, конкретно еще не установлена.

Обработка семян или саженцев некоторыми штаммами ризосферных бактерий, стимулирующих рост растений, ведет к индукции системной резистентности организма обрабатываемого растения [Van Loon, 1997; Клоерпер *et al.*, 1999]. Она проявляется при стимуляции защитных механизмов растений и в начале сопротивления инфекции, вызванной патогенами [Van Loon, 1997]. Эта активация общей резистентности благоприятными микроорганизмами вблизи корней отличается от общей приобретенной устойчивости, при которой реакция вызывается патогенными микроорганизмами, взаимодействующими с надземными частями растения. В случае последней начинается

гиперчувствительный ответ и запускаются некоторые гены, связанные с патогенезом, что служит признаком защитной реакции у инфицированного растения [Ryals *et al.*, 1996].

Индукция системной резистентности ризосферными бактериями впервые наблюдалась у гвоздик (*Dianthus caryophyllus*) при снижении восприимчивости к *Fusarium* sp. [van Peer *et al.*, 1991], у фасоли обыкновенной [*Phaseolus vulgaris*] при снижении восприимчивости к заболеванию растений при воздействии паразитов [Alström, 1991] и у огурцов (*Cucumis sativus*) при снижении восприимчивости к *Colletotrichum orbiculare* [Wei *et al.*, 1991]. Также было установлено, что ризосферные бактерии вызывают индукцию общей резистентности растений и против некоторых других патогенных систем [Maurhofer *et al.*, 1994; Zhou и Paulitz, 1994; Liu *et al.*, 1995; Leeman *et al.*, 1996; Benhamou *et al.*, 1998]. Эти бактерии, образующие колонии на корнях и семенах, и защищающие растения от листовых заболеваний, включают *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus* и *Serratia marcescens* [Liu *et al.*, 1995; Raupach *et al.*, 1996; Kloepper *et al.*, 1999; Pieterse *et al.*, 2002].

Было установлено, что летучие соединения некоторых штаммов ризобактерий провоцируют стимуляцию роста и индуцируют системную резистентность у растений с помощью сигнальных путей цитокинина и этилена [Kloepper, 2003; Ryu *et al.*, 2004].

1.3.3. Действие ЛОС на цианобактерии

Цианобактерии являются фототрофными кислородными прокариотами. Было обнаружено, что цианобактерии сами синтезируют летучие вещества. Были выделены β -ионон, геосмин, терпеноиды, продуцируемые также растениями. Летучие соединения, такие как β -циклоцитрал, геосмин и 2-метилизоборнеол, выделенные цианобактериями, обладают литической активностью против других цианобактерий, штаммов *Microcystis*, *Anabaena* и *Synechocystis* [Harada, 2009], а также активностью в отношении бактерий, грибов, простейших, водорослей и вирусов [Abed *et al.*, 2009].

Исследования, проведенные Wright и Thompson (1985) при изучении летучих соединений, выделяемых бактериями *Bacillus* spp., показывают, что эти вещества ингибируют рост и вызывают лизис цианобактерий *Anabaena* spp. Было выяснено, что антагонистическая способность бацилл в отношении цианобактерий напрямую зависит от степени роста *Bacillus* и сопряжена с периодом споруляции бактерий. Кроме того, в этой работе показано, что антагонистический эффект уменьшался при понижении температуры до 20°C и в присутствии древесного угля или почвы при нормальной температуре (30°C) [Wright и Thompson, 1985].

Эти данные были подтверждены при исследовании воздействия летучих веществ *Bacillus* spp. на цианобактерии *Anabaena variabilis* [Wright *et al.*, 1991]. В исследовании этих авторов было обнаружено более 50 летучих веществ класса альдегидов, спиртов с разветвленной и неразветвленной углеродной цепью, пиразинов, сульфосоединений, кетонов, алифатических и ароматических углеводородов, хлорсодержащих соединений, фуранов, в том числе 3-метилбутаналь, бензальдегид, 3-метил-1-бутанол.

1.3.4. Действие ЛОС на фитопатогенные бактерии

Штаммы *Agrobacterium tumefaciens* вызывают корончатые галлы у многих двудольных зерновых культур, а штаммы *Agrobacterium vitis* в основном у винограда. Штаммы *Pseudomonas fluorescens* и *Serratia plymuthica* IC1270, являющиеся антагонистами фитопатогенных грибов, значительно подавляют развитие корончатых галлов у саженцев томата при обработке ими растений до инфицирования патогенами [Dandurishvili *et al.*, 2011]. Было выяснено, что рост штаммов *A. tumefaciens* и *A. vitis* подавляется при воздействии ЛОС, выделяемых этими бактериями-антагонистами дикого типа и их мутантами, лишенными синтеза антибиотиков пирролнитрина и 2,4-диацетилфлороглюцинола [Dandurishvili *et al.* 2011], это свидетельствует о том, что, кроме антибиотиков, при взаимодействии с фитопатогенными бактериями рода *Agrobacterium* у штаммов *P. fluorescens* и *S. plymuthica* IC1270 работает механизм антагонизма, связанный с ингибиторным действием ЛОС. С помощью масс-спектрометрии удалось выяснить, что основным по количеству веществом в смеси летучих соединений, продуцируемых штаммом *S. plymuthica* IC1270, является диметилдисульфид (ДМДС) [Dandurishvili *et al.* 2011].

Еще не установлено, как ДМДС или другие летучие вещества, выделяемые бактериями-антагонистами, воздействуют на образование корончатого галла. Наблюдаемый исследователями эффект биоконтроля заключался в основном в уменьшении размера опухоли, что не может быть объяснено только бактериостатическим эффектом летучих веществ на *Agrobacterium*. Тем не менее, механизмы действия ЛОС могут быть связаны со способностью некоторых из них нарушать определенные уровни и соотношения фитогормонов у растений, являющихся важными факторами в формировании корончатого галла [Zhang *et al.*, 2007].

У бактерий *Burkholderia cepacia* уменьшается степень типичного окрашивания колоний под воздействием летучих веществ *Serratia odorifera* и *Serratia plymuthica*, что иллюстрирует способность летучих соединений бактериального происхождения влиять на метаболизм бактерий, патогенных для человека [Kai *et al.*, 2009].

1.3.5. Действие ЛОС на животных и протистов

Так как летучие вещества ризобактерий влияют на рост грибов и растений, далее предметом изучения стало их воздействие на обитающих в почве животных и простейших. Простейшие *Acanthamoeba castellanii* и *Paramecium caudatum* являются доминантными почвенными организмами (1.6×10^5 особей на грамм почвы), питающимися бактериями. При этом *E. coli* и *Stenotrophomonas maltophilia* подходят в качестве питания для *A. castellanii*, а бактерии *Staphylococcus epidermidis*, *S. marcescens* и *Pseudomonas aeruginosa* не подходят [Wang и Ahearn, 1997]. Хотя до сих пор не существует единого мнения, не исключено, что летучие вещества бактерий имеют прямое отношение к пригодности того или иного вида бактерий в качестве пищи для *A. castellanii*. Летучие соединения *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *S. odorifera* и *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* отрицательно влияют на рост простейших *A. castellanii* и *P. caudatum* [Kai et al., 2009].

Другими обитателями почвы являются нематоды, например, свободноживущая питающаяся бактериями нематода *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* обитает в почве и на границе водно-воздушного раздела, и, таким образом, может взаимодействовать и с растворимыми в воде, и с летучими соединениями, которые, вероятно, на нее влияют. Бактерии рода *Pseudomonas* и другие бактерии продуцируют диацетил, спирты, кетоны с короткой углеродной цепью, сложные эфиры в качестве продуктов метаболизма, которые могут действовать на *C. elegans* как хемоаттрактанты [Bargmann et al., 1993].

Было установлено, что *C. elegans* обладает двумя типами хемочувствительных нейронов, способных реагировать на летучие аттрактанты [Sengupta et al., 1996]. Каждая пара нейронов откликается на несколько разных соединений: одни чувствительны к диацетилену, пиразину, тиазолу, другие активируются бензальдегидом, бутанолом, изоамиловым спиртом и тиазолом.

У свободноживущей нематоды *Panagrellus redivivus* и сосновой древесной нематоды *Bursaphelenchus xylophilus* под воздействием таких ЛОС, как фенол, октанол, бензальдегид, бензилацетальдегид, деканаль, 2-нонанон, 2-деканон, циклогексен и ДМДС снижается подвижность или происходит гибель нематод. Таким образом, восприимчивость нематод к тем или иным комбинациям соединений иллюстрирует видоспецифическую реакцию на отдельные вещества. Поэтому изоляты определенных бактерий могут быть потенциальными агентами для эффективного биоконтроля численности нематод [Kai et al., 2009].

Также в литературе есть примеры влияния ЛОС бактерий на насекомых. Было показано, что беременные самки комара *Aedes aegypti* предпочитают откладывать яйца там, где присутствуют протеобактерии, синтезирующие летучие вещества такие, как

карбоновые кислоты и метиловые сложные эфиры [Ponnusamy *et al.*, 2008]. Другим примером является выбор места яйцекладки в зависимости от присутствия тех или иных летучих веществ бактерий у беременных самок малярийного комара *Anopheles gambiae* [Huang *et al.*, 2006]. Знания о биологически активных летучих соединениях бактерий и их смесей, а также о соответствующих стимулирующих концентрациях могут быть полезны для изучения эпидемиологии насекомых и с точки зрения их применения против увеличения численности комаров.

Вышеприведенные примеры указывают на влияние летучих веществ бактерий на рост и поведение беспозвоночных. Эффекты бактериальных ЛОС на позвоночных животных или соответствующие клеточные культуры были описаны в статье [Kurita-Ochiai *et al.*, 1995]. Было показано, что летучие органические кислоты (например, масляная кислота, пропионовая кислота, валериановая и изовалериановая кислоты), продуцируемые бактериями *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii* и *Fusobacterium nucleatum*, обитающими на периодонте, уменьшают пролиферацию лимфоцитов и выделение цитокина [Kurita-Ochiai *et al.*, 1995].

1.4. Малоизученные аспекты и перспективы биоконтроля заболеваний растений

Исследование бактерий-антагонистов с позиции рассмотрения выделения ими летучих метаболитов открывает новые и интересные аспекты в понимании физиологии и характеристики этих микроорганизмов. Многие бактериальные ЛОС оказалось невозможным идентифицировать с помощью баз данных.

Различные биотические и/или абиотические факторы могут вызывать ощутимые эмиссии ЛОС у многих видов растений. Встают вопросы о возможности спровоцировать бактерии для выделения большего количества ЛОС, влиянии питательных сред на эмиссию ЛОС бактериальными штаммами. Интересно определить, как изменения условий культивирования бактерий влияют на состав выделяемых смесей [Ryu *et al.*, 2004].

Было показано, что в корнях растений в качестве вторичных метаболитов тоже продуцируются и выделяются ЛОС [Steeghs *et al.*, 2004]. Сесквитерпеновые лактоны в экссудатах корней различных сельскохозяйственных зерновых культур стимулируют развитие сорняков-паразитов *Striga* и *Orobanche* и вызывают ветвление гиф арбускулярных микоризных грибов при низких концентрациях [Bouwmeester *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2005]. В литературе есть данные о том, что (Е)-кариофилен действует как летучее вещество, выделяемое из корней, привлекая нематод к корням маиса [Rasmann *et al.*, 2005].

Живые организмы используют ЛОС в качестве сигнальных веществ для синхронизации определенных процессов, таких как споруляция, провоцируемая геосмином

[Schölller *et al.*, 2002] внутри организма, изменение численности популяции или для воздействия на другие организмы, обитающие в окружающей среде [Stahl и Parkin 1976]. Грамотрицательные бактерии применяют для передачи сигналов N-ацилгомосеринлактоны (N-АГЛ), остатки жирных кислот (метиловый эфир 3-гидроксипальмитиновой кислоты, цис-ненасыщенные жирные кислоты), циклические дипептиды, а грамположительные бактерии – аминокислоты, модифицированные пептиды или гамма-бутиролактоны (*Streptomyces* spp.). К другим известным сигналам относятся метил-2,3,3,4-тетрагидрокси-γ-бутиролактон, индол, квинолоны, S-3-гидрокситридекан-4-он [Ryan и Dow, 2008]. Поэтому для фундаментальных исследований еще одним перспективным направлением является изучение зависимости антагонистической активности бактерий от различных типов регуляции и сигналинга.

Исходя из литературных данных, наиболее перспективными ЛОС для дальнейших исследований с целью использования в агробиотехнологии являются сульфосоединения, особенно диметилдисульфид (ДМДС), изопрен, ацетон, бутанол, фенилэтанол, декан, деканаль, додекан, 2-ундеканон, 2-тридеканон и 2-тридекан-1-ол.

О синтезе летучих сульфосоединений и степени их эффективности против почвенных патогенов известно пока мало. Тем не менее, эти летучие соединения находятся в поле зрения исследователей. Синтез летучего серосодержащего соединения ДМДС в настоящее время активно исследуется в качестве альтернативы фумигации почвы с использованием бромистого метила. Также предполагается, что ДМДС действует в качестве природного фумиганта и играет роль в естественной защите растений [Kyung и Lee, 2001]. Недавно началось тестирование ДМДС в качестве нового предпосевного почвенного фумиганта под торговой маркой PALADIN [Dandurishvili *et al.*, 2010].

2. Биоконтроль и Quorum sensing регуляция

У многих бактерий важную роль в продуцировании вторичных метаболитов и экзоферментов играет особый тип регуляции экспрессии бактериальных генов Quorum sensing (QS) [Miller *et al.*, 2001; Pierson *et al.*, 1998]. Бактерии используют QS систему межклеточных коммуникаций для координации экспрессии генов и управления процессами, участвующими в регуляции вирулентности, продуцировании антибиотиков, образовании биопленок. Кроме того, бактерии чувствительны к сигнальным молекулам, синтезированным другими организмами, и таким образом имеют возможность реагировать на сигналы и изменения метаболизма организмов, находящихся непосредственно в их среде обитания [Хмель, 2006].

Для функционирования QS-систем необходимы два компонента, включающие сигнальные молекулы с низкой молекулярной массой, легко проходящие через мембраны клеток, так называемые аутоиндукторы, и взаимодействующие с ними рецепторные белки, выполняющие регуляторные функции. Аутоиндукторы могут быть разной химической природы [Хмель, 2006]. Сигнальные молекулы, аутоиндукторы, продуцируемые бактериями, структурно различаются, однако, многие из них являются соединениями с малыми молекулярными массами, которые потенциально могут быть летучими.

Концентрация аутоиндукторов в среде находится в прямой зависимости от количества бактерий. По мере того, как популяция достигает критического уровня численности, аутоиндукторы накапливаются до необходимого порогового значения, что приводит к активации определенных генов и оперонов. Происходит это благодаря взаимодействию аутоиндукторов с соответствующими рецепторными белками. Комплексы рецепторный белок-аутоиндуктор ассоциируют с промоторными областями генов и оперонов, что приводит к индукции их экспрессии [Хмель, 2006].

В качестве аутоиндукторов QS-систем бактерии используют широкий спектр химических соединений. К сигнальным молекулам относятся различные N-ацилгомосеринлактоны (АГЛ). Такие молекулы состоят из гомосеринлактонного кольца и боковой ацильной цепи. АГЛ различаются длиной ацильной цепи и присутствием замещающих группировок в ацильных цепях. Эти свойства обуславливают специфичность действия АГЛ [Хмель с сотр., 2002; Veselova *et al.*, 2003; Хмель, 2006].

QS является ключевой регуляторной системой, взаимодействующей со многими другими регуляторами [Girard и Bloemberg, 2008]. N- ацил-гомосеринлактоны действуют как сигналы глобальной регуляции в природе. У многих бактерий, в том числе у некоторых штаммов *Pseudomonas aureofaciens*, *P. aeruginosa* и *Serratia*, синтез АГЛ находится под контролем двухкомпонентной сигнальной системы типа GacA/GacS [Chancey *et al.*, 1999; Reimann *et al.*, 1997]. От глобальной регуляции GtrA/GtrS (гомолог GacA/GacS системы) зависит синтез АГЛ штаммом *Serratia* IC1270 [Ovadis *et al.*, 2004]. Глобальные регуляторы экспрессии генов GtrA/GtrS-система и субъединица сигма S РНК-полимеразы воздействуют на QS регуляцию образования биопленок у ризосферных бактерий *Serratia plymuthica* IC1270. Инактивация генов *grrS* и *rpoS* приводит к снижению образования биопленок в 6–7 и 4–5 раз соответственно [Зайцева с соавт., 2009].

Штамм *S. plymuthica* IC1270 выступает в качестве агента биоконтроля и подавляет рост различных фитопатогенов, включая *R. solani* и *Pythium aphanidermatu*. В условиях теплицы *S. plymuthica* IC1270 эффективно защищает бобовые ростки от корневой гнили, вызываемой грибом *R. solani*, и ростки огурца от *Pythium aphanidermatum* [Chernin *et al.*,

1995; Ovadis *et al.*, 2004]. У мутантов *Serratia* IC1270, дефектных по генам *grrA*, *grrS* или *rpoS*, резко снижается синтез ацилгомосеринлактонов, синтезируемых диким типом *Serratia* IC1270, что свидетельствует о косвенном влиянии глобальных регуляторов GrrA/GrrS и RpoS на функционирование Quorum Sensing системы у этого штамма и на его антагонистическую активность [Ovadis *et al.*, 2004]. Неспособность *rpoS* мутанта штамма *S. plymuthica* IC1270 продуцировать АГЛ свидетельствует также о взаимосвязи между сигма фактором RpoS и QS у бактерий [Flavier *et al.*, 1998].

Однако, по другим данным, у штамма *P. putida* WCS358 RpoS не вовлечен в регуляцию синтеза АГЛ [Kojic *et al.*, 1999]. Мутанты, дефектные по гену *rpoS*, не отличаются по накоплению сигнальных молекул АГЛ от дикого типа у *Burkholderia cepacia* [Aguilar *et al.*, 2003], тогда как для *Pseudomonas aeruginosa* такие мутанты демонстрируют повышенный уровень транскрипции генов QS [Whiteley *et al.*, 2000]. Таким образом, дальнейшее изучение взаимодействия QS-систем и других глобальных регуляторов у различных родов бактерий перспективно для установления роли клеточных механизмов в антагонистической активности бактерий.

Знание механизмов и регуляции клеточных процессов являются ключевыми для создания и внедрения стратегий биоконтроля. В работе Muller *et al.* (2008) изучалось влияние коммуникаций микроорганизмов, индуцированных АГЛ, на активность бактерий в области биоконтроля. Было показано, что сигналы, обусловленные АГЛ, играют роль в способности бактерий *S. plymuthica* HRO-C48 подавлять фитопатогенный гриб *Verticillium dahliae*. Впервые была выявлена регуляторная функция АГЛ в синтезе индолил-3-уксусной кислоты, гормона роста растений. Кроме того, было выяснено, что *S. plymuthica* HRO-C48 выделяет широкий спектр летучих органических соединений, обладающих противогрибковой активностью и, что интересно, относительное количества которых находится под QS регуляцией [Muller *et al.*, 2008]. Таким образом, QS играет важную роль в экспрессии генов, обеспечивающих способность штаммов *S. plymuthica* к биоконтролю.

3. Нейротоксичная небелковая аминокислота бета-N-метиламин-L-аланин и ее роль в биологических системах

Небелковые аминокислоты (НБА), синтезируемые растениями и микроорганизмами, являются биологически активными веществами, выполняющими защитные (ответ на стресс) и регуляторные (передача сигналов) функции. Идентифицированы сотни молекул НБА, около 250 их разновидностей найдено в растениях [Vranova *et al.*, 2011]. НБА влияют на взаимодействие организмов с окружающей средой, служат значительным резервом органического азота во многих экосистемах, некоторые разновидности НБА являются

фитосидерофорами [Zhang *et al.*, 1991; Shenker *et al.*, 2001]. НБА обнаруживают не только в живых организмах, но и в среде их обитания - почве, торфе, осадочных породах, в водоёмах [Casagrande и Given, 1980; Kvenvolden *et al.*, 1971]. Молекулы НБА могут оказывать существенное негативное воздействие на организмы животных и человека, накапливаясь в цепях питания.

Функции НБА в метаболизме их продуцентов изучены пока недостаточно. Предполагается, что эти молекулы могут быть сигнальными и участвовать в регуляции экспрессии генов в популяции. Хелаторные свойства НБА могут помогать растениям и микроорганизмам связывать ионы металлов в условиях их дефицита. Токсические свойства НБА могут использоваться для контроля численности собственной популяции в меняющихся условиях окружающей среды или для борьбы с конкурентами для подавления их роста и развития.

С точки зрения экотоксикологии большой интерес представляет небелковая аминокислота β-метиламин-L-аланин (БМАА), обнаруженная в 1967 году [Vega и Bell, 1967] и способствующая, как полагают, развитию некоторых нейродегенеративных заболеваний у человека [Spencer *et al.*, 1987; Bradley и Mash, 2009]. В начале 2000-х годов было доказано [Cox *et al.*, 2003], что БМАА могут в заметных количествах продуцировать цианобактерии - древнейшие фотоавтотрофные бактерии, распространенные повсеместно в водных и наземных экосистемах. Благодаря разработанным молекулярно-генетическим методам исследований цианобактерии хорошо изучены: в настоящее время доступна информация о геномах нескольких десятков видов [Кокшарова, 2010].

3.1. Продуценты и пути распространения БМАА

Впервые БМАА был выделен из семян растения *Cycas circinalis* [Vega и Bell, 1967]. Это растение включено в рацион питания коренных жителей острова Гуам, в популяции которых было обнаружено превышение числа случаев нейродегенеративных заболеваний в 50-100 раз по сравнению с среднемировым уровнем [Spencer *et al.*, 1987]. Связанные с белками молекулы БМАА обнаружили в мозге жителей Гуам, умерших от болезни Альцгеймера и бокового амиотрофического склероза (БАС) [Bradley *et al.*, 2009]. Средняя концентрация аминокислоты была значительна - 627 мкг на 1 г тканей мозга. При анализе этой проблемы цианобактерии рассматривали как наиболее вероятные продуценты БМАА. Известно, что цианобактерии, продуцирующие токсичные вторичные метаболиты, часто бывают симбионтами растений. БМАА действительно был найден в колониях симбиотических цианобактерий из родов *Nostoc* и *Anabaena* [Murch *et al.*, 2004], локализованных в боковых корнях *C. circinalis* [Cox *et al.*, 2003]. Как показали дальнейшие

исследования, в пищевых цепях экосистемы острова Гуам происходит биоаккумуляция БМАА [Cox *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2004]. Так концентрация БМАА растёт при переходе от цианобактерий (0,3 мкг/л) к семенам саговниковых (до 1160 мкг/л), а затем к марианской летучей лисице *Pteropus mariannus mariannus* (3560 мкг/л), которую аборигены острова считают деликатесом.

Впоследствии случаи регистрации БМАА в колониях различных видов цианобактерий были отмечены в Южной Африке [Esterhuizen и Downing, 2008], Перу [Johnson *et al.*, 2008], США [Brand *et al.*, 2010], в шведской акватории Балтийского моря [Jonasson *et al.*, 2010], в Германии [Contardo-Jara *et al.*, 2014], Португалии [Cervantes Cianca *et al.*, 2012], Великобритании [Metcalf *et al.*, 2008], на Гавайях [Banack *et al.*, 2007], в Индии и Австралии [Cox 2005]. Различные исследователи независимо друг от друга обнаружили БМАА в цианобактериях, выделенных из морской, пресноводной и наземной сред обитания [Banack *et al.*, 2007; Esterhuizen и Downing, 2008; Downing *et al.*, 2011; Metcalf *et al.*, 2008; Spáčil *et al.*, 2009]. Недавно сообщили, что БМАА могут продуцировать не только цианобактерии, но, вероятно, и другие представители фитопланктона, в частности, диатомовые водоросли и динофлагелляты [Jiang *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2014; Faassen, 2014]. Не исключено, что растения способны образовывать и накапливать БМАА и самостоятельно, в отсутствие цианобактерий. Так, БМАА обнаружили в разных тканях растения *Cycas micronesica*, лишённого симбиотических цианобактерий, причем основная масса БМАА (75%) накапливалась в тканях корней [Marler *et al.*, 2010].

Таким образом, есть экспериментальные свидетельства того, что БМАА может образовываться в клетках разных групп фотоавтотрофных организмов - высших растений, цианобактерий, диатомовых водорослей, динофлагеллят. Из фитопланктона по цепи питания БМАА попадает в зоопланктон, в клетки беспозвоночных животных (мидий, устриц, креветок), накапливается в мозге и мышечной ткани рыб [Jonasson *et al.*, 2010], а затем эта аминокислота может попасть в организмы высших животных и человека.

3.2. Методы обнаружения БМАА в биологических образцах

Впервые небелковая аминокислота БМАА была идентифицирована в 1967 с помощью катионной обменной хроматографии из спиртовых экстрактов семян древнего растения семейства саговниковых цикас завитой (*Cycas Circinalis*) [Vega и Bell, 1967]. С пониманием того, что природным источником БМАА являются цианобактерии [Cox *et al.* 2003, 2005] возник большой интерес исследователей к анализу различных потенциально опасных штаммов на предмет идентификации БМАА. Оказалось, что эти исследования давали противоречивые результаты в плане условий обнаружения и количественного

определения этого цианотоксина [Esterhuizen и Downing 2008; Faassen *et al.* 2009; Jonasson *et al.* 2010; Metcalf *et al.* 2008; Rosen и Hellenäs 2008].

Для идентификации БМАА использовали методы аминокислотного анализа, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием [Cox *et al.* 2005; Metcalf *et al.* 2008], газовую хроматографическую масс-спектрометрию [Duncan, 1991; Esterhuizen и Downing 2008; Guo *et al.* 2007; Pan *et al.* 1997], электрофорез [Baptista *et al.*, 2011] и ультра-высокоэффективную жидкостную хроматографию - тандемную масс-спектрометрию [Jonasson *et al.*, 2010; Spacil *et al.*, 2009]. Общим для нескольких этих методов является использование этапа дериватизации с б-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбаматом, позволяющей детектировать БМАА [Banack *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2013, 2014; Jonasson *et al.*, 2010; Murch *et al.*, 2004]. Такая дериватизация увеличивает массу искомого БМАА, что приводит к улучшению соотношения сигнал-шум и ответа на ионизацию электроспреем. Это достигается увеличением активности поверхности БМАА и уменьшением полярности для разделения с помощью обратной фазы высокоэффективной жидкостной хроматографии [Jiang *et al.*, 2013]. В нескольких исследованиях вместо этого подхода использовалась дериватизация с пропилхлороформом (EZfaast, Phenomenex, Torrance, CA) или с дансилхлоридом и масс-спектрометрический анализ [Downing *et al.*, 2014; Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011; Esterhuizen и Downing, 2008; Salomonsson *et al.* 2013]. Кроме того, методы без этапа дериватизации, основанные исключительно на масс-спектрометрическом анализе с разделением с помощью гидрофильной хроматографии иногда не позволяли обнаружить БМАА в цианобактериальных образцах [Rosen и Hellenäs, 2008], а иногда аккуратно определяли эту аминокислоту [Faassen *et al.*, 2009, 2012]. В целях улучшения методологии определения БМАА было проведено сравнительное исследование аналитических возможностей метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием (метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием) и метода жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (метод ЖХ/МС/МС) [Faassen *et al.*, 2012]. Исследование показало, что метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием оказался менее точным для аминокислотного анализа в сложных биологических образцах и может переоценить концентрации БМАА. Метод ЖХ/МС/МС оказался более точным [Faassen *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012]. Одновременно другая научная группа сообщила, что метод ЖХ/МС/МС недооценивает концентрации БМАА в связи с образованием аддуктов и металлических комплексов БМАА в отсутствие этапа дериватизации [Glover *et al.*, 2012]. Недавно были проведены сравнения результатов методов ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием и ЖХ/МС/МС с использованием дериватизации с б-аминохинолил-N-

гидроксисукцинимидилкарбаматом и было обнаружено, что оба метода дают одинаковые концентрации БМАА [Mondo *et al.*, 2014]. Сейчас метод ЖХ/МС/МС с использованием дериватизации с 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбаматом является наиболее часто используемым методом при анализе БМАА.

Важным аспектом при идентификации БМАА в биологических образцах является способ, с помощью которого проводится экстракция. Методики экстракции варьируют в работах разных авторов. В большинстве исследований используется преципитация (осаждение) белков [Banack и Cox, 2003; Banack *et al.*, 2007; 2011; Cox *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2014] или катион-обменная твердофазная экстракция с целью удаления мешающих соединений [Jonasson *et al.*, 2010; Lage *et al.*, 2015; Spacil *et al.*, 2009]. Недавно было проведено исследование, поставившее своей целью сравнить эффективность трех используемых методов экстракции БМАА из культур цианобактерий и диатомовых водорослей [Lage *et al.*, 2015]. Среди них адаптированный метод твердофазной экстракции, первый метод, упоминавшийся для экстракции БМАА из водных организмов [Jonasson *et al.*, 2010; Spacil *et al.*, 2009]; метод преципитации белков, позволивший впервые экстрагировать БМАА из диатомовых водорослей [Jiang *et al.*, 2014], и метод преципитации белков трихлоруксусной кислотой (ТХУ), наиболее используемый в исследованиях БМАА [Murch *et al.*, 2004]. Для последнего из упомянутых методов [Murch *et al.*, 2004], ряд концентраций ТХУ проверялись на предмет уточнения оптимальной концентрации [Cohen, 2012], достаточной для полной преципитации белков. Кроме того, исследовалась эффективность дериватизации с использованием с 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбамата. Вариабильность образования БМАА диатомовыми водорослями и цианобактериями сравнивалась в этом исследовании посредством количественного определения БМАА в различных видах и штаммах с использованием метода преципитации белков с помощью ТХУ. Этот метод оказался по мнению авторов, наиболее эффективным.

Для определения БМАА в природных водных образцах был использован метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (^1H NMR) [Moura *et al.*, 2009]. Этот токсин экстрагировали из образцов с помощью твердо-фазной экстракции и идентифицировали с помощью ЯМР без этапов дериватизации. Минимальный уровень определения БМАА составил 5 мкг/мл. Этот метод авторы рассматривают как достаточно быстрый и эффективный для обнаружения БМАА в природных биологических образцах.

3.3. Биосинтез, биотрансформация и транспорт БМАА

БМАА в цианобактериях регистрировали как в свободной, так и в связанной с белками формах. Данные об их концентрациях характеризуются существенным разбросом [Cox *et al.*, 2005; Esterhuizen и Downing, 2008,]. По-видимому, синтез БМАА может зависеть от условий и фазы роста культуры, даже в однотипной культуре, особенно в состоянии стресса [Downing *et al.*, 2011].

Детальные механизмы синтеза БМАА в клетках цианобактерий и растений достоверно пока не известны. Двухступенчатая схема биосинтеза БМАА, в которой цистеин, фосфосерин, о-ацетилсерин или цианоаланин являются возможными начальными соединениями, была предложена на основе данных об экспрессии генов, кодирующих ферменты (в т.ч. цистеинсинтазу и метилтрансферазу), в *Cyca rumphii* [Brenner *et al.*, 2003]. Эта гипотеза предполагает (1) нуклеофильное присоединение аминокислотной группы и (2) ее последующее метилирование метилтрансферазой. На первой стадии предположительно происходит перенос аммиака из среды на β -атом углерода аланина (цистеина, фосфосерина, О-ацетилсерина или цианоаланина), в реакции, катализируемой ферментом, сходным с цистеинсинтазой. На следующей ступени происходит метилирование с участием S-аденозилметионина, действующего в качестве донора метильной группы [Brenner *et al.*, 2003].

Данных об условиях синтеза БМАА в цианобактериях пока очень мало [Downing *et al.*, 2011]. Если в среду роста цианобактерий *Microcystis* PCC 7806 и *Synechocystis* J341 добавить меченый аммоний $^{15}\text{NH}_4^+$, то в нормальных условиях изотоп детектируется только в белковых аминокислотах [Downing *et al.*, 2011]. И только в условиях азотного голодания меченый атом азота обнаруживается в составе БМАА [Downing *et al.*, 2011]. Возможно, синтез БМАА в цианобактериях усиливается при недостатке азота.

Механизмы аккумуляции и трансформации БМАА в растениях и животных изучены также недостаточно [Baines *et al.*, 2005; Brenner *et al.*, 2000; Coleman *et al.*, 1997; Downing *et al.*, 2015]. Известно, что при биотрансформации ксенобиотиков в клетках растений происходит процесс их модификации с образованием водорастворимого соединения путем ковалентного связывания со специфическими гидрофильными молекулами (например, глюкозой, малонатом, глутатионом) и последующим заключением этого соединения в вакуоли или апопласты [Coleman *et al.*, 1997]. Обнаруженное в клетках *C. demersum* снижение внутриклеточной концентрации БМАА в отсутствие выброса токсина обратно в среду, возможно, свидетельствует о биотрансформации БМАА в этом водном растении [Downing *et al.*, 2015]. Радиоизотопный метод с использованием L-БМАА-4,4,4- D_3 , $^{15}\text{N}_2$ показал, что пресноводные моллюски *Anadonta cygnea*, *Unio tumidus*, *Dreissena polymorpha*

и *Corbicula javanicus* поглощают БМАА из окружающей среды [Downing *et al.*, 2014]. Наиболее вероятно, что БМАА транспортируется внутрь клеток мидий с помощью белков-транспортеров, общих для аминокислот [Peuthert *et al.*, 2007]. Так как количество поглощенного из среды БМАА значительно превышало количество токсина в тканях, авторы [Downing *et al.*, 2014] предположили (без указания точных механизмов), что БМАА мог встроиться в белки, подвергнуться катаболизму или модифицироваться.

Возможность поглощения БМАА из внешней среды доказана для многих растений, в том числе *Triticum aestivum*, *Nasturtium officinale*, *Daucus carota* [Contardo-Jara *et al.*, 2014; Tegeder, 2012]. Транспорт аминокислот в клетки растений происходит с помощью мембранных белков, которые находятся в корнях, ксилеме, флоэме, мезофилле листьев, эндосперме семян и в фитостоловых клетках (меристемах) [Tegeder и Rentsch 2010]. Некоторые из аминокислотных транспортеров специфичны (например, для глутамата), в то время как другие способны транспортировать широкий спектр аминокислот [Tegeder, 2012]. Известно, что БМАА способен вступать в реакцию с ионами бикарбоната в физиологических концентрациях в клетках эукариот, образуя стабильное соединение β -карбамат, обладающее структурным сходством с глутаматом (Рисунок 1), лигандом глутаматного рецептора [Weiss *et al.*, 1988; Nunn и O'Brien, 1989; Myers и Nelson, 1990].

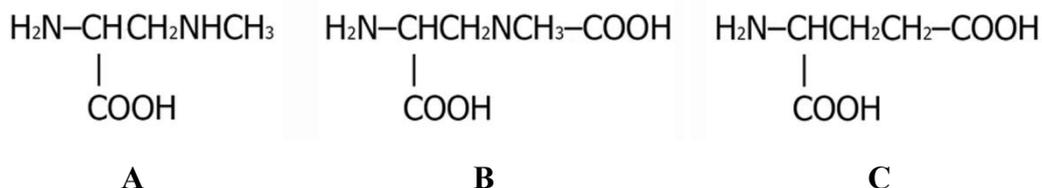


Рисунок 1. Строение молекул БМАА (А), β -карбамата (В) и глутамата (С)

Учитывая, что БМАА и его карбамат являются агонистами глутаматных рецепторов, можно предположить, что БМАА попадает в ткани растений с помощью транспортера глутамата [Contardo-Jara *et al.*, 2014]. Цианобактерии *S. PCC 6803* и *Nostoc PCC 7120* быстро поглощают БМАА пропорционально его концентрации [Berntzon *et al.*, 2013; Downing *et al.*, 2012,]. Для этих штаммов транспортные системы аминокислот подробно охарактеризованы [Quintero *et al.*, 2001, Montesinos *et al.*, 1995]. Для *N. PCC 7120* описаны три транспортные системы для аминокислот [Montesinos *et al.*, 1995]. Глутамат переносится в клетки всеми тремя транспортерами *N. PCC 7120* [Pernil *et al.*, 2008]. Интересно, что две транспортные системы (Bgt и N-II) присутствуют и в вегетативных клетках, и в гетероцистах, а гены, кодирующие транспортер NI, экспрессируются только в вегетативных клетках [Picossi *et al.*, 2005]. Принимая во внимание сходство БМАА и его производного, β -карбамата, с глутаматом (Рисунок 1), а также нейтральность молекулы БМАА в физиологических

условиях, можно предположить, что БМАА транспортируется в клетки цианобактерий при помощи транспортеров N-I или N-II. Эксперименты по поглощению БМАА мутантами *N. PCC 7120* и *S. PCC 6803* по генам, кодирующим соответствующие транспортные системы, могли бы помочь в изучении механизмов транспорта БМАА в клетки цианобактерий.

3.4. Действие БМАА на клетки эукариот и прокариот

Действие БМАА на клетки эукариот и прокариот плеiotропно (Рисунок 2). Наиболее изучено действие БМАА на клетки млекопитающих. В клетках человека БМАА ошибочно включается в белки вместо L-серина [Dunlop *et al.*, 2013]. Такое включение приводит к неправильному фолдингу и/или невозможности фосфорилирования ряда белков (по аминокислотным остаткам таким как серин, треонин, тирозин и гистидин) в клетках, что приводит к их дисфункции и провоцирует нейродегенеративные заболевания. У одних людей БМАА приводит к заболеванию БАС, у других проявляются симптомы болезни Паркинсона и деменции, а у некоторых наблюдаются симптомы всех трех расстройств [Plato *et al.*, 2003].

БМАА вызывает нарушение функции двигательных нейронов у приматов [Rodgers *et al.*, 2014; Spencer *et al.*, 1987], неврологические изменения у мышей, крыс и кур [Rodgers *et al.*, 2014, Seawright *et al.*, 1990]. Скорость развития нейромоторной дисфункции у приматов немонотонно зависит от дозы БМАА, поэтому механизм хронической токсичности БМАА может отличаться от механизма кратковременного токсического эффекта БМАА [Spencer *et al.*, 1987].

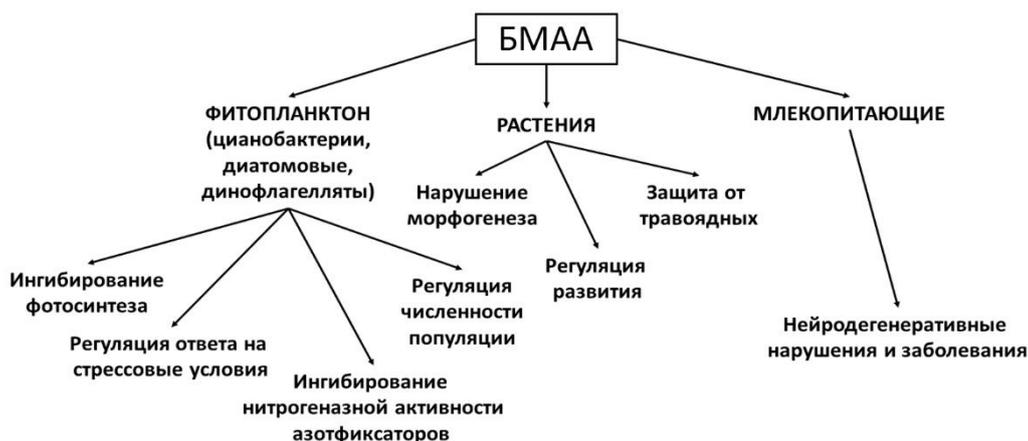


Рисунок 2. Эффекты воздействия БМАА на различные организмы

Показано, что некоторые виды рыб, мидий и крабов содержат необычно высокое количество БМАА [Brand *et al.*, 2010; Jonasson *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2014]. Острый токсический эффект БМАА выявлен у *Danio rerio*. Действие токсина на эмбрионы этой

рыбы приводит к неправильному формированию оси позвоночника, быстрым мышечным сокращениям у личинок и их гибели [Purdie *et al.*, 2009b]. БМАА приводит к потере способности к фототаксису и гибели рачка артемии (*Artemia salina*) [Purdie *et al.*, 2009a]. Сильное нейротоксическое действие оказывает БМАА на насекомых, вызывая серьезные нарушения моторных функций и гибель плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*) [Goto *et al.*, 2012] и высокий уровень смертности пчел (*Apis mellifera*) [Okle *et al.*, 2013a].

Экотоксикологические исследования на *C. demersum* показали, что БМАА способен ингибировать антиоксидантные ферменты (каталазу, пероксидазу, глутатионредуктазу, супероксиддисмутазу) и глутатион-S-трансферазу, требующуюся при биотрансформации цианобактериальных токсинов - микроцистинов [Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011; Pflugmacher *et al.*, 1998].

При действии на *Arabidopsis* БМАА вызывает нарушения морфогенеза: двух-трехкратное увеличение длины гипокотыля и ингибирование открытия семядолей в ходе раннего развития всходов. Эффект БМАА на удлинение гипокотыля проявляется только на свету. Воздействие БМАА на ранние стадии морфогенеза *Arabidopsis* может быть нейтрализовано присутствием глутамата, природного агониста iGluR (ионотропного глутаматного рецептора) животных [Brenner *et al.*, 2000]. Интересно, что БМАА вызывает удлинение гипокотыля в *Arabidopsis* на свету только при низких концентрациях (20-50 мкМ) [Brenner *et al.*, 2000], что может указывать на возможность сигнальной роли БМАА в растениях.

Экзогенный БМАА существенно и пропорционально концентрации (в диапазоне 4,2–42 мкМ) ингибирует рост культуры цианобактерии *S. PCC6803* и ведет к значительной потере фотосинтетических пигментов [Downing *et al.*, 2012]. Аналогичные эффекты наблюдались в присутствии другой небелковой аминокислоты, 2,4-диаминомасляной кислоты, но в меньшей степени. Эффект этих аминокислот значительно снижается при уменьшении интенсивности света с 16 до 10 мкМ фотонов м⁻² с⁻¹. При этом аминокислоты L-аргинин, L-аспарагин, L-глутамат и глицин не влияют на рост цианобактериальной культуры и пигментацию клеток [Downing *et al.*, 2012]. При воздействии на азотфиксирующую цианобактерию *N. sp. PCC 7120* БМАА ингибирует нитрогеназную активность и стимулирует аккумуляцию гликогена в клетках [Berntzon *et al.*, 2013].

При действии на *S. PCC 6803* БМАА негативно влияет на фотосинтетическую активность цианобактерии. При добавлении БМАА к *Synechocystis* происходит уменьшение потока электронов через фотосистему II [Downing *et al.*, 2015]. Эффекты экзогенного БМАА на клетки цианобактерии *S. PCC6803* имитируют клеточные состояния, которые проявляются в популяции при ограничении макроэлементов или фотоингибировании из-за

высокой освещенности [Downing *et al.*, 2012]. На основании результатов JIP-теста [Cosgrove и Borowitzka, 2010], применяемого для анализа кинетики флуоресценции, был сделан вывод о том, что механизм действия БМАА на фотосинтез *S. PCC 6803*, по-видимому, заключается в ингибировании переноса электронов в пуле пластохинонов [Downing *et al.*, 2015].

Таким образом, БМАА существенно воздействует на клетки животных, растений и цианобактерий, подавляя или изменяя активность их жизненно важных функций, таких, как, работа моторных нейронов у животных, развитие проростков у растений, фотосинтез и азотфиксация у цианобактерий.

3.5. Молекулярные механизмы действия БМАА

Молекулярные механизмы действия БМАА разнообразны (Рисунок 3).

БМАА - возможный агонист глутаматных рецепторов. У млекопитающих БМАА в низких концентрациях (30 мкМ) и его форма в виде карбамата (Рисунок 1) могут действовать в качестве агонистов различных глутаматных рецепторов (рецептора N-метил-D-аспартата (НМДА), рецептора α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты/ каинатного рецептора и метаботропного глутаматного рецептора mGluR5), что приводит к повышенной стимуляции двигательных нейронов [Banack *et al.*, 2010]. В результате такого патологического процесса повреждаются и гибнут нервные клетки, запускается процесс их апоптоза. Также обнаружено, что БМАА способен повышать внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} [Brownson *et al.*, 2002, Rao *et al.*, 2006], что, в частности, приводит к перевозбуждению нейронов и гибели клеток. Однако, БМАА оказывает эксайтотоксический эффект только при очень высоких концентрациях (выше 100 мг на кг массы тела) [Duncan *et al.*, 1991].

Ошибочное встраивание БМАА в белки. Другим механизмом действия БМАА на клетки может являться его способность встраиваться в белки эукариот. Так, было показано [Dunlop *et al.*, 2013], что меченый ^3H -БМАА включается в белки нескольких клеточных линий человека (фибробласты легких, клетки нейробластомы и эндотелиальные клетки пупочной вены) вместо L-серина, приводя к формированию дефектных белков. При этом количество встраивающегося в белки ^3H -БМАА увеличивается с течением времени. Сообщалось о снижении количества основного белка миелина у взрослых крыс, которым ввели БМАА в период их неонатального развития [Karlsson *et al.*, 2014]. Миелиновая оболочка, покрывающая аксоны многих нейронов, очень важна для нормального функционирования аксонов нервных клеток. При нарушениях в ее структуре появляются признаки болезненных состояний, таких как рассеянный склероз и болезнь Альцгеймера. При использовании бесклеточной системы было показано, что БМАА эффективно

замещает серин и аланин в белках [Glover *et al.*, 2014]. Отмечалась, что БМАА включался в белки эффективнее, если матрицей служила геномная ДНК, выделенная из тканей мозга умерших пациентов, страдавших болезнью Альцгеймера. Использование бактериальной ДНК в бесклеточной системе было гораздо менее эффективно. Авторы отмечают, что примерно половина БМАА в синтезированных белках высвобождалась при денатурации белков с помощью додецилсульфата натрия и дитиотреитола, а вторая половина высвобождалась только после кислотного гидролиза белковых препаратов. Таким образом, было показано, что БМАА встраивается в аминокислотную цепь полипептидной цепи в ходе синтеза, а также может быть ассоциирован с белками, образуя нековалентные связи [Glover *et al.*, 2014]. Отметим, что в мозге млекопитающих БМАА обнаруживали в конкретных областях [Xie *et al.*, 2013]. В мозге крыс, подвергавшихся действию БМАА, были найдены полиубиквитированные формы белков в области гиппокампа [Karlsson *et al.*, 2012], лимбической части мозга, отвечающей за формирование эмоций и формирование долговременной памяти, способности ориентироваться в пространстве. Уменьшение объема гиппокампа является ранним диагностическим признаком при болезни Альцгеймера.

Встраивается ли БМАА в белки бактерий? Пока только в одной работе [van Onselen *et al.*, 2015] была предпринята попытка исследовать способность БМАА встраиваться в белки гетеротрофных бактерий. Авторы отмечали отсутствие ингибиторного эффекта экзогенного БМАА на рост бактерий и, исходя из результатов своих экспериментов, предположили, что БМАА встраивается только в белки эукариот, но не гетеротрофных бактерий, выросших как на богатых, так и на бедных питательных средах. Отметим, однако, что авторы не исследовали включение БМАА в белки фотоавтотрофных бактерий - цианобактерий, рост которых ингибируется при добавлении БМАА [Downing *et al.*, 2012, Verntzon *et al.*, 2013]. Кроме того, результаты большого количества ранее опубликованных работ, проведенных с цианобактериями, демонстрируют высокое количество БМАА именно в белковых фракциях. Из этого следует необходимость проведения новых исследований с использованием различных бактериальных модельных организмов.

БМАА и окислительный стресс. У млекопитающих на промежуточном этапе реакции трансаминирования белковые аминокислоты образуют основания Шиффа [Gramatikova и Christen, 1996], функцию кофермента при этом осуществляет молекула пиридоксаль-5'-фосфата. БМАА, по-видимому, вступает в реакцию схожим образом, при этом непротонированная 2-аминогруппа БМАА реагирует с пиридоксаль-5'-фосфатом в нейтральной среде и образует основание Шиффа. Экспериментальным путем было показано, что при pH 7,0 и температуре 37° реакция БМАА с пиридоксаль-5'-фосфатом дает

в качестве конечных продуктов метиламин и аммоний [Nunn и Ponnusamy, 2009]. Далее метиламин окисляется до формальдегида, перекиси водорода и аммония. Это окисление катализируется семикарбазид-чувствительной аминоксидазой [Nunn, 2009]:

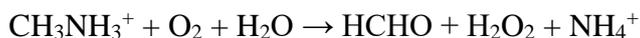


Рисунок 3. Механизмы действия БМАА

Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза катализирует реакции с участием некоторых алифатических и ароматических моноаминов и принадлежит к классу моноаминоксидаз [Cui *et al.*, 2013]. Этот фермент присутствует в крови и в сосудистой системе, в том числе в сосудистой системе мозга человека [Boomsma *et al.*, 2000; Gubisne-Haberle *et al.*, 2004]. Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза была обнаружена и в растениях. Этот фермент был детектирован в *Avena sativa*, *Narcissus tazetta*, семенах *Cucumis sativus* [Cui *et al.*, 2013; Percival и Purves, 1974]. Таким образом, в присутствии этого фермента БМАА может вступать в реакцию, продуктами которой являются активные формы кислорода (АФК), в частности перекись водорода, токсичный для клеток формальдегид и аммоний. Возможно именно поэтому, анализируя судьбу БМАА в тканях роголистника и моллюсков [Downing *et al.*, 2014, Downing *et al.*, 2015] не смогли обнаружить БМАА в составе белков и в свободном виде.

БМАА ингибирует цистин/глутаматную антипортерную систему, тем самым уменьшая внутриклеточную концентрацию глутатиона и повышая окислительный стресс [Banack *et al.*, 2010]. При высоких концентрациях БМАА (≥ 1 мМ, 48 ч воздействия) увеличивается концентрация активных форм кислорода и окисление белков. При

концентрациях БМАА ≥ 2 мМ наблюдается значительное увеличение активности каспаз 3 и 7, как предполагают, регулирующих конденсацию хроматина при апоптозе [Okle *et al.*, 2013b]. При низких, не эксайтотоксических концентрациях БМАА ($\geq 0,1$ мМ, 48 ч воздействия), усиливается процесс убиквитинирования белков (это сигнал, о том, что данный белок подлежит деградации) и увеличивается 20S протеасомная активность и активность каспазы 12, приводящей к нарушению работы эндоплазматического ретикулаума в процессе апоптоза [Okle *et al.*, 2013b].

Молекулярные механизмы действия БМАА в клетках растений и цианобактерий исследованы менее подробно, чем в клетках млекопитающих. Известно, что БМАА ингибирует активность ферментов окислительного стресса (супероксиддисмутазы, каталазы, гваякол-зависимой пероксидазы, глутатион-зависимой пероксидазы и глутатионредуктазы) и приводит к незначительному снижению удельной активности глутатион-S-трансферазы у *C. demersum in vivo* и *in vitro*, что ведет к разрушению клеточных стенок, ДНК и белков посредством воздействия АФК [Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011; Esterhuizen 2011 *et al.*, 2011]. Так как присутствие БМАА было обнаружено практически во всех частях растений [Murch *et al.*, 2004], повышенное количество АФК приводит к повреждению растений на нескольких уровнях. Так как БМАА накапливается через пищевые цепи, вполне возможно, что БМАА ингибирует ферменты окислительного стресса и в других организмах.

БМАА и метаболизм глутамин. Одним из механизмов влияния БМАА на клетки эукариот и прокариот может быть его воздействие на синтез и деградацию глутамин и глутамата. Так, было экспериментально показано, что БМАА ингибирует синтез и/или стимулирует деградацию глутамин в тканях крысы [Nunn и Ponnusamy, 2009], и индуцирует потерю глутамата при воздействии на цистин/глутаматную антипортерную систему в клеточной культуре мыши [Liu *et al.*, 2009]. В связи с этим высказывается предположение о том, что БМАА ингибирует активность нитрогеназы у цианобактерий не в качестве потенциального источника азота, а используя механизм действия на метаболизм глутамата и глутамин. Глутамат является акцептором ионов аммония, образуемых в гетероцистах цианобактерий, где и происходит синтез глутамин, который экспортируется в вегетативные клетки. Там он уже действует как предшественник глутамата и затем всех остальных аминокислот. Если БМАА уменьшает уровень глутамин или стимулирует выход глутамата из клеток цианобактерий, как это происходит в клетках мыши, то это будет приводить к быстрому внутриклеточному накоплению ионов NH_4^+ , с последующим ингибированием азотфиксации, как это и наблюдалось в *N. sp.* PCC 7120 [Berntzon *et al.*, 2013]. Данные, полученные с применением меченого изотопами БМАА (L-БМАА-4,4,4-

D₃, ¹⁵N₂), свидетельствуют о том, что первичная аминогруппа БМАА передается другим аминокислотам в клетках *S. PCC 6803* [Downing *et al.*, 2016]. В частности, радиоактивная метка из БМАА перераспределяется между свободными аминокислотами глутамином и глутаматом. Было обнаружено, что при ингибировании глутаматсинтазы, одного из ключевых ферментов в азотном метаболизме, блокируется перераспределение метки из БМАА в глутамат. По мнению авторов [Downing *et al.*, 2016], это может свидетельствовать об участии этого фермента в метаболизме БМАА в клетках цианобактерий.

Связывание БМАА с металлами. Еще один механизм действия БМАА может определяться его способностью связываться с ионами переходных металлов, таких как Zn²⁺, Cu²⁺ и Ni²⁺. Наравне с гистидином, БМАА является одной из самых активных аминокислот, вступающих в комплексообразование с этими ионами [Nunn и O'Brien, 1989]. Способность БМАА связывать Zn²⁺ значительно выше, чем у глутамата. Ионы Zn²⁺ играют важную роль в центральной нервной системе [Weiss и Sensi, 2000]. В присутствии БМАА комплекс глутамата с Zn²⁺ диссоциирует и Zn²⁺ связывается с БМАА. Никакого вклада этого свойства на нейротоксичность БМАА пока обнаружено не было, хотя следует отметить, что мимозин (аминокислота, найденная в семенах *Mimosa pudica*), который также имеет исключительную способность связывать Zn²⁺, вызывает апоптоз в клетках млекопитающих по механизму, включающему комплексообразование с Zn²⁺ [Perry *et al.*, 2005].

Помимо БМАА, на клетки могут воздействовать его производные. Так, 2,3-диаминопропионовая кислота, продукт деметилирования БМАА, также была обнаружена в небольших количествах в тканях крыс после воздействия БМАА. Эта небелковая аминокислота сама является нейротоксином [Weiss *et al.*, 1989], и ее образование из БМАА рассматривается, как один из возможных механизмов нейротоксичности БМАА [Nunn, 2009].

3.6. Возможные биологические роли БМАА

Экологические и физиологические функции большинства цианотоксинов остаются неизвестными. Высказываются различные гипотезы, которые можно разделить на две основные группы: (1) использование вторичных метаболитов для защиты их продуцентов от поедания другими организмами и приобретение преимуществ в конкурентной среде обитания за ресурсы и (2) регуляция физиологических процессов в собственной популяции, обеспечение адаптивных возможностей в изменяющихся условиях окружающей среды. БМАА может действовать как токсин, защищающий растение от травоядных [Brenner *et al.*, 2000]. Эта теория "самозащиты" растений объясняет, почему нейротоксины, такие как БМАА, накапливаются в растениях в высоких концентрациях. Предполагают также, что

агонисты ионотропного глутаматного рецептора (iGluR), продуцируемые растениями, в том числе БМАА, могут служить не только как сдерживающий фактор для травоядных, но и выступать в качестве сигнальных молекул, влияющих на процессы развития растений [Brenner *et al.*, 2000].

Цианобактерии являются первичными продуцентами БМАА. При этом о физиологической роли этой молекулы в цианобактериях практически нет сведений. Поскольку БМАА оказывает влияние на различные процессы в клетках, его функции в цианобактериях, по-видимому, являются разнообразными. Так как БМАА может синтезироваться в клетке в ответ на азотное голодание [Downing *et al.*, 2011], ясно, что синтез и концентрация БМАА зависят от условий окружающей среды и, следовательно, специфическая физиологическая роль этого соединения заключается в обеспечении адаптивной клеточной реакции на эти изменения. БМАА может быть причиной катаболизма дефектных белков и, как следствие, может приводить к обеспечению культур цианобактерий связанным азотом при переходе к диазотрофным условиям роста [Downing *et al.*, 2011]. Существуют предположения, что БМАА в условиях нехватки азота в среде участвует в регулировании хлороза, ведущего к фотоингибированию, когда продолжение фотосинтетической активности начинает приводить к образованию активных форм кислорода [Downing *et al.*, 2015]. Клеточные концентрации микроцистина и БМАА модулируются клеточным балансом азота:углерода, который, в свою очередь, отражает наличие азота в окружающей среде и интенсивность или длительность освещения. Оба токсина приводят к снижению активности фотосинтеза. Обсуждается возможная физиологическая роль цианотоксинов (микроцистина и БМАА) в условиях выживания цианобактерий пустыни и выдвигается предположение о том, что при избытке азота в среде от внезапного стресса при высокой интенсивности света культуру защищает микроцистин, а БМАА выполняет эту функцию в отсутствие азота, то есть участие цианотоксинов в регуляции фотосинтетической активности цианобактерий происходит в зависимости от N:C баланса в среде [Downing *et al.*, 2015].

Другой важной адаптационной функцией БМАА может быть его роль в индукции апоптоза. Механизмы и эволюция апоптоза в одноклеточных организмах обсуждались в обзорах [Гордеева с соавт., 2004; Кокшарова, 2013; Скулачев, 2012]. В ряде работ [Berges и Falkowski, 1998; Berman-Frank *et al.*, 2004; Franklin *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2014; Vardi *et al.*, 2007,] предполагается вовлечение апоптоза в процесс уничтожения фитопланктонных сообществ, в частности, цианобактериальных матов. Биоинформационные исследования продемонстрировали присутствие генов, кодирующих метакаспазы, в геномах

представителей фитопланктона [Bidle и Bender, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Okamoto и Okamoto, 2003; Thamatrakoln *et al.*, 2012], образующих скопления на водных поверхностях.

Представители фитопланктона способны синтезировать БМАА [Vanack *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2014; Metcalf *et al.*, 2008], при этом концентрация не связанного с белками БМАА в скоплениях фитопланктона может достигать значительных количеств [Metcalf *et al.*, 2008]. Вследствие того, что БМАА ингибирует ферменты, защищающие клетки от окислительного стресса и приводит к увеличению концентраций АФК [Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011], одного из сигнальных факторов, запускающих каскад реакций апоптоза в фитопланктонных сообществах, при достижении порогового уровня концентраций БМАА может способствовать индукции апоптоза, ведущего к лизису клеток и исчезновению больших скоплений фитопланктона. Таким образом, еще одной возможной функцией БМАА в природе может быть участие этой аминокислоты в регуляции численности популяции ее продуцентов.

За более чем почти полвека исследований небелковой аминокислоты БМАА многие вопросы, связанные с её биологической ролью, не получили исчерпывающего ответа. Большинство случаев обнаружения БМАА в природе связаны с жизнедеятельностью цианобактерий, однако отсутствие детальной информации о молекулярных механизмах и причинах биосинтеза БМАА не позволяет управлять этим процессом. Тем не менее, важная регуляторная роль БМАА в живых системах не вызывает сомнений. Имеющиеся данные указывают на вовлеченность БМАА в регуляцию азотного метаболизма цианобактерий, способность БМАА подавлять активность ферментов, защищающих клетки от окислительного стресса, ошибочное встраивание молекул БМАА в белки вместо серина, связывание металлов, возможное участие в индукции апоптоза. Экологическая роль БМАА, накапливающегося в цепях питания, и представляющего серьезную опасность для здоровья человека и животных, также очевидна.

Эта часть литературного обзора, посвященная анализу современных данных о БМАА, была опубликована в журнале «Биохимия» в соавторстве с моим научным руководителем Кокшаровой О.А.

4. Ассимиляция азота у цианобактерий

В предыдущих работах (на примере цианобактерии *Synechocystis*) было показано, что БМАА синтезируется цианобактериями в условиях азотного голодания и что предположительная физиологическая роль этого соединения может заключаться в адаптации культуры к нехватке азота в среде, поэтому одной из задач данной диссертационной работы было изучение действия БМАА на экспрессию генов, продукты

которых вовлечены в азотный метаболизм цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. Поэтому в следующей части литературного обзора рассмотрены различные механизмы генетической и биохимической регуляции азотного метаболизма и дифференцировки клеток цианобактерий.

4.1. Регуляция азотного метаболизма у цианобактерий

Механизмы ассимиляции связанного азота. Предпочтительным источником азота для цианобактерий является аммоний. Его присутствие в среде роста репрессирует экспрессию генов, кодирующих элементы путей ассимиляции альтернативных источников азота - N_2 , нитрата или мочевины [Herrero *et al.*, 2004]. Включение в клетку азотсодержащих соединений, которые чаще всего присутствуют в среде в низких концентрациях (менее 1 мкМ), происходит с помощью пермеаз, которые расположены в цитоплазматической мембране. Многокомпонентные ABC (ATP-binding cassette) транспортеры участвуют в усвоении нитратов, нитритов [Omata *et al.*, 1993; Flores и Herrero, 2005] или мочевины [Valladares *et al.*, 2002] в ряде цианобактерий. Пермеазы ABC-типа также требуются для транспортировки аргинина и глутамина [Quintero *et al.*, 2001]. Эти пермеазы используют АТФ для активного транспорта соответствующих субстратов. В некоторых морских цианобактериях был обнаружен вторичный транспортер, осуществляющий перенос нитратов и нитритов [Sakamoto *et al.*, 1999]. Транспорт аммония также обеспечивается вторичными пермеазами, относящимися к Amt семейству [Montesinos *et al.*, 1998; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b].

Внутри клеток нитрат последовательно восстанавливается до нитрита и аммония ферментами нитратредуктазой и нитритредуктазой, которые являются продуктами *narB* и *nir* генов, соответственно [Rubio *et al.*, 1996; Luque *et al.*, 1993]. Нитритредуктаза цианобактерий гомологична ферредоксин-зависимой нитритредуктазе высших растений и содержит [4Fe-4S] кластер и сирогем (Рисунок 4.А) в качестве простетической группы [Luque *et al.*, 1993; Flores и Herrero, 2005]. Электроны от восстановленного ферредоксина передаются в железосерный кластер, а затем на сирогем, где нитрит восстанавливается до аммония.

Нитратредуктаза цианобактерий гомологична Мо-содержащим бактериальным оксидоредуктазам, но уникальна тем, что использует ферредоксин в качестве донора электронов, образуя комплексы с ним в соотношении строго 1:1 [Hirasawa *et al.*, 2004]. Молибденовый кофактор представляет собой Мо-бис-молибдоптерин-гуанин динуклеотид (Рисунок 4.В) [Rubio *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002], и фермент также содержит [4Fe-4S] кластер [Jepson *et al.*, 2004]. В этой ферментной системе электроны

переходят от восстановленного ферредоксина на железосерный кластер, а затем к молибденовому кофактору, где нитрат восстанавливается до нитрита. Гены *narB* и *nirA* находятся в одном кластере вместе с генами, кодирующими нитрат / нитрит пермеазы, формируя оперон со структурой [*nir*-гены, кодирующие пермеазы-*narB*]. Высокая консервативность такой организации генов, при которой уровень экспрессии генов upstream (выше расположенных) сильнее, чем генов downstream (ниже расположенных) в опероне [Frías *et al.*, 1997], обеспечивает синтез сбалансированного количества различных белков в ходе метаболизма.

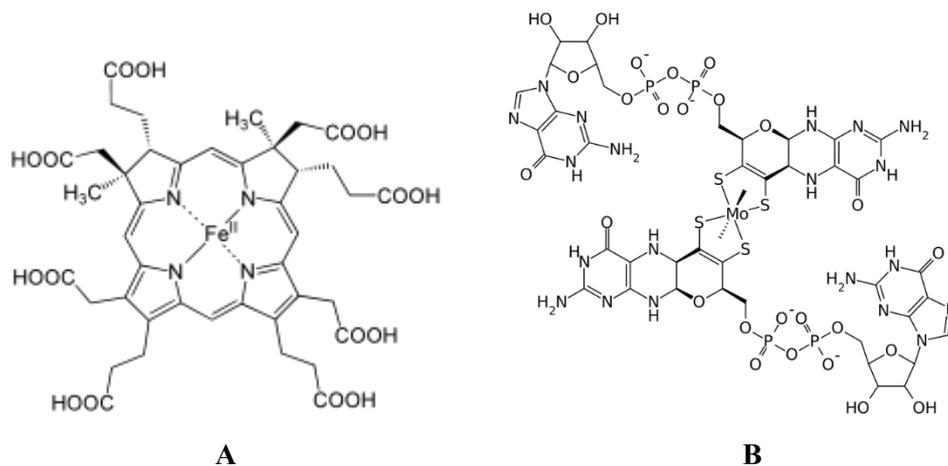


Рисунок 4. А. Сирогем. В. Мо-бис-молибдоптерин-гуанин динуклеотид

Что касается органических источников азота, используемых цианобактериями, мочевины разлагается до аммиака и CO_2 с помощью стандартной бактериальной Ni^{2+} -зависимой уреазы [Valladares *et al.*, 2002], в то время как аргинин катаболизируется необычным путем, который сочетает цикл деградации мочевины и действие фермента аргиназы, давая в качестве конечных продуктов аммоний и глутамат [Quintero *et al.*, 2000]. Независимо от источника азота, используемого для роста, внутриклеточный аммоний включается в углеродные скелеты через цикл глутаминсинтетазы-глутаматсинтазы [Flores и Herrero, 2005].

Одним из ключевых элементов сигнального пути, связанного с балансом углерода и азота (C:N балансом) в среде, в цианобактериях является молекула α -кетоглутарат (α -КГ) [Mérida *et al.*, 1991; Coronil *et al.*, 1993; Tapia *et al.*, 1996; Muro-Pastor *et al.*, 2001]. В цианобактериях отсутствует фермент α -кетоглутарат дегидрогеназа и главной метаболической ролью α -КГ является включение азота в метаболизм цианобактерий [Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2000]. Таким образом, α -КГ является индикатором соотношения C:N в клетках [Muro-Pastor *et al.*, 2001].

На Рисунке 5 представлена схема основных путей ассимиляции азота, которые были обнаружены в цианобактериях. Не все эти пути функционируют в цианобактериальной

клетке в одно и то же время, они строго регулируются источниками азота и наличием углерода [Flores и Herrero, 2005].

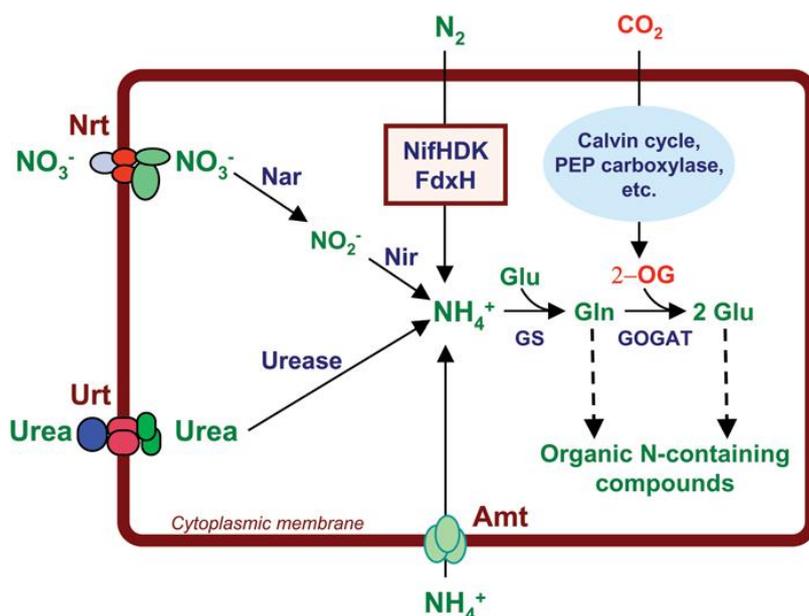


Рисунок 5. Источники связанного азота транспортируются пермеазами внутрь клетки и метаболизируются до аммония, который встраивается в органические соединения через цикл глутамин синтетазы-глутамат синтазы. Nrt, нитрат-нитрит транспортер ABC-типа; Urt, транспортер мочевины ABC-типа; Amt, пермеаза для аммония; Nar, нитратредуктаза; Nir, нитритредуктаза; NifHDK, нитрогеназный комплекс; FdxH, специфический для гетероцист ферредоксин; PEP carboxylase, фосфоенолпируват-карбоксилаза; 2-OG, 2-оксоглутарат (=α-кетоглутарат); GS, глутаминсинтетаза (ГС); GOGAT, глутамат синтаза (ГОГАТ). Схема из статьи [Flores и Herrero, 2005].

Генетический контроль ассимиляции азота. Когда в среде присутствует предельно низкая концентрация аммония и достаточный запас углерода, клетки цианобактерий чувствуют высокое соотношение С к N, которое запускает экспрессию генов, кодирующих пермеазы и ферменты, необходимые для эффективной ассимиляции аммония или для усвоения альтернативных источников азота. Эта активация экспрессии генов требует участия транскрипционного регулятора NtcA [Vega-Palás *et al.*, 1990], который принадлежит к семейству бактериальных факторов транскрипции [Vega-Palás *et al.*, 1992]. NtcA связывается с определенными сайтами промоторов регулируемых генов, активируя их транскрипцию [Luque *et al.*, 1994]. Ген *ntcA* является ауторегуляторным, а белок NtcA активируется, когда в клетке высокое соотношение С к N [Luque *et al.*, 2004]. На активность NtcA влияют α-КГ и белок PII.

Некоторые зависимые от NtcA промоторы требуют дополнительных регуляторов или транскрипционных факторов для правильного функционирования. Одним из примеров является промотор *nir* оперона у *Anabaena*, которому необходимо связывание с NtcB (фактором транскрипции из LysR семейства) в дополнение к связыванию с NtcA [Frías *et*

al., 2000]. Функционирование этого промотора также зависит от CnaT , гипотетической гликозилтрансферазы [Frías *et al.*, 2003].

В клетках цианобактерий некоторые элементы системы ассимиляции регулируются не только на уровне экспрессии генов, но подвергаются также пост-трансляционной регуляции. Нитрат / нитритные пермеазы ингибируются при высоком соотношении N к C. Нефосфорилированная форма белка PII специфически ингибирует пермеазы при низком уровне α -КГ [Lee *et al.*, 1998]. Кроме того, в одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 глутаминсинтетаза инактивируется двумя небольшими белковыми факторами, экспрессия которых подавляется NtcA при отсутствии аммония в среде [García-Domínguez *et al.*, 1999; García-Domínguez *et al.*, 2000].

4.2. Механизм и регуляция образования гетероцист у цианобактерий

Вегетативные клетки некоторых нитчатых цианобактерий могут дифференцироваться, образуя три различные типа клеток: фиксирующие молекулярный азот гетероцисты, спороподобные клетки - акинеты и подвижные гормогонии. Гетероцисты необходимы цианобактериям для фиксации молекулярного N_2 из атмосферы, так как они защищают необходимый для этого процесса фермент нитрогеназу от разрушения кислородом, образующимся в ходе фотосинтеза, и поступающим в клетки извне при дыхании. Гетероцисты отличаются от вегетативных клеток в филаменте морфологически и функционально. Их дифференцировка основывается на сложной межклеточной коммуникации и строго регулируется.

В цианобактериальных культурах *Anabaena* и *Nostoc* гетероцисты образуются из вегетативных клеток через определенные интервалы по всей длине филаментов. В diaзотрофных условиях роста вегетативные клетки продолжают фиксацию CO_2 в ходе фотосинтеза и обеспечивают гетероцисты углеродсодержащими соединениями, в то время как гетероцисты поставляют в вегетативные клетки связанный азот [Wolk *et al.*, 1994].

Гетероцисты морфологически различимы примерно через 8-9 ч после наступления азотного голодания и приблизительно через 20-24 ч они становятся полностью функциональными, фиксирующими азот из атмосферы [Kumar *et al.*, 2010]. По другим данным [Hebbbar и Curtis, 2000], дифференцировка гетероцист в культуре *N. sp.* PCC 7120 после начала азотного голодания полностью завершается в пределах от 36 до 48 ч. Связанный азот в форме нитратов и аммония подавляет дифференцировку гетероцист в течение первых 9-12 ч после добавления [Kumar *et al.*, 2010].

Образование гетероцист начинается с ответа на азотное голодание и заканчивается фиксацией азота в зрелых гетероцистах. При дифференцировке вегетативных клеток в

гетероцисты изменяется их морфология и клеточная стенка преобразуется в толстую оболочку, ограничивающую приток воздуха во внутриклеточное пространство. Эта оболочка состоит из наружного слоя полисахаридов (HEP) и внутренних слоев гликолипидов (HGL) (Рисунок 6) [Wolk *et al.*, 1994].

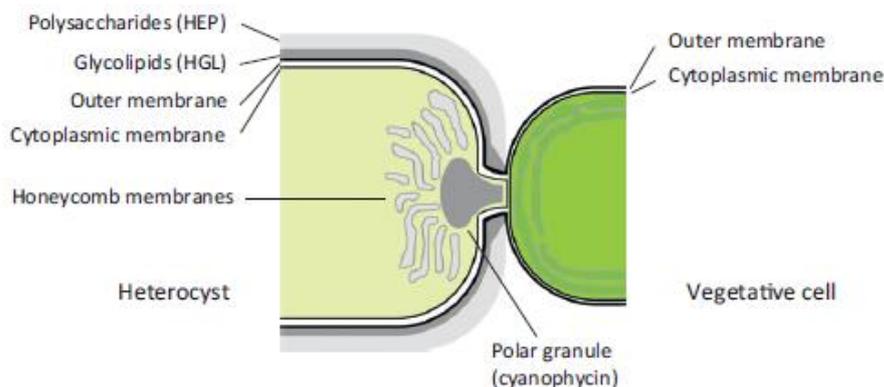


Рисунок 6. Отличия строения гетероцисты от вегетативной клетки. Расположение специфических для гетероцист полисахаридов (HEP) и гликолипидов (HGL) в составе внешней оболочки гетероцисты [Muro-Pastor и Hess, 2012]

Во ходе дифференцировки прогетероцист мембраны тилакоидов реорганизуются, скапливаются около поры и образуют так называемые сотоподобные структуры (Рисунок 6), характерные для зрелых гетероцист [Walsby, 2007]. Дыхательные ферменты, расположенные в сотоподобных мембранах около плазмодесм, сообщающихся с соседними клетками, значительно сокращают количество кислорода, поступающего в гетероцисты. В зрелых гетероцистах отсутствует фотосистема II и карбоксисомы, содержащие фермент рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу (RuBisCO), необходимый для фиксации CO₂, но фотофосфорилирование, зависимое от фотосистемы I, в этих клетках протекает [Kumar *et al.*, 2010; Zhao и Wolk, 2008]. Так как гетероцисты становятся микроаэробными, экспрессируются гены субъединиц нитрогеназы, инициируется фиксация N₂, и возобновляется активный рост филамента за счет деления вегетативных клеток, получающих азот от соседних гетероцист [Wolk *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2008]. Зрелые гетероцисты к делению не способны [Muro-Pastor и Hess, 2012].

Регуляция дифференцировки гетероцист требует значительных затрат метаболических и энергетических ресурсов [Wolk *et al.*, 1994]. Дифференцировка гетероцист запускается исключительно при исчерпании всех источников связанного азота в среде. Некоторые молекулы и ионы, включая α-КГ [Zhao *et al.*, 2010], Ca²⁺ ионы [Zhao *et al.*, 2005], и циклический-ди-GMP [Neunuebel и Golden, 2008], вовлечены в ответ сигнальных систем на азотное голодание [Zhao и Wolk, 2008; Zhang *et al.*, 2006].

Процесс дифференцировки начинается с аккумуляции α-КГ, как следствие исчерпания связанного азота в среде [Zhang *et al.*, 2006]. α-КГ взаимодействует с аммонием

в цикле ГС/ГОГАТ (ГС – глутаминсинтетаза, ГОГАТ - глутаминоксоглутарат аминотрансфераза) [Muro-Pastor *et al.*, 2001; Muro-Pastor *et al.*, 2005]. При азотном голодании цикл ГС/ГОГАТ перестает функционировать, что приводит к накоплению α -КГ внутри клетки [Zhang *et al.*, 2006]. В свою очередь, α -КГ стимулирует ДНК-связывающую активность NtcA, важного фактора транскрипции при формировании гетероцист [Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994]. Транскрипция генов, зависимых от NtcA, в отсутствие α -КГ не начнется [Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a; Tanigawa *et al.*, 2002]. Таким образом, регуляция транскрипции, зависимая от NtcA, изменяется в ответ на колебания C:N баланса клеток при воздействии эффекторной молекулы α -КГ [Zhao *et al.*, 2010] и имеет решающее значение для ранних этапов дифференцировки гетероцист [Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994].

α -КГ стимулирует связывание NtcA с некоторыми N-регулируемыми промоторами [Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a; Tanigawa *et al.*, 2002], предположительно этот метаболит может представлять собой аллостерический эффектор для NtcA. Цианобактериальный сигнальный белок PII (продукт гена *glnB*) связывает АТФ и α -КГ и фосфорилируется при высоком C:N соотношении в клетках. Предположительно, белок PII функционирует как датчик (сенсор) α -КГ [Forchhammer, 2004]. Белок PII особенно важен для активации NtcA-зависимых генов в условиях азотного голодания [Paz-Yepes *et al.*, 2003; Fadi Aldehni *et al.*, 2003], и более эффективно PII способствует экспрессии генов, находясь в фосфорилированной форме [Paz-Yepes *et al.*, 2003]. Таким образом, α -КГ может воздействовать на активность NtcA и напрямую, и косвенно через PII.

После аккумуляции α -КГ и активации NtcA следующим этапом образования гетероцист является экспрессия гена *hetR* [Black *et al.*, 1994; Buikema и Haselkorn, 1991]. В отличие от NtcA, HetR специфически участвует в дифференцировке клеток и не является обязательным для роста в присутствии нитрата. HetR связывается с промоторами нескольких генов, продукты которых участвуют в процессе регуляции формирования гетероцист, таких как *hetR*, *hetP*, *hetA*, *hetZ* и *patS* [Du *et al.*, 2012; Feldmann *et al.*, 2011; Higa и Callahan, 2010; Huang *et al.*, 2004].

Экспрессия *ntcA* и *hetR* усиливается в ответ на дефицит азота, и это увеличение экспрессии наблюдается особенно ярко в развивающихся гетероцистах [Black *et al.*, 1993; Olmedo-Verd *et al.*, 2006; Rajagopalan и Callahan, 2010]. NtcA и HetR усиливают экспрессию своих собственных генов, так и экспрессию друг друга.

Так как *hetR* промотор не содержит узнаваемый NtcA сайт связывания, по-видимому, его зависимость от экспрессии NtcA является косвенной. Распознавание белка NtrA, NtcA-зависимого регулятора [Ehira и Ohmori, 2006a; Muro-Pastor *et al.*, 2006], который

связывается с промотором *hetR*, частично определяет косвенную зависимость *hetR* от экспрессии NtcA [Ehira и Ohmori, 2006b].

Необходимыми для дифференцировки гетероцист являются полипептид PatS и белок HetN, но при этом их сверхэкспрессия подавляет этот процесс [Yoon и Golden, 1998; Black и Wolk, 1994; Callahan и Buikema, 2001]. Транскрипция и *patS*, и *hetN* сильнее в гетероцистах [Yoon и Golden, 1998; Callahan и Buikema, 2001], но продукты экспрессии этих генов встречаются и в вегетативных клетках по всей длине филамента. PatS представляет собой небольшой полипептид, С-концевой пентапептид которого RGSGR (PatS-5) ингибирует дифференцировку гетероцист при экзогенном добавлении или при экспрессии под гетероцистоспецифичным промотором [Yoon и Golden, 1998; Yoon и Golden, 2001]. Было показано, что в (про)гетероцистах синтезируется полипептид PatS, состоящий из 17 аминокислотных остатков, и что регуляция дифференцировки гетероцист в филаменте осуществляется С-концевым октапептидом CDERGSGR [Corrales-Guerrero *et al.*, 2013].

HetN содержит идентичный RGSGR мотив, который предположительно является функциональным компонентом HetN [Higa *et al.*, 2012]. Тем не менее, другие авторы описали мутации, введенные в последовательность RGSGR, которые не изменяли способности HetN подавлять дифференцировку гетероцист [Li *et al.*, 2002].

Исследования показывают, что механизм дифференцировки гетероцист зависит от концентрационных градиентов активатора (HetR) и ингибиторов (вероятно пептидов, образовавшихся из PatS и / или HetN) по длине филамента [Risser и Callahan, 2009]. Сверхэкспрессия гена *hetR* или мутация в гене *patS* приводят к мутантным фенотипам, демонстрирующим образование множественных гетероцист (цепочек гетероцист). Напротив, сверхэкспрессия *patS* или мутация по *hetR* приводят к отсутствию дифференцировки. Мутации в обоих ингибирующих элементах, PatS и HetN, приводят к дифференцировке практически всех клеток в филаменте при отсутствии связанного азота [Borthakur *et al.*, 2005]. В то время как PatS участвует в механизме формирования гетероцист *de novo* [Yoon и Golden, 1998], HetN необходим для обеспечения функционирования этого механизма, но не для его запуска [Callahan и Buikema, 2001].

Продукты экспрессии других генов функционируют на относительно ранних этапах дифференцировки, что основано на наблюдениях за фенотипами соответствующих мутантов. Мутация в гене *hetF* приводит к отсутствию гетероцист [Wong и Meeks, 2001; Risser и Callahan, 2008], а мутация в гене, кодирующем регулятор ответа PatA, приводит к формированию в основном терминальных гетероцист [Liang *et al.*, 1992]. Делеции в генах *patA* или *hetF* приводят к аккумуляции белка HetR [Risser и Callahan, 2008]. Два других белка ингибируют экспрессию HetR. HetC принадлежит к семейству бактериальных ABC-

транспортёров белков [Khudyakov и Wolk, 1997]. В регуляции дифференцировки гетероцист HetC выполняет двойную функцию. С одной стороны, этот белок с большой долей вероятности участвует в транспорте ингибирующих дифференцировку регуляторов (Pat и HetN) из (про)гетероцист в соседние клетки. А также HetC (и HetP) может взаимодействовать с мембранными факторами, приводя к ингибированию клеточного деления [Corrales-Guerrero *et al.*, 2014]. В культуре мутантов по гену *hetC* наблюдается отсутствие аутофлуоресценции клеток, которая является признаком дифференцировки, но эти клетки продолжают делиться и не проявляют морфологических изменений [Xu и Wolk, 2001]. Избыточная экспрессия HetP, белка с неизвестной функцией, способствует дифференцировке даже в мутантах по гену *hetR* [Higa и Callahan, 2010].

Гены, описанные выше, участвуют в регуляции процесса образования гетероцист, то есть определяют, будет ли данная клетка дифференцироваться. После того, как процесс запускается, начинаются морфологические и метаболические изменения, такие как формирование компонентов оболочки будущей гетероцисты и накопление цитохром *c*-оксидазы и нитрогеназы [Wolk *et al.*, 1994; Zhao и Wolk, 2008]. Морфогенез двух слоев оболочки гетероцист контролируется двумя семейства генов, *hep* и *hgl*, которые косвенно активируются регулятором HetR [Huang *et al.*, 2004].

Заключительные этапы процесса дифференцировки включают регулируемые перестройки ДНК, которые происходят в *nifD*, *hupL* и *fdxN* генах, кодирующих субъединицу нитрогеназы, субъединицу мембраносвязанной гидрогеназы и ферредоксина, соответственно. Эти три сайт-специфические рекомбинационные события широко распространены у цианобактерий, образующих гетероцисты [Henson *et al.*, 2011]. Все эти события ведут к преобразованию рамки считывания гена так, чтобы ген мог экспрессироваться специфически для гетероцист [Muro-Pastor и Hess, 2012].

Фиксированный азот, поступающий из образовавшихся гетероцист, вместе с PatS и HetN действует как ингибитор дифференцировки соседних с гетероцистой вегетативных клеток в филаменте [Wolk *et al.*, 1974].

Так как нитрогеназа содержит до 36 атомов железа на ферментный комплекс, а также для азотфиксации необходимы железосодержащие белки, в diaзотрофных условиях для роста клеток требуется дополнительное количество железа, помимо того, что необходимо для фотосинтеза и дыхания. При дефиците железа у *N. sp.* PCC 7120 способность к фиксации атмосферного азота и дифференцировке гетероцист достаточно сильно снижена [Narayan *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2006].

У цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 главным регулятором гомеостаза железа является белок FurA [González *et al.*, 2012]. FurA представляет собой конститутивный белок

[Hernández *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2006], экспрессия которого усиливается при исчерпании железа [Hernández *et al.*, 2002], окислительном стрессе [López-Gomollón *et al.*, 2009] и во время дифференцировки гетероцист [Flores и Herrero, 2010; López-Gomollón *et al.*, 2007]. В клетках *N. sp.* PCC 7120 FurA является глобальным регулятором транскрипции, экспрессия которого индуцируется NtcA в прогетероцистах, стабильно продолжается в зрелых гетероцистах и отсутствует в *ntcA*-мутантах [López-Gomollón *et al.*, 2007]. Регулируя экспрессию *ntcA*, FurA влияет на образование гетероцист у *N. sp.* PCC 7120 (Рисунок 7) и играет важную роль в зависимости между гомеостазом железа и азотным метаболизмом цианобактерий [González *et al.*, 2013].

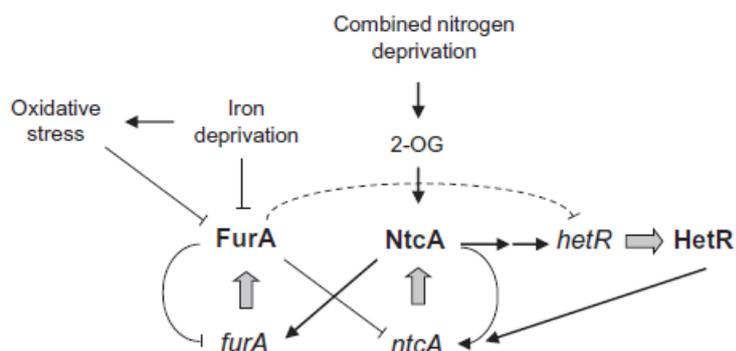


Рисунок 7. Роль белка FurA в регуляции экспрессии гена *ntcA* при образовании гетероцист [González *et al.*, 2013]

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Организмы, питательные среды и условия культивирования

1.1. Бактериальные культуры. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в Таблице 1.

Биосенсорные штаммы *Chromobacterium violaceum* CV026 и *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4. Штаммы были предоставлены д.б.н. Л. Черниным (Иерусалимский университет, Израиль). *C. violaceum* CV026 выращивали на агаризованной (1.5%) среде Luria-Bertani (LB: 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl) (Миллер, 1976) с добавлением канамицина (100 мкг/мл) и хранили при комнатной температуре. Биосенсор *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 выращивали на среде LA (LB с 1,5% агара) или среде M9 (0.6% Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0,05 % NaCl, 0.1% NH₄Cl, после автоклавирования добавляли 1мл 0,1 М CaCl₂, 1 мл 1М MgSO₄ x 7 H₂O на 1 л среды и 0,2% глюкозы) с добавлением ампицилина (100 мкг/мл) и гентамицина (20 мкг/мл) при 30°C.

Штаммы почвенных бактерий *Pseudomonas chlororaphis* 62, *P. chlororaphis* 64, *P. chlororaphis* 66, *P. chlororaphis* 205-с, *P. chlororaphis* 445, *P. chlororaphis* 464, *P. chlororaphis* 449, *Pseudomonas fluorescens* В-4117. Штаммы были предоставлены к.б.н. Т. А. Сорокиной (Институт молекулярной генетики, Москва, Россия). Эти штаммы были выделены из ризосферы различных растений и почвенных образцов из разных географических зон: Московская область и другие регионы России, Украины, Казахстана, Узбекистана.

Мутантные штаммы *P. chlororaphis* 449::miniTn5-3, *P. chlororaphis* 449::miniTn5-14, *P. chlororaphis* 449 *gacS*, *P. chlororaphis* 449 *vfr*, *P. chlororaphis* 449 *rpoS* и штаммы с плазмидами *P. chlororaphis* 449/pME6863, *P. chlororaphis* 449/pME6000 (получены в Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН).

Pseudomonas aureofaciens 30-84, *P. aureofaciens* ATCC 13985 получены из Международной коллекции (<https://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx>).

Бактерии рода *Serratia* и их мутанты. *Serratia proteamaculans*, *sprI*⁺, *sprI*⁻ (исходный штамм получен от чл.-корр. РАН С.В. Кострова, мутанты получены в Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН). *Serratia plymuthica* IC1270 и мутанты в генах *grrA*, *grrS* и *rpoS* предоставлены д.б.н. Л. Черниным (Иерусалимский университет, Израиль).

Культуры фитопатогенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* C58, В6, 1D1, 636, 388 и *Erwinia carotovora* 133 получены из коллекции Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН.

Культуры бактерий родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Agrobacterium*, а также *E. carotovora* 133 растили на агаризованной или в жидкой среде LB при температуре 28°C.

Выращивание штаммов *Escherichia coli* XL1-Blue и *E. coli* HB101 осуществляли в жидкой среде LB или на чашках Петри на агаризованной среде LA (LB с 1,5% агара) [Миллер, 1976]. Выращивание культур штаммов *E. coli*, а также трансформантов *E. coli*, проводили при температуре 37°C.

Штамм одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 (*S.* 7942) был предоставлен д.б.н. Кокшаровой О. А. (Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва). Дикий тип *Synechococcus* sp. PCC 7942 и его мутантные производные культивировали на среде BG11_N [Rippka et al, 1979]. Клетки цианобактерии росли в колбах на 100 мл при 25°C на свету (примерно 20 мкЕ м⁻² с⁻¹).

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Название штамма	Характеристика	Источник
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>		
62	Прототроф. Выделен из ризосферы хлопка (Ташкентская обл., Узбекистан)	Коллекция ИМГ РАН
64	Прототроф. Выделен из ризосферы подорожника (Московская обл.)	Коллекция ИМГ РАН
66	Прототроф. Выделен из ризосферы люцерны (Ташкентская обл., Узбекистан)	Коллекция ИМГ РАН
205с	Прототроф. Выделен из почвы рисового поля (Казахстан)	Коллекция ИМГ РАН
445	Прототроф. Выделен из ризосферы маиса (Киевская обл., Украина)	Коллекция ИМГ РАН
464	Прототроф. Выделен из ризосферы свеклы (Киевская обл., Украина)	Коллекция ИМГ РАН
449	Прототроф. Выделен из ризосферы кукурузы (Киевская обл., Украина)	Коллекция ИМГ РАН
449::miniTn5-3	Транспозонный мутант 449, <i>phzA::mini-Tn5Km2</i> , Km ^r	Коллекция ИМГ РАН*
449::miniTn5-14	Транспозонный мутант 449, <i>phzB::mini-Tn5Km2</i> , Km ^r	Коллекция ИМГ РАН
449/pME6863	449, содержит плазмиду pME6863 с клонированным геном <i>aiiA</i> , Tc ^R	Коллекция ИМГ РАН
449/pME6000	449, содержит векторную плазмиду pME6000, Tc ^r	Коллекция ИМГ РАН
449 <i>gacS::mini-Tn5Km2</i>	Транспозонный мутант 449, <i>gacS::mini-Tn5Km2</i> , Km ^r	Коллекция ИМГ РАН
449 <i>vfr::Gm^r</i>	Инсерционный мутант 449, <i>vfr::Gm</i> , Gm ^R	Коллекция ИМГ РАН
449 <i>rpoS::Km^r</i>	Инсерционный мутант 449, <i>rpoS::Km</i> , Km ^r	Коллекция ИМГ РАН
<i>Serratia</i>		
<i>S. proteamaculans</i> 94	Прототроф, выделен из испорченного мяса в холодильнике	[Demidyuk et al., 2006]

<i>sprI</i>	Инсерционный мутант 94, <i>sprI</i> :Gm, Gm ^r	Коллекция ИМГ РАН
<i>sprR</i>	Инсерционный мутант 94, <i>sprR</i> :Gm, Gm ^r	Коллекция ИМГ РАН
<i>S. plymuthica</i> IC1270	Прототроф	[Ovadis <i>et al.</i> , 2004]
<i>S. plymuthica</i> grrA	Rif ^r Gm ^r инсерционный мутант штамма IC1270	[Ovadis <i>et al.</i> , 2004]
<i>S. plymuthica</i> grrS	Rif ^r Gm ^r инсерционный мутант штамма IC1270	[Ovadis <i>et al.</i> , 2004]
<i>S. plymuthica</i> rpoS	Rif ^r Gm ^r инсерционный мутант штамма IC1270	[Ovadis <i>et al.</i> , 2004]
<i>Agrobacterium</i>		
<i>A. tumefaciens</i> C58	Прототроф. Содержит T1-плазмиду нопалинового типа, выделен из корончатых галлов вишни.	[Sciaky <i>et al.</i> , 1978]
<i>A. tumefaciens</i> NT1/pZLR4	T1-плазмиды не имеет. pZLR4 <i>traG</i> :: <i>lacZ</i> . Биосенсор, синтезирует β-галактозидазу при наличии в среде АГЛ, Gm ^R	[Kovach <i>et al.</i> 1995]
<i>A. tumefaciens</i> B6	Прототроф	Коллекция ИМГ РАН
<i>A. tumefaciens</i> 1D1	Прототроф	Коллекция ИМГ РАН
<i>A. tumefaciens</i> 636	Прототроф	Коллекция ИМГ РАН
<i>A. tumefaciens</i> 388	Прототроф	Коллекция ИМГ РАН
<i>Synechococcus</i> sp.		
PCC 7942	Дикий тип	Д-р Кокшарова О. А. Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
NR 401	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; Tn5-692 мутант	Данная работа
NR 385	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; Tn5-692 мутант	Данная работа
NR 356	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; Tn5-692 мутант	Данная работа
NR 359	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; Tn5-692 мутант	Данная работа
NR401 _{ins}	Km ^r ; PCC 7942::pNR401-del	Данная работа
NR385 _{ins}	Km ^r ; PCC 7942::pNR385-del	Данная работа
Плазмиды		
pME6000	Вектор для клонирования, Tc ^R	Коллекция ИМГ РАН
pME6863	pME6000, несущая ген <i>AiiA</i> , под контролем конститутивного <i>lac</i> -промотора pME6000, Tc ^R	Коллекция ИМГ РАН
pRL443	Ap ^r Tc ^r ; Km ^s производная плазмиды RP4	[Elhai <i>et al.</i> , 1997]
pRL498	Km ^r ; вектор прямой селекции	[Elhai и Wolk, 1988]
pRL692	Em ^r Sm ^r Sp ^r , несет Tn5-692	[Koksharova и Wolk, 2002]

pNR401	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; хромосомная ДНК из <i>S. sp.</i> PCC 7942 NR401 порезана <i>SalI</i> , лигирована сама на себя и трансформирована в <i>E. coli</i>	Данная работа
pNR385	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; хромосомная ДНК из <i>S. sp.</i> PCC 7942 NR385 порезана <i>SalI</i> , лигирована сама на себя и трансформирована в <i>E. coli</i>	Данная работа
pNR365	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; хромосомная ДНК из <i>S. sp.</i> PCC 7942 NR365 порезана <i>SalI</i> , лигирована сама на себя и трансформирована в <i>E. coli</i>	Данная работа
pNR359	Sm ^r Sp ^r Em ^r ; хромосомная ДНК из <i>S. sp.</i> PCC 7942 NR359 порезана <i>SalI</i> , лигирована сама на себя и трансформирована в <i>E. coli</i>	Данная работа
pNR401-del	Km ^r ; pRL498 с делетированной ПЦР копией гена SYNPC7942_RS06965	Данная работа
pNR385-del	Km ^r ; pRL498 с делетированной ПЦР копией гена SYNPC7942_RS03755	Данная работа
Другие бактерии		
<i>Chromobacterium violaceum</i> 026 (CV026)	Sm ^r mini-Tn5 Hg ^r <i>cviI::Tn5xylE</i> Km ^r Биосенсор, синтезирует фиолетовый пигмент виолацеин при наличии в среде АГЛ	[McClellan <i>et al.</i> , 1997]
<i>P. aureofaciens</i> (= <i>P. chlororaphis</i>) 30-84	Прототроф	[Mavrodi <i>et al.</i> , 1998]
<i>Erwinia carotovora</i> 133	Прототроф	Коллекция ИМГ РАН
<i>P. aureofaciens</i> ATCC 13985	Прототроф	Д-р Л. Чернин. Иерусалимский университет
<i>P. fluorescens</i> B-4117	Прототроф. Выделен из почвы в Батумском ботаническом саду, Грузия.	Д-р Л. Чернин. Иерусалимский университет
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R)</i>]	Коллекция кафедры генетики МГУ
<i>E. coli</i> HB101	F' <i>ara14 galK2 hsdS20(τ_B- m_B-) lacY1 leuB6 mtl-1 proA2 recA13 rpsL20(Str^R) supE44,9,14 thi-1 xyl-5 Δ(mcrC-mrr)</i>	[Cohen <i>et al.</i> , 1998]
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	F- <i>lambda- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Коллекция ФГБУ "ГосНИИгенетика"
<i>E. coli</i> AB1157	<i>recA99 thr-1 leu-6 thi-1 lacY1 galK2 ara14 xyl-5 mtl-1 proA2 his-4 argE3 str-31 tsx-33</i>	Коллекция ИМГ РАН
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	Прототроф	[Blumer и Haas, 2000]
<i>P. fluorescens</i> 2-79	Прототроф	[Blom <i>et al.</i> , 2011]
<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120	Дикий тип	Д-р. Кокшарова О. А. Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

Примечание. Ap, ампициллин; Em, эритромицин; Km, канамицин; Sm, стрептомицин; Sp, спектиномицин; Tc, тетрацилин; Rif, рифампин; r, устойчивость; s, чувствительность.

Штамм нитчатой азотфиксирующей цианобактерии *Nostoc sp.* PCC 7120 был получен от д.б.н. Кокшаровой О. А. (Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва). *Nostoc sp.* PCC 7120 (*N.* 7120) культивировали в жидкой среде BG11 [Rippka *et al.*, 1979] с добавлением нитрата натрия (BG11_{NO₃}) или в среде BG11 без азота (Таблица 2). Культуру растили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл при комнатной

температуре при постоянном освещении с интенсивностью $20 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ на качалке со скоростью качания 70 об/мин.

Таблица 2. Среда роста BG11_{NO₃} для культивирования цианобактерий

Вещество	Содержание в 1 литре (в граммах)	Навеска на 40 мл 1000х матричного раствора, из которого берем 1 мл на литр готовой среды
Na ₂ EDTA	0,001	40 мг
NaNO ₃	1,5	-
K ₂ HPO ₄ (или K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O)	0,04 0,051	2,4 г
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,075	3 г
CaCl ₂ ×2H ₂ O (если безводный)	0,036	1,44 г 1,08 г
Лимонная кислота	0,006	0,24 г
Na ₂ CO ₃	0,02	0,8 г
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,003	0,118 г
Микроэлементы, раствор (см. ниже)	1 мл	-

Состав раствора микроэлементов (в граммах на 1 литр)

H ₃ BO ₃	2,86
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,079
MnCl ₂ ×4 H ₂ O	1,81
Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O	0,0444
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ ×2 H ₂ O	0,39

1.2. Культуры грибов. Культуры фитопатогенных грибов получены из коллекции Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН:

Фитопатогенные грибы, использовавшиеся в работе: *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Helminthosporium sativum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia rolfsii*, *Colletotrichum sp.*

Культуры грибов выращивали на среде Чапека (глюкоза - 0,4%, NaNO₃ - 2 г, KH₂PO₄ - 1г, MgSO₄ - 0,5 г, KCl - 0,5 г, FeSO₄ - 0,01 г, вода - 1 л, агароза — 1-2%) [Миллер, 1976] или на среде PDA (Potato Dextrose Agar/Агар картофельный с декстрозой) (Difco) при 25 °С.

1.3. *Caenorhabditis elegans*. Нематоды *Caenorhabditis elegans* N2 (штамм дикого типа) из коллекции ФГБУ Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) культивировали на агаризованной

среде роста NGM, оптимальной для нематод, при 20°C на чашках Петри, засеянных *E. coli* MG1655 в качестве источника пищи. Развитие личинок нематод включает в четыре стадии - L1, L2, L3 и L4. После стадии L4 нематоды *C. elegans* переходят к взрослому состоянию, в котором нематоды способны к размножению [Stiernagle, 2006].

1.4. *Drosophila melanogaster*. Мухи *Drosophila melanogaster* линии F с мутацией w^{1118} (*Drosophila* Stock Center, Bloomington, IN) содержались при 25°C на агаризованной среде, содержащей 8 г агара, 60 г сухих дрожжей, 40 г сахара, 36 г манной крупы, 40 г изюма на 1 л конечного объема среды.

2. Определение синтеза АГЛ

С помощью инсерции транспозона mini-Tn5 в штамме *C. violaceum* CV026 был инактивирован ген синтазы АГЛ *cviI*, который отвечает за синтез N-гексаноилгомосерин лактона (С₆-ГЛ) [McClellan *et al.*, 1997]. Мутация в этом гене приводит к отсутствию синтеза АГЛ и фиолетового пигмента виолацеина. Синтез виолацеина в штамме CV026 индуцируется С₆-ГЛ и другими АГЛ с длиной ацильных цепочек от С₄ до С₈.

Для определения синтеза АГЛ использовали клетки штамма *Chromobacterium violaceum* CV026. Бактерии высевали штрихами на поверхность агаризованной среды LB, пересекали эти штрихи штрихами тестируемых культур, каждой по отдельности, инкубировали 48 часов при 28°C. В случае, когда тестируемый штамм продуцировал АГЛ, наблюдали окрашивание индикаторного штамма (CV026) в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски оценивали визуально.

Во втором случае использовали штамм *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Этот штамм несет плазмиду pZLR4, содержащую слитые гены *traG::lacZ* и ген транскрипционного регулятора *traR*; ген синтазы *traI* а, следовательно, синтез АГЛ в данном штамме отсутствует. Синтез β-галактозидазы (экспрессия *lacZ*) в этом штамме происходит только в присутствии экзогенного АГЛ. Комплекс белка TraR и АГЛ активирует экспрессию *traG::lacZ*. Репортер *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 чувствителен к большому количеству АГЛ всех трех классов: АГЛ без заместителей в боковой ацильной цепочке, 3-оксо-ГЛ и 3-гидрокси-ГЛ; длина боковых ацильных цепочек у всех трех видов АГЛ может варьироваться от С₆ до С₁₂.

Ночную культуру *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 выращивали на среде LB с добавлением ампициллина и гентамицина при 30°C. Чашку с нижней агаризованной средой М9, содержащей X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактозид; конечная концентрация 80 мкг/мл), заливали 3 мл верхнего мягкого агара М9 (0,5%) при температуре 45°C с добавлением 0,5 мл ночной культуры *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Тестируемые на предмет

синтеза АГЛ штаммы высевали уколами на поверхность агаризованной среды после ее застывания, инкубировали при необходимой температуре от 24 до 48 часов. О синтезе АГЛ тестируемыми штаммами судили по проявлению голубых зон гидролиза X-Gal, т.к. синтез β -галактозидазы штаммом *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 происходит только в присутствии АГЛ [Cha *et al.*, 1998].

3. Выделение АГЛ из бактериальных культур

Для проведения экстракции АГЛ из культуральных супернатантов использовали метод, описанный в статье [Shaw *et al.*, 1997]. Инокулят свежевыращенной культуры исследуемого штамма с трех бактериальных петель засеивали в 5 мл жидкой среды LB, растили 3-4 часа в течение дня на качалке при 30°C. Вечером пересевали по 1 мл культуры в колбу с 40 мл LB. Колбу помещали на качалку и оставляли на 15 часов. Далее содержимое колбы центрифугировали на холоде (4°C) при 5500 об/мин в течение 40 минут. Супернатант сливали в колбу Эрленмейера со шлифом, добавляли равный объем холодного этилацетата, помещали на качалку на 30 минут при комнатной температуре. Разделяли полученные фракции на делительных воронках. Верхний слой сливали в колбу со шлифом, к нижней, водной, фазе добавляли равный объем холодного этилацетата и проводили повторную экстракцию на качалке в течение 30 минут, разделяли на делительных воронках. Верхние отделенные фракции соединяли в одной колбе со шлифом и обезвоживали с помощью добавления сухого Na₂SO₄ при перемешивании. Безводную этилацетатную фазу отфильтровывали для удаления соли в круглодонную колбу через складчатый фильтр. Фильтрат упаривали досуха под вакуумом на роторном испарителе при 37°C, растворяли в 200-500 мкл этилацетата, переносили в эппендорфы и концентрировали на установке SpeedVac в течение 40 - 60 минут. Перед концентрированием эппендорфы помещали в кельвинатор на 30 минут. После упаривания добавляли 30 мкл этилацетата, закрывали парафильмом и помещали на хранение в холодильник с температурой -20°C.

4. Идентификация АГЛ в культуральных экстрактах

Для идентификации АГЛ в культуральных экстрактах использовали метод, описанный в статье [Shaw *et al.*, 1997], в основе которого лежит C₁₈-обращенно-фазовая тонкослойная хроматография (ТСХ). Ночные культуры репортерных штаммов *C. violaceum* CV026 и *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 растили в 5 мл жидкой питательной среды LB, с добавлением гентамицина в случае штамма NT1/pZLR4.

При использовании в качестве репортера штамма CV026 АГЛ-метчики наносили в следующих количествах: 5 мкл С₆-ГЛ (0,01 мг/мл), 5 мкл С₄-ГЛ (0,1 мг/мл), 5 мкл 3ОС₆-ГЛ (0,1 мг/мл) и 5 мкл С₈-ГЛ (0,1 мг/мл); экстракты АГЛ наносили в следующих количествах: 2 мкл экстракта АГЛ из *P. chlororaphis* 449, 2 мкл экстракта АГЛ из *P. chlororaphis* 64, 2 мкл экстракта АГЛ из *S. proteamaculans*, 2 мкл экстракта АГЛ из *sprI*, 2 мкл экстракта АГЛ из *sprR* и 2 мкл экстракта АГЛ из *P. aureofaciens* 30-84. При этом исходный объем каждой пробы экстракта АГЛ составлял 20 мкл.

После нанесения всех проб пластинку просушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 15 мин для испарения растворителя. Хроматографию проводили в закрытом сосуде (камере). В качестве мобильной фазы использовали раствор метанола в воде (70:30). Пластинку, после достижения фронтом мобильной фазы ⁴/₅ ее высоты, просушивали досуха при комнатной температуре в течение 1—1,5 часов. Ночную культуру репортерного штамма смешивали с 65 мл теплого (42°C) мягкого агара (0,7% LA для CV026 и 0,7% агаризованная среда М9 с глюкозой и X-gal для NT1/pZLR4) и равномерно заливали полученным раствором поверхность пластинки. После застывания агара пластинку переносили в пластиковый кейс и инкубировали 12-18 часов при 28°C. Локализацию пятен проводили визуально, по появлению характерной фиолетовой окраски репортерного штамма CV026 и по появлению голубых зон гидролиза X-Gal в случае репортера NT1/pZLR4, возникающих в присутствии экзогенных АГЛ. В опыте использовали АГЛ-метчики с концентрациями 0,01 мг/мл для С₆-ГЛ и 0,1 мг/мл для С₄-ГЛ, 3ОС₆-ГЛ и С₈-ГЛ.

5. Определение антагонистической активности при действии летучих веществ бактерий

5.1. Действие на фитопатогенные бактерии. Фитопатогенные бактерии и бактерии-продуценты летучих веществ выращивали на чашках Петри с перегородками. Бактерии засевали на чашки одновременно. Одну половину чашки засевали продуцентами летучих веществ, а другую – фитопатогенами. Засев фитопатогенных бактерий проводили в LB из ночной культуры с разведением в 1000 раз. Ту часть чашки, которая была засеяна бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, заливали средой LA, а ту часть, где находились фитопатогены, заливали средой PDA. После засева чашки заматывали парафильмом и инкубировали 48 часов при 30°C. Зоны ингибирования анализировали через 3-5 дней. В качестве контроля использовались разделенные чашки Петри, на которые засевали фитопатогенные бактерии на PDA при отсутствии колоний бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на среде LA.

5.2. Действие на цианобактерии. Цианобактерии и бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia* выращивали на чашках Петри с перегородками. Бактерии пересевали с чашек с молодой культурой. Цианобактерии засевали на следующие сутки. Одну половину чашки заливали средой LA или PDA и засевали бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, а другую половину заливали средой BG11 и капали суспензию цианобактерий в нескольких разведениях (исходная суспензия, разведения в 10 раз, в 100 раз). На чашку наносили по 10 мкл суспензии цианобактерий в двух повторностях – ближе к перегородке и дальше от нее. После нанесения суспензий цианобактерий чашки подсушивали под током воздуха в ламинарном шкафу в течение 40-60 минут, заматывали парафильмом и помещали на свет под люминесцентные лампы. В качестве контроля использовались разделенные чашки Петри, на которых отсутствовали колонии бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на среде LA или PDA, соответственно, а была нанесена только суспензия цианобактерий на половину чашки, заполненную средой BG11.

5.3. Действие на фитопатогенные грибы. Грибы и бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia* выращивали на чашках Петри, разделенных на две или четыре части перегородками. Перегородки не прилегали к крышке, оставалось свободное пространство для обмена воздухом. Одну половину (или две четверти) чашки засевали бактериями, а на одну из оставшихся частей помещали блок с мицелием гриба. Блоки грибов диаметром 8-10 мм вырезали из агаризованной среды Чапека на чашках, засеянных грибами в виде спор, петлей с молодой культуры гриба, после роста в течение пяти суток при 25°C. Бактерии выращивали на среде LA, а грибы – на среде Чапека или PDA. После засева чашки инкубировали 48 часов при 30°C. Ингибирование роста грибов анализировали через 3-5 дней. В среду Чапека добавляли различное количество глюкозы (4%, 0,4%) или культивировали грибы без добавления глюкозы. В некоторых опытах бактерии засевали на чашки на 3 дня раньше, чем переносили блок со спорами гриба. В большинстве экспериментов засев бактерий и перенос блоков осуществляли одновременно, после чего чашку плотно заматывали парафильмом. В качестве контроля использовались разделенные чашки Петри, на которые переносили блок со спорами гриба на среду Чапека или PDA, но при отсутствии колоний бактерий-антагонистов на среде LA.

5.4. Действие на нематод. Одну половину чашки Петри с перегородкой заливали средой NGM для роста нематод, а вторую – средой LA. На половину чашки со средой NGM засевали клетки культуры *E. coli* MG1655, которые служат пищей для нематод *C. elegans* N2, и 10 червей-гермафродитов *C. elegans* N2 в стадии развития L4. Бактерии-продуценты

летучих веществ заседали на половину чашки Петри со средой LA. Чашки плотно заматывали парафильмом и инкубировали при 24°C. Рост и развитие нематод анализировали в течение 8 суток. Нематоды считались мертвыми, если они более не реагировали на прикосновения и не подавали признаков жизнедеятельности в ходе дальнейшего инкубирования на чашках. В контролях отсутствовали бактерии-продуценты летучих веществ. Количество взрослых нематод, яиц и форм L1-L4 подсчитывалось с помощью стереомикроскопа (Olympus SZ61, Olympus Corporation, Japan).

5.5. Действие на *D. melanogaster*. В пробирки (45 мл), содержащие агаризованную питательную среду с дрожжами, сахаром, манной крупой и изюмом, переносили 10 мух (5 самцов и 5 самок в возрасте 10 дней). Пробирки перемещали в стеклянные емкости на 340 мл с 50 мл среды LA, залитой вдоль стенок под углом к основанию контейнера в виде «косяков», на которую заседали бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*. Контейнеры плотно заматывали парафильмом и инкубировали при 25°C. Рост и развитие дрозофил анализировали в течение 5 суток. В контрольных экспериментах бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia* отсутствовали. Эксперименты проводились в трех биологических повторностях.

6. Определение действия индивидуальных ЛОС на микроорганизмы, нематод и дрозофил

В качестве тестируемых химических стандартов индивидуальных ЛОС использовались ДМДС (> 99% чистоты), 2-нонанон (> 99%), 2-гептанон (> 99%), 2-ундеканон (99%) и 1-ундецен (98 %) в жидкой форме (Sigma-Aldrich Chimie GmbH, Штайнхайм, Германия). Действие этих соединений на микроорганизмы, нематоды и дрозофилы определяли, как описано в предыдущих разделах, но вместо бактерий, синтезирующих летучие вещества, в небольшие емкости из фольги, помещенные в отверстия в среде LA, вносили аликвоты отдельных ЛОС. Чашки или пробирки с мухами плотно запечатывали парафильмом и инкубировали при температурах, указанных выше. В контролях ЛОС отсутствовали и вместо них вносили воду. Все эксперименты были проведены в трех-четыре биологических повторах, с двумя или тремя чашками или пробирками на эксперимент.

7. Анализ действия HCN

Полуколичественный анализ синтеза цианида водорода был проведен с помощью системы тестирования Aquaquant-14417.0001 (Merck). Культуры тестируемых штаммов

выращивали 48 ч с аэрацией при 28°C в LB, содержащем 2 г / л NaCl. Каждый штамм был тестировали на синтез HCN в двух повторностях.

8. Исследование влияния кетонов на фотосинтетический аппарат цианобактерий *S. sp.* PCC 7942

Эксперименты по изучению действия кетонов на фотосинтетический аппарат цианобактерий *S. sp.* PCC 7942 проводились совместно с сотрудниками кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

3 мл суспензии цианобактериальной культуры *S. sp.* PCC 7942 помещали в 5 мл флаконы с герметично закрывающейся крышкой. Кетоны 2-нонанон и 2-ундеканон в различных концентрациях разводили в 30 мкл этилового спирта, перемешивали с 0.5 мл среды BG11_N и добавляли к 3 мл суспензии клеток цианобактерий. В качестве контроля использовали 3 мл суспензии клеток цианобактерий с 30 мкл этилового спирта и 0.5 мл среды BG11_N без добавления кетонов. Конечные концентрации 2-нонанона составляли 1 мМ, 2 мМ, 5 мМ, а конечные концентрации 2-ундеканона составляли 0,2 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ.

Первые измерения параметров флуоресценции производили через 5 минут после добавления кетонов во флаконы с суспензией клеток цианобактерий. Между первым и последующим измерениями флаконы с суспензией клеток цианобактерий помещали на свет той же интенсивности, при которой проводили их культивирование (10 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹).

Для определения механизмов действия кетонов на процесс фотосинтеза в клетках цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 полученные результаты сравнивали с эффектами известных ингибиторов электронно-транспортной цепи фотосинтеза – гербицида DCMU (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) в конечной концентрации 5 мкМ и гидроксиламина в конечной концентрации 2 мМ.

9. Действие БМАА на рост *Nostoc sp.* PCC 7120

Небелковую аминокислоту β-метиламн-L-аланин (L-БМАА) заказывали в Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) в форме гидрохлорида L-БМАА (В-107). Действие БМАА на культуру *Nostoc sp.* PCC 7120 определялось в соответствии с с результатами измерений оптической плотности и концентрации хлорофилла.

9.1. Измерение оптической плотности. *N. sp.* PCC 7120 растили до оптической плотности 0.6 при длине волны 730 нм (A₇₃₀). Перед началом измерений (0 день) клетки

отмывали, разводили до оптической плотности 0.1 и растили в двух вариантах жидкой среды BG11 – в среде, не содержащей азот (BG11₀), и в среде с содержанием нитрата (BG11_{NO₃}). В случае культивирования *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11₀ клетки отмывали от среды с азотом и засеивали за двое суток до начала эксперимента, чтобы культура адаптировалась к диазотрофным условиям. Оптическую плотность культуры измеряли в кюветах объемом на 1 мл (Cat. No. 7590 15, GMBH, Germany) на спектрофотометре Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) при длине волны 730 нм. Измерения проводились в течение 6 дней. Культуру растили в 25 мл среды BG11 в присутствии различных концентраций БМАА - 20, 50, 100, 200 мкМ. В колбы с контрольными вариантами БМАА не добавляли. Измерения проводились в пяти биологических повторностях.

9.2. Измерение концентрации хлорофилла *a*. Для измерения количества хлорофилла *a* в клетках цианобактерий из каждой колбы отбирали по 1 мл суспензии. Образцы центрифугировали в течение 5 минут при 13000 об/мин (Hettich EBA12 UNIVERSAL 16/16R centrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttingen, Germany). Супернатант удаляли, осадок хранили при -20°C. Для экстракции хлорофилла *a* к осадку добавляли 1 мл 90% этанола, перемешивали на вортексе и оставляли на 20 минут. Клеточные фрагменты осаждали центрифугированием в течение 5 минут при максимальных оборотах. Супернатант переносили в кювету и измеряли абсорбцию на спектрофотометре Ultrospec 3000 при длинах волн 665 нм и 750 нм. Концентрацию хлорофилла (мкг/мл) рассчитывали по формуле [Webb *et al.*, 1992]:

$$[\text{Chl } a] = 13.9 * (A_{665} - A_{750}) * V_{\text{этанол}} / V_{\text{образца}}$$

10. Измерение нитрогеназной активности *N. sp.* PCC 7120

Нитрогеназная активность штамма *N. sp.* PCC 7120 определялась методом восстановления ацетилена. Для измерения нитрогеназной активности клетки *N. sp.* PCC 7120 культивировали на безазотистой среде BG11₀. По 1.5 мл культуры из каждой колбы помещали в 3 стеклянных флакона. Из каждого флакона через резиновую прокладку в крышке откачивали 0.4 мл воздуха с помощью шприца и вводили такое же количество ацетилена. Готовили два контрольных образца. В первом контроле вместо цианобактериальной культуры во флакон добавляли среду; из газовой фазы второго контроля, содержавшего культуру *N. sp.* PCC 7120, не отбирали воздух и не добавляли вместо него ацетилен. Флаконы помещались на качалку при комнатной температуре и при постоянном освещении на 2 часа. Затем отбирали по 1 мл из газовой фазы каждого флакона с помощью шприца и вводили в инжектор газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором (GC-FID) (Shimadzu Model GC-8AIF, Kyoto, Japan). Пики

выводились на экран компьютера с программным обеспечением Chromatography Station for Windows (CSW) version 1.7 (DataApex Ltd, Prague, The Czech Republic). Образец газовой смеси из флакона с культурой *N. sp.* PCC 7120 без добавления ацетилена не давал пика, соответствовавшего этилену, а при введении образца из флакона со средой на хроматограмме проявлялся небольшой этиленовый пик, определенное при этом количество этилена вычиталось из количества этилена, установленного при измерении экспериментальных образцов. Количество этилена (C_2H_4) выражалось в нмоль на мкг Chl а в час (нмоль [Eth]/мкг[Chl]*ч) и рассчитывалось в соответствии с [Carone и Montoya, 2001].

11. Флуоресцентная микроскопия

N. sp. PCC 7120 растили на средах $BG11_{NO_3}$ и $BG11_0$ в течение 5 дней при $25^\circ C$ на свету ($18 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) на качалке (90 грм). Клетки отмывали и засевали в колбы со средой $BG11$ без добавления источника связанного азота ($BG11_0$), с содержанием 17 мМ нитрата натрия ($BG11_{NO_3}$) или с содержанием 5 мМ хлорида аммония ($BG11_{NH_4}$) (этими же средами отмывали). В одном варианте на среде без азота культивировали клетки, уже выросшие ранее на среде $BG11_0$ и содержащие зрелые гетероцисты, а во втором варианте культивировали клетки, выросшие до этого на среде с азотом, то есть переносили их в условия голодания по азоту. При экспериментальном культивировании клеток на среде с аммонием их растили сначала на среде с нитратом, затем отмывали безазотистой средой. К клеткам, помещенным на среды $BG11_{NO_3}$ и $BG11_0$ (к обоим вариантам), добавляли 20 мкМ БМАА. Клетки на среде $BG11_{NH_4}$ инкубировали с различными концентрациями БМАА (20, 50, 100, 200 мкМ). Контрольные варианты не содержали БМАА. Колбы с клетками помещали на качалку на свет при $25^\circ C$. Образцы отбирали и микроскопировали через 48, 72 и 96 ч после засева.

Наблюдения проводились с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss) и объектива Plan-Neofluar 100x/1.30. Фотографии и измерения делали с помощью программного обеспечения Microscope Software AxioVision LE. При определении частоты гетероцист учитывали клетки с признаками зрелых гетероцист: круглые, с толстой клеточной стенкой, заметными полярными тельцами и заметно более слабой или отсутствующей аутофлуоресценцией хлорофилла. Для определения частоты гетероцист их количество учитывали не менее, чем на 600 вегетативных клеток в каждом варианте.

Размер клеток определяли с помощью инструмента Outline в программе AxioVision. Для оценки размера клеток измеряли их площадь клеток на 3 сутки роста культур на средах $BG11_{NO_3}$, $BG11_{NH_4}$ и $BG11_0$, в присутствии 20 мкМ БМАА на средах $BG11_{NO_3}$ и $BG11_0$, и в присутствии 100 мкМ БМАА на среде $BG11_{NH_4}$. В качестве контроля размеры клеток

измеряли в культуре *N. sp.* PCC 7120, которую растили на соответствующих средах без добавления БМАА. Для определения среднего размера клеток измеряли не менее 125 вегетативных клеток для каждого варианта. Измерения проводили в нескольких биологических повторностях. Для измерений использовали только те клетки, которые были сфотографированы в резком фокусе. Не учитывались размеры делящихся клеток.

12. Выделение геномной ДНК бактерий

50 мл цианобактериальной культуры, находящейся в экспоненциальной фазе роста, сгущали в 50 раз до 1 мл, центрифугировали, осадок суспендировали в 300 мкл лизирующего раствора лизоцима в концентрации 10 мг/мл (30 мг лизоцима, растворенного в 3 мл ТЕ/Трис·HCl) и инкубировали 1 час при 37°C. Далее добавляли SDS до конечной концентрации 2% и инкубировали 45 минут при 40°C до просветления смеси. Охлаждали, добавляли охлажденный во льду 5 М раствор NaCl до конечной концентрации 1М и смесь инкубировали 1 час на холоде (во льду). Экстракцию проводили равным объемом смеси фенол-хлороформ (1:1) и перемешивали на вортексе в течение 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали без охлаждения (10 мин; 12000 об/мин). Отбирали верхнюю водную фазу в чистую пробирку и повторно обрабатывали хлороформом для удаления следов фенола. После такой очистки добавляли к водной фазе 2,5 объема этанола. Инкубировали в течение ночи при -20°C. Затем центрифугировали спиртовой раствор ДНК 30 минут при 12000 об/мин, осадок ДНК промывали 70%-ым этанолом; подсушивали на воздухе. Растворяли в 50-100 мкл ТЕ (50мМ трис-HCl; 0,1мМ ЭДТА) [Koksharova et al, 1998].

Для выделения геномной ДНК из ночных культур штаммов *P. chlororaphis* использовали набор GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas).

13. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas.

14. Рестрикция ДНК

Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции проводилась согласно методике, описанной в [Миллер, 1976] и согласно инструкциям производителя рестриктаз (Fermentas).

15. Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле

Анализ фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном (Helicon) геле в буфере TAE (Fermentas) с добавлением 1 мкг/мл бромистого этидия (Amresco). Для определения длины

полученных фрагментов ДНК на агарозный гель наносили маркер GeneRuler 1 кб, GeneRuler High Range DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Пробы ДНК смешивали с шестикратным буфером для нанесения DNA-Loading dye (Fermentas). Для проведения электрофореза использовались источник питания «Эльф» (Helicon) и камера для электрофореза (Helicon). Фрагменты ДНК детектировали в геле при его облучении УФ светом с длиной волны 302 нм (трансиллюминатор ECX-F15.M, Vilber Lourmat Electronic Ballast, Sigma, France; система гель-документирования Gel Imager-2, артикул GI-2, Helicon).

16. Очистка ДНК из агарозного геля и из реакционных смесей

Для очистки ДНК из агарозного геля и из реакционных смесей (ПЦР, рестрикционные смеси, реакция лигирования) использовали наборы Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega.

17. ПЦР-амплификация

Реакцию амплификации ДНК (ПЦР) проводили на четырехканальном программируемом термостате ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология»). Стандартную реакцию ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей до 1 мкг матрицы ДНК, 25 мкл смеси DreamTaq PCR Master Mix (2X), которая включает DreamTaq DNA полимеразу, 2X DreamTaq буфер, 0.4 мМ каждого из dNTP: dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 4 мМ MgCl₂ (Thermo Scientific), по 10 пМ каждого праймера (ЗАО «Синтол»), воду без нуклеаз (Thermo Scientific). В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмидные ДНК или «варёнки» с колоний. Для приготовления «варёнки» клетки бактерий с поверхности агаризованной среды помещали в эппендорф, суспендировали в 100 мкл воды, эппендорф помещали в термостат «Гном» (ДНК-Технология), инкубировали при температуре 95°C в течение 10 мин, охлаждали во льду, центрифугировали 5 мин при 11000 об/мин, осадок отбрасывали; добавляли 5 мкл полученной матрицы на 50 мкл реакционной смеси.

Для генов *csaI* и *csaR* праймеры CSAIR-F и CSAIR-R (подобраны по последовательности AY040629 из ГенБанка). Праймеры PHZIR-F/PHZIR-R и CSAIR-F/CSAIR-R заказаны по статье [Веселова с соавт., 2008]. Праймеры для анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК заказаны по статье [Dahllöf *et al.*, 2000]. Синтез праймеров заказывали в компании "Синтол". Праймеры, использованные в работе, представлены в Таблице 3.

Таблица 3. ДНК-праймеры, использованные для амплификации нуклеотидных фрагментов

Название	Последовательность 5'-3'
CSAIR-F	CATGCACTGGTGGAAACGACCTG
CSAIR-R	ATGCCTGATTCAGCGAAGCCAC
CSAI-F	CAACGGCTGCAGGGCATCTCGGTGAATACC
CSAI-R	GACAGAGGATCCATGCCTGATTCAGCGAAG
PHZI-F	AGGTGCCAAGCCGGTACAA
PHZI-R	AGTAACCGCGTGCAGGCAT
PHZIR-F	GATCAATACGACACCGAGCACG
PHZIR-R	CATGTGCAGCGTGACTCCGTTTC
16S-F27	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S-R536	GTATTACCGCGGCTGCTG
NR401-F	CCGAATTCGATGCTGTTAGAGG
NR401-R	CCGAATTCGCTTCCAGCTCGAG
NR385-F	CCGAATTCCTCTGGAAGACG
NR385-R	CCGAATTCGCGTCTTGCATC
NR365-F	CCGAATTCGAGAAGGCAGTG
NR365-R	CCGAATTCGAGATCCGTGAC
NR359-F	CCGAATTCGAAGACTTGCAAGC
NR359-R	CCGAATTCGACGGTACTGGATG
nifH-F	CTATGCCTATCCGTGAAGG
nifH-R	CCAAGTTCATGATTAACCTCGTC
hetR-F	AGTTACCCAGCAATCTTCCC
hetR-R	ATAGAAGGGCATTCCCCAAG
ntcA-F	GAGCTTTTCCTCCTGTTGTC
ntcA-R	ACCTATCCGACTTGTTCCT
rnpB-F	ACTGATTTGAGGAAAGTCCG
rnpB-R	CTTTCACCCCTTACCAAGAG
glnA-F	GGTGATACAGCCTTCTTTGG
glnA-R	CTTGGAAGAATCTGTGGGG
nirA-F	CCAACAAAGGAGAAGGCAAT
nirA-R	AGAAACCACCAACTAACACG
hepA-F	TTCGGGTGAACTCATTAATACG
hepA-R	TTCTCTGACTCGCTTATTCAG
gltS-F	TAGAACATCGGGGTGGTTGT
gltS-R	CTACTCGCCAGCCCAATAC

Примечание. F - прямой праймер; R - обратный праймер

18. Лигирование фрагментов ДНК

Для лигирования фрагментов геномной ДНК после рестрикции в большом объеме сначала инактивировали рестриктазу при нагревании (65°C) в течение 20 минут. Реакцию лигирования ставили на лед. В эппендорфе смешивали 15 мкл рестрикционной смеси, 6 мкл лигазного буфера, 0.2 мкл фермента лигазы T4 и 38.8 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Таким образом, общий объем пробы составлял 60 мкл. Такое разведение порезанных фрагментов ДНК необходимо для обеспечения их лигирования самих на себя. Реакционную

смесь инкубировали при +4°C в течение 14-16 часов. Реакционную смесь после окончания реакции хранили при -20° С.

При лигировании продуктов ПЦР их необходимо очистить от полимеразы и ПЦР-буфера. Смесь для переосаждения ПЦР-продуктов содержала 8760 мкл 96% этанола, 300 мкл 5М ацетата натрия и 940 мкл воды. ПЦР-продукт и смесь для преципитации ДНК добавляли в эппендорф в пропорции 1:5 (например, 10 мкл ПЦР-продукта и 50 мкл смеси), перемешивали на Vortex, оставляли при комнатной температуре на 20 минут. Центрифугировали 20 минут при максимальных оборотах и отбирали спирт (супернатант). Далее промывали осадок ДНК добавлением 70% этанола в объеме, равном первоначальному объему смеси для переосаждения (50 мкл). Снова перемешивали на Vortex, центрифугировали 20 минут при максимальных оборотах и удаляли спирт. В открытых эппендорфах подсушивали осадок на воздухе и затем растворяли его в 16-20 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Результат переосаждения ПЦР фрагментов оценивали с помощью электрофореза.

При лигировании ПЦР-продуктов в вектор pJET1.2 в стерильный эппендорф добавляли 10 мкл двукратного реакционного буфера, 7 мкл очищенного ПЦР-продукта, 1 мкл фермента (DNA blunting enzyme), преобразующего концы фрагментов ДНК в тупые, перемешивали касанием на Vortex, центрифугировали в режиме «spin down» и инкубировали 5 минут при 70°C. Охлаждали смесь на льду и добавляли 1 мл вектора pJET1.2/blunt и 1 мкл ДНК лигазы T4. Перемешивали касанием на Vortex, центрифугировали в режиме «spin down» и инкубировали от 5 до 30 минут при комнатной температуре.

19. Трансформация клеток *E. coli*

19.1. Получение компетентных клеток. Вносили 1 мл ночной культуры в 250 мл колбу, где находилось 100 мл LB. Выращивали клетки при 37°C и качании 200 об/мин до достижения оптической плотности культуры $\sim 5 \cdot 10^7$ клеток/мл. Затем охлаждали клетки во льду в течение 10 минут и центрифугировали при 3000 g и 4°C в течение 5 мин. После удаления супернатанта осадок осторожно суспендировали в 50 мл охлажденного во льду стерильного раствора 50мМ CaCl₂ и 10мМ Tris-HCl (pH 8.0). Суспензию помещали в лед на 15 минут, затем центрифугировали при 3000g 5 минут при 4°C. Надосадочную жидкость сливали, а клетки ресуспендировали в 0.1 исходного объема (в 10 мл) охлажденного во льду стерильного раствора 50мМ CaCl₂ и 10мМ Tris-HCl с 10% глицерина. Клеточную суспензию расфасовывали по предварительно охлажденным эппендорфам по 200 мкл на пробирку. Хранили при -70°C.

19.2. Трансформация. К 200 мкл компетентных клеток добавляли плазмидную ДНК и выдерживали 30 минут во льду. Затем инкубировали 90 секунд при 42°C в термостате «Гном». Добавляли к клеткам 1 мл среды LB комнатной температуры и подращивали 1,5 часа при 37°C. Центрифугировали при 5000 об/мин, 5 мин. С помощью шпателя высеивали на твердую агаризованную среду LA с соответствующими антибиотиками.

20. Транспозонный мутагенез *Synechococcus* sp. PCC 7942

Транспозон Tn5-692 (в плазмиде pRL692: GenBank accession no. AF424805) [Koksharova и Wolk, 2002] является производным транспозона Tn5, который несет устойчивость к эритромицину (Em), спектиномицину (Sp), и стрептомицину (Sm); содержит pMB1 *oriV*; и несет мутации [Zhou et al, 1998], которые увеличивают частоту транспозиции.

При подготовке к транспозонному мутагенезу клетки дикого типа *S. sp.* PCC 7942 в течение 5 дней растили в 50 мл среды BG11_N в колбах Эрленмейера на 125 мл на роторном шейкере при 25°C и интенсивности света 20-22 мкЕ м⁻² с⁻¹. Для конъюгационного переноса транспозона Tn5-692 использовали клетки *E. coli* HB101 с плазмидой pRL692, несущей транспозон, и клетки *E. coli* HB101 с конъюгативной плазмидой pRL443, необходимой для мобилизации плазмиды pRL692. Ночные культуры штаммов *E. coli*, несущих плазмиды, разводили в 1000 раз средой LB и подращивали в колбах на качалке при 37°C в течение 2 часов с добавлением в среду соответствующих антибиотиков. *E. coli* с плазмидой pRL692 растили с добавлением стрептомицина (25 мкг/мл), спектиномицина (50 мкг/мл) и эритромицина (50 мкг/мл), а *E. coli* с плазмидой pRL443 растили с добавлением ампицилина (50 мкг/мл). После подращивания клетки *E. coli* отмывали средой LB от антибиотиков. Затем смешивали в одном эппендорфе по 50 мкл суспензии *E. coli* с плазмидой pRL692, 50 мкл суспензии *E. coli* с плазмидой pRL443 и 100 мкл суспензии *S. sp.* PCC 7942, предварительно сгущенной в 50 раз. После инкубации в течение часа при комнатной температуре на неярком свету, бактериальные смеси наносили на стерильные нитроцеллюлозные фильтры, помещенные на чашки Петри с агаризованной средой BG11_N, содержащей 5% LB. Чашки инкубировали в течение 24 ч при 25°C (интенсивность света 10 мкЕ м⁻² с⁻¹), а затем фильтры переносили на чашки со средой BG11_N, давали подрасти клеткам цианобактерий в течение двух суток, и потом фильтры перемещали на чашки Петри, содержащие агаризованную среду роста BG11_N с добавленными антибиотиками спектиномицином (10 мкг/мл) и эритромицином (10 мкг/мл). Колонии мутантов обычно появлялись на фильтрах через 15-20 дней.

21. Селекция транспозонных мутантов *S. sp.* PCC 7942, устойчивых к кетонам

Транспозонные мутанты цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 подвергались селекции в присутствии отдельных кетонов (2-нонанона, 2-гептанона и 2-ундеканона). На чашку с агаризованной средой BG11_N засеивались колонии мутантов, полученные в результате транспозонного мутагенеза. На поверхность агара в центре чашки Петри помещалась лунка из фольги, в которую вносили по 100 мкмоль одного из трех кетонов. Чашки заматывали 2 слоями парафильма. Для дальнейших исследований отбирались мутанты, устойчивые к действию 2-нонанона (NR-мутанты, «nonanone resistant»), 2-гептанона (HepR-мутанты, «heptanone resistant») и 2-ундеканона (UndR-мутанты, «undecanone resistant»).

22. Клонирование и секвенирование генов *S. PCC 7942*, определяющих чувствительность к действию 2-нонанона

Транспозон Tn5-692 содержит сайт начала репликации *oriV*, активный в *E. coli*. Поэтому для того, чтобы клонировать фрагменты геномной ДНК *S. PCC 7942*, соседствующую со встроенным транспозоном, геномная ДНК, выделенная из NR-мутантов, была отдельно порезана ферментом рестрикции *SalI*, сайт узнавания для которой отсутствует в транспозоне. Полученные рестрикционные фрагменты были подвергнуты лигированию сами на себя с помощью T4 ДНК лигазы, и использованы для трансформации компетентных клеток *E. coli* XL-Blue. Отбирались бактериальные колонии, устойчивые к Sp, Sm, Em. После подрашивания в жидкой среде с антибиотиками из них выделялась плазмидная ДНК.

Секвенирование последовательностей ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (—Applied Biosystems®, США). Анализ продуктов реакции проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ. Результаты секвенирования обрабатывали в программах ChromasPro 2.33 или BioEdit 7.2.5.

Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

23. Выделение РНК и синтез кДНК

Выделение суммарной РНК из цианобактериальных клеток проводили с помощью TRIzol-реагента (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) согласно методике производителя (1:3 культура клеток: TRIzol) с последующей экстракцией хлороформом (1:5 хлороформ: TRIzol) и преципитацией изопропанолом (1:1). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой

DNase I (Thermo Scientific) и дальше использовали для синтеза кДНК с обратной транскриптазой H-minus Mu-MLV (Thermo Scientific).

24. ПЦР в реальном времени

Для ПЦР в реальном времени использовали флуоресцентный краситель SYBR Green Supermix (Bio-Rad) и амплификатор с системой детекции CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Данные ПЦР в реальном времени анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager и QuantaSoft (Bio-Rad). В работе использовались ген-специфические праймеры: *rnpB*, *rnpB-F/ rnpB-R*; *nifH*, *nifH-F/nifH-R*; *hetR*, *hetR-F/hetR-R*; *ntcA*, *ntcA-F/ntcA-R*; *glnA*, *glnA-F/glnA-R*; *nirA*, *nirA-F/nirA-R*; *hepA*, *hepA-F/hepA-R*; *gltS*, *gltS-F/gltS-R*. Праймеры указаны в Таблице 3. Синтез праймеров был осуществлен в компании "Синтол". Режим ПЦР в реальном времени включал денатурацию при 95°C в течение 30 секунд, 30 циклов при 95°C по 5 секунд, 60°C по 30 секунд. for 30 s, and 65°C for 30 s. Анализ данных осуществляли с помощью Bio-Rad CFX Manager 3.0.

Значения циклов амплификации в точке пересечения кинетической кривой накопления продукта амплификации с линией порогового уровня флуоресценции (Ct) транскриптов изучаемых генов нормировались относительно значений для гена *rnpB*, кодирующего РНК-субъединицу рибонуклеазы Р, часто используемого для ПЦР в реальном времени [Pinto *et al.*, 2012]. После каждой реакции проводился анализ конечных точек кривых плавления для каждой пробы, чтобы убедиться в отсутствии неспецифических ПЦР-продуктов. Все эксперименты с использованием ПЦР в реальном времени проводились в трех биологических повторностях и в двух или трех технических. Относительные изменения уровней экспрессии генов рассчитывались с помощью метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ [Livak и Schmittgen, 2001].

Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени указаны в Таблице 3.

Данные представлены как среднее арифметическое трех отдельных биологических повторов с рассчитанными стандартными отклонениями. Для каждого из вариантов уровни мРНК сравнивали с контролем.

25. Определение внутриклеточных концентраций ионов кальция в культуре

N. sp. PCC 7120

Культуру цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 выращивали в жидкой среде BG11_N, с 10 mM Нерес при pH 7.5. Культуру растили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл при комнатной температуре при постоянном освещении на вращающейся качалке в течение 5 дней.

25.1. Окрашивание флуоресцентным красителем Fura 2-AM. Ампулу Fura-2-AM (50 мкг) растворяли в 6.25 мкл ДМСО. Из этого стокового раствора готовили 1.0 мМ раствор Fura 2-AM путем добавления к нему 43.7 мкл 99.5% этанола. Затем 50 мкл 1.0 мМ раствора Fura-2-AM фасовали в эппендорфы на 1.5 мл по 5 мкл и ставили в полную темноту (темную коробку) на -20°C . Затем готовили раствор плюроновой кислоты. Для этого растворяли 0.1 г плюроновой кислоты в 0.5 мл ДМСО (получали 20% раствор плюроновой кислоты). Затем это количество расфасовывали в 0.5 мл эппендорфы по 2 мкл и ставили в полную темноту (темную коробку) на -20°C .

К 1 мл цианобактериальной суспензии, предварительно доведенной цитратным буфером до pH 5.5, в полной темноте добавляли 5 мкл Fura 2-AM, 3.7 мкл абсолютного этанола и 1.3 мкл плюроновой кислоты. Для подкисления среды (pH 5.5) к 1 мл культуры добавляли ~40 мкл буфера, содержавшего 56.85 мл 28.4 г/л Na_2HPO_4 и 43.15 мл 21 г/л лимонной кислоты. После добавления реагентов эппендорфы заматывали в фольгу и инкубировали на водяной бане при 25°C в течение 5 часов и перемешивали покачиванием каждые 30 минут. Затем образцы центрифугировали при 3500 об/мин в течение 8 минут и дважды отмывали подкисленной средой BG11_N (pH 5.5).

25.2. Измерение флуоресценции. Для определения отношения интенсивности флуоресценции клеток цианобактерий, окрашенных Fura 2-AM, после возбуждения при двух длинах волн – 340 нм и 380 нм, и эмиссии при 510–550 нм мы использовали эпифлуоресцентный микроскоп (Axiovert 10; Zeiss, Оберкохен, Германия), оснащенный электромагнитным сменщиком фильтров (Zeiss), ксеноновой лампой (XBO 75; Zeiss), фотометром (Zeiss), микропроцессором (MSP 201; Zeiss) и персональным компьютером. Измерения флуоресценции производили на отдельных клетках цианобактерий с помощью объектива EC Plan-Neofluar 40x/0.75 для фазового контраста. Мы добавляли 50 мкл цианобактериальной суспензии, окрашенной Fura 2-AM, на круглое стекло (42 мм x 0.17 мм, Helmut Saur Laborbedarf, Germany) для микроскопии, покрытое L-полилизинном (MW 150000–300000; Sigma). Стекло устанавливалось под объектив микроскопа. Затем выбирался флуоресцирующий филамент и фокус наводился на одну из клеток этого филамента и проводилось измерение отношения флуоресценций при двух длинах волн (R340/380 нм). Через 20 минут после начала измерений добавляли агент с помощью шприца или дозатора в точку, где происходило измерение.

При расчетах и построении графиков учитывались значения флуоресценции после наступления стабильности R340/380. В начале измерений значения могли сильно падать или резко увеличиваться. Допустимо наличие 5-10% колебаний, чтобы считать кривую стабильной.

В качестве отрицательного контроля мы добавляли к клеткам цианобактерий среду BG11_N, содержащей ионы Ca²⁺. В качестве положительного контроля мы добавляли к клеткам цианобактерий абсцизовую кислоту (АВА), которая увеличивает концентрацию внутриклеточного кальция при действии на клетки цианобактерии *Nostoc* 6720 на 20% [Smith *et al.*, 1987].

В качестве более реакционной формы БМАА мы добавляли соединение β-карбамат, полученное в результате смешения 0.5 мМ БМАА с 1 мМ NaHCO₃ или 1 мМ KHCO₃. Для контроля действия β-карбамата мы также определяли эффект KHCO₃ на изменение концентрации кальция в клетках.

Чтобы определить, будет ли добавление БМАА приводить к изменению концентрации ионов кальция в клетках в случае, если глутаматный рецептор будет связан со своим лигандом – L-глутаматом, к клеткам дикого типа сначала добавляли 10 мкМ L-глутамата, а затем после установления стабильных значений флуоресценции добавляли к тому же образцу 10 мкМ БМАА.

25.3. Построение калибровочной кривой *in situ*. Калибровка отношения флуоресценции (340/380 нм) к концентрации свободного Ca²⁺ *in situ* проводилась на отдельных флуоресцирующих филаментах цианобактерий. На предметное стекло для микрофотоирования с нанесенным L-полилизинном добавляли 50 мкл цианобактериальной суспензии, окрашенной Fura 2-AM. Через 20 минут после начала измерений с помощью шприца или дозатора в точку, где происходило измерение, добавляли следующие растворы [Thomas и Delaville, 1991]:

- 1) 1 мкл 200 мМ этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТА), 1.5 М Tris-HCl, pH 8.7;
- 2) 1 мкл 160 мкМ ионофора кальция Br-A23187;
- 3) 2 мкл 250 мМ CaCl₂ добавляли, когда достигалось минимальное значение отношения 340/380 нм;
- 4) 4 мл 72.5 мМ MnCl₂ добавляли, когда достигалось максимальное значение отношения 340/380 нм.

Калибровочная кривая строилась в соответствии с Grynkiewicz *et al.* (1985) по формуле:

$$[Ca^{2+}] = Kd(R - R_{min}) / (R_{max} - R) * Sf2/Sb2, \text{ нМ}$$

Где R_{min} – значения отношения флуоресценций, когда ионы Ca²⁺ находятся в свободном состоянии; R_{max} – значения отношения флуоресценций, когда ионы Ca²⁺ находятся в связанном состоянии; Sf2/Sb2 – отношение значений флуоресценции свободного Ca²⁺ к связанному Ca²⁺ при 380нм.

Мы определили средние значения для R_{min} , R_{max} и $Sf2/Sb2$, величина константы диссоциации (K_d) для комплекса $[Ca^{2+}$ -Fura 2-AM] равна 135 нМ [Grynkiewicz *et al.*, 1985].

Средние значения R_{min} , R_{max} , $Sf2$ и $Sb2$ были получены после семи независимых измерений для построения калибровочной кривой *in situ*. Значения концентраций указаны со стандартным отклонением (\pm SD).

26. Статистический анализ

Достоверность результатов работы основана на воспроизводимости полученных экспериментальных закономерностей, использовании аттестованного измерительного оборудования, стандартизированных и современных методов исследования (биологических, физико-химических и др.). Для получения статистически достоверных данных все эксперименты проводили минимум в трех биологических повторностях.

Статистический анализ экспериментов проводился с использованием программного обеспечения JMP8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, США). Для экспериментов на чашках средние и стандартные ошибки были рассчитаны с использованием программы описательной статистики в Excel для Windows. Различия между данными были значимыми на уровне $p < 0.05$.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 1. Биологическая активность летучих органических соединений почвенных бактерий

Первая часть работы посвящена исследованию действия летучих веществ почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на различные прокариотические организмы, а именно фитопатогенные грибы, бактерии, в том числе цианобактерии, и эукариотические – дрозифилу и нематоды. С этой целью были проведены следующие этапы работы:

- скрининг штаммов *P. chlororaphis*, синтезирующих АГЛ, из коллекции почвенных бактерий с помощью биосенсоров;
- анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штаммов *P. chlororaphis* для уточнения их таксономической принадлежности;
- исследование генов, относящихся к QS регуляции у штаммов *P. chlororaphis*;
- выделение АГЛ из культур бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов и проведение тонкослойной хроматографии для их идентификации;
- определение действия летучих веществ бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на фитопатогенные агробактерии и *Erwinia carotovora* 133;
- определение действия летучих веществ бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942;
- определение действия летучих веществ бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на грибы *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Pericularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Helminthosporium sativum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia rolfsii*, *Colletotrichum* sp.;
- определение действия летучих веществ бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на дрозифил;
- определение действия летучих веществ бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на нематод;
- определение качественного состава смеси ЛОС с помощью масс-спектрального анализа в совместной работе с лабораторией д.б.н. Л. С. Чернина, Иерусалимский университет;
- определение действия идентифицированных индивидуальных летучих соединений на фитопатогенную бактерию *A. tumefaciens* C58, гриб *R. solani*, цианобактерию *S. sp.* PCC 7942, дрозифил и нематод;
- определение действия идентифицированных индивидуальных летучих соединений на фотосинтетический аппарат *S. sp.* PCC 7942;

- получение мутантных штаммов *S. sp.* PCC 7942, устойчивых к действию индивидуальных летучих соединений;

- локализация транспозонных мутаций в генах *S. sp.* PCC 7942.

Все исследованные бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas* (*Pseudomonas chlororaphis*, *P. fluorescens* B-4117) и *Serratia plymuthica* IC1270 являются ассоциированными с растениями и выделены из ризосферы растений. *P. chlororaphis* 449, *P. chlororaphis* 30-84, *P. fluorescens* B-4117 и *Serratia plymuthica* IC1270 обладают антагонистической активностью против фитопатогенных микроорганизмов и активны в биологической борьбе против заболеваний растений [Ovadis *et al.*, 2004; Vespermann *et al.*, 2007; Veselova *et al.*, 2009; Dandurishvili *et al.*, 2011]. Бактерии *S. proteamaculans* могут также обитать в почве и ризосфере растений. Поэтому можно было ожидать, что исследуемый нами штамм *S. proteamaculans* 94 будет обладать антагонистической активностью против микроорганизмов, в том числе, против фитопатогенов.

В работе была исследована роль глобальных регуляторных генов GacA/GacS системы и сигмы S субъединицы РНК-полимеразы, гена *vfr* (гомолог гена белка катаболитной репрессии Crp) и генов QS регуляции в контроле синтеза ЛОС *Pseudomonas chlororaphis*, *Serratia plymuthica* и *Serratia proteamaculans*.

1. Скрининг штаммов, синтезирующих АГЛ, из коллекции почвенных бактерий *Pseudomonas*

Ризосферные бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia* выделяются среди различных таксономических групп ризобактерий, стимулирующих рост растений, спектром благоприятных для растений свойств. Группа бактерий *Pseudomonas* и некоторые виды *Serratia* характеризуется QS-регуляцией экспрессии генов. Так как QS-регуляция экспрессии генов играет значимую роль в синтезе вторичных метаболитов, то первым этапом работы было определение способности различных штаммов бактерий *P. chlororaphis* синтезировать сигнальные молекулы N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ), необходимые для QS регуляции, и отбора активных штаммов-продуцентов для дальнейших исследований мы провели определение синтеза АГЛ в коллекции штаммов почвенных и ризосферных бактерий, относящихся к различным видам *Pseudomonas*.

Способность бактерий продуцировать АГЛ определялась с использованием репортерного штамма *Chromobacterium violaceum* CV026. В штамме *C. violaceum* CV026 инсерцией транспозона mini-Tn5 инактивирован ген синтазы АГЛ *cviI*, которая отвечает за синтез C₆-ГЛ. Мутация в этом гене приводит к отсутствию синтеза АГЛ и фиолетового пигмента виолацеина. Синтез виолацеина в штамме CV026 индуцируется C₆-ГЛ и другими

АГЛ с длиной боковых ацильных цепочек от C₄ до C₈ с различной степенью чувствительности. Штамм CV026 не чувствителен к АГЛ с длинными ацильными боковыми цепочками (от C₁₀), а также к ряду 3-оксо- и 3-гидрокси- производных АГЛ [McClellan *et al.*, 1997].

Определение синтеза АГЛ проводили на чашках с использованием репортера *S. violaceum* CV026 (Рисунок 8). Синтез АГЛ был исследован у штаммов бактерий *Pseudomonas*, выделенных из различных почв и ризосферы растений в различных географических зонах России и республик бывшего СССР. С помощью репортера CV026 синтез АГЛ был обнаружен у всех исследованных штаммов *Pseudomonas*: 7 штаммов *P. chlororaphis* и 2 штаммов *P. aureofaciens* (Таблица 4).

Таблица 4. Определение синтеза АГЛ бактериями *Pseudomonas*

Название штамма	CV026**
<i>P. aureofaciens</i> 30-84*	+++++
<i>P. aureofaciens</i> ATCC 13985	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 62	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 64	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 66	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 205c	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 445	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 464	+++++
<i>P. chlororaphis</i> 449	+++++

Примечание. *Штаммы *P. aureofaciens* 30-84 был использован в качестве положительного контроля

**Интенсивность синтеза виолацеина штаммом CV026 оценивали визуально от + до +++++

Полученные нами данные свидетельствуют о способности ризосферных бактерий синтезировать АГЛ, и дополняют уже имеющиеся в литературе сведения. У всех штаммов наблюдается интенсивный синтез АГЛ при перекресте с CV026.

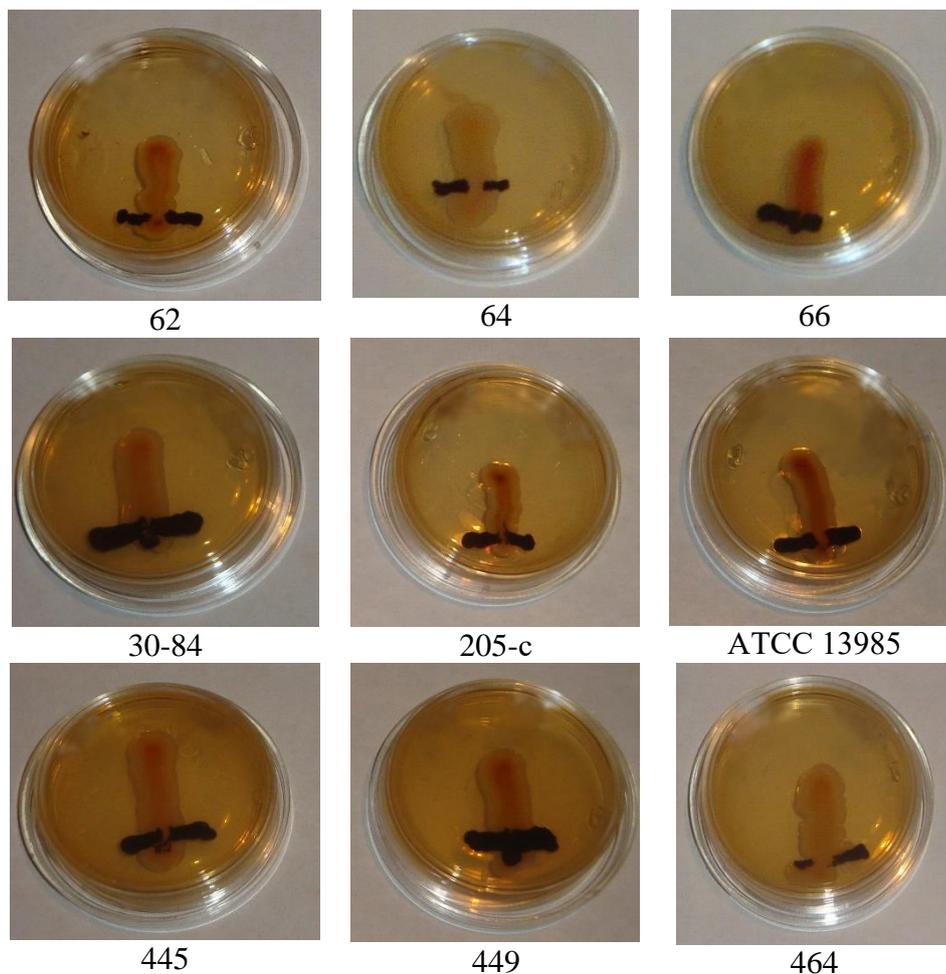


Рисунок 8. Определение синтеза АГЛ в штаммах *Pseudomonas* с использованием в качестве репортера штамма *C. violaceum* CV026

Вертикальный штрих на всех фотографиях — исследуемый штамм, горизонтальный штрих — штамм CV026

При использовании в качестве репортера штамма *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 штаммы, продуцирующие АГЛ, вызывали появление голубых зон гидролиза X-Gal (Рисунок 9).

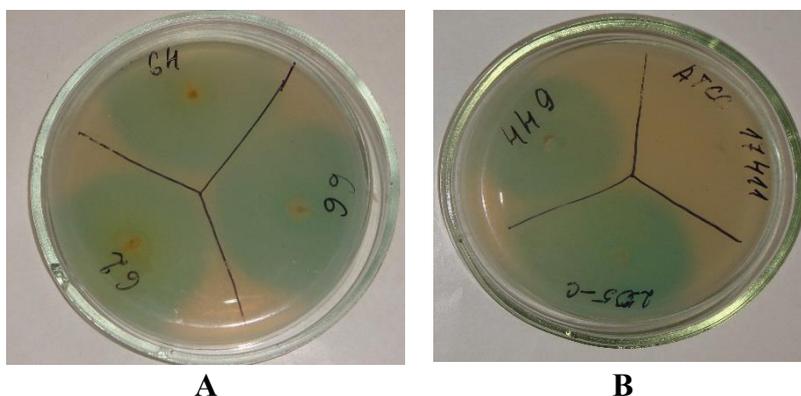


Рисунок 9. Определение наличия АГЛ в культуральных экстрактах *P. chlororaphis* 62, 64, 66 (А) и *P. chlororaphis* 449, 205-с и ATCC 17411 (В) с помощью биосенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4

2. Уточнение идентификации штаммов *Pseudomonas chlororaphis* с помощью секвенирования генов 16S рРНК

Штаммы *P. chlororaphis* (Таблица 1) были идентифицированы ранее на основании обычно применяемых микробиологических и биохимических тестов. Для более точной филогенетической идентификации штаммов мы использовали молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). Матрицы для секвенирования синтезировали с помощью ПЦР, используя праймеры 16S-F27 и 16S-R536 (Таблица 3), указанные в статье Dahllöf *et al.* (2000). ПЦР проводили в следующем режиме: 94°C - 5 минуты; 25 циклов 94°C - 30 сек.; 55°C – 1.5 мин.; 72°C – 1.5 мин; 72°C - 10 минут. Продукты амплификации разделяли в 1,5 % агарозном геле. Фрагменты размером около 500 п.н. вырезали и очищали с помощью набора QIAtip25 (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Секвенирование последовательностей ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН.

Сравнительный анализ отсеквенированных последовательностей исследуемых штаммов с генами 16S рРНК из базы данных GenBank при помощи программы BLAST показал, что гены, кодирующие 16S рРНК исследуемых штаммов, на 99% гомологичны генам других штаммов *Pseudomonas chlororaphis*. Таким образом, сравнительный анализ 16S рРНК показал, что филогенетически данные штаммы относятся к виду *Pseudomonas chlororaphis*.

3. Идентификация генов двух QS систем с помощью ПЦР

Среди представителей почвенных бактерий *P. aureofaciens* и *P. chlororaphis* в настоящее время известны штаммы, активные в биологической борьбе против фитопатогенных грибов и бактерий, вызывающих заболевания растений. Антагонистическая активность таких почвенных бактерий обусловлена синтезом широкого спектра низкомолекулярных вторичных метаболитов, среди которых соединения с антибиотической активностью (например, феназины), HCN, сидерофоры.

QS-системы были изучены у одного из представителей вида *P. chlororaphis* - *P. chlororaphis* 449 [Веселова с соавт., 2008] и штамма *P. aureofaciens* 30-84. Было показано, что у этого штамма синтез феназиновых антибиотиков находится под контролем PhzI-PhzR QS системы [Zhang и Pierson, 2001].

Для определения наличия генов *phzI* и *phzR* у исследуемых нами штаммов *P. chlororaphis*, были подобраны праймеры PHZIR-F и PHZIR-R по нуклеотидной последовательности соответствующих генов у штамма 30-84 (Таблица 3); праймеры были

подобраны в концах фрагмента ДНК, включающего оба гена *phzI* и *phzR*, что позволяло определять наличие сразу двух генов. С этих праймеров с ДНК всех исследуемых штаммов амплифицировался фрагмент размером 1075 п.н., такой же, как и в случае с *P. aureofaciens* 30-84, используемого в качестве контроля (Рисунок 10).

Используя пары праймеров CSAIR-F и CSAIR-R, подобранные по нуклеотидной последовательности генов *csaI* и *csaR* второй QS системы штамма 30-84 (Таблица 3), мы определили, что все изучаемые штаммы вида *P. chlororaphis* содержат гены *csaI* и *csaR* (Рисунок 10). С праймеров CSAIR-F и CSAIR-R с ДНК всех исследуемых штаммов амплифицировался фрагмент размером 1330 п.н., такого же размера, как и в случае с *P. aureofaciens* 30-84, используемого в качестве контроля.

Режим для ПЦР на *phz*-систему: начальная денатурация 94°C — 2 минуты (1 цикл); последующие 30 циклов 94°C — 40 секунд, 60°C — 20 сек., 72°C — 1 минута; последний цикл 72°C — 4 минуты. Режим для ПЦР на *csa*-систему: начальная денатурация 94°C — 2 минуты (1 цикл); последующие 30 циклов 94°C — 40 секунд, 59°C — 20 сек., 72°C — 1 минута; последний цикл 72°C — 4 минуты. Пробы хранились в амплификаторе при температуре 4°C.

Таким образом, спомощью ПЦР мы определили, что у всех исследованных штаммов *P. chlororaphis* есть две QS системы PhzI/PhzR и CsaI/CsaR, ответственные за синтез N-гексаноил-гомосеринлактона (C₆-ГЛ) и N-бутаноил-гомосеринлактона (C₄-ГЛ), соответственно.

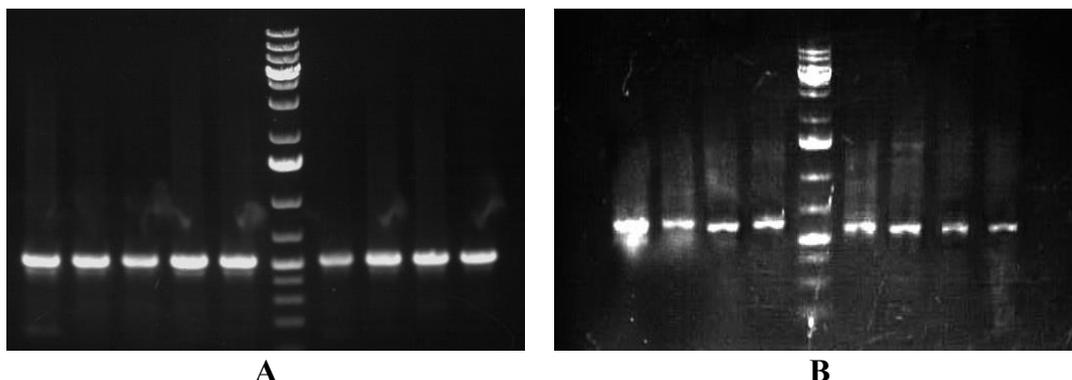


Рисунок 10. Гель-электрофорез ПЦР-продуктов генов *phzI/phzR* (А) и генов *csaI/csaR* (В). ДНК матрицы слева направо (А): *P. chlororaphis* 62, 64, 66, 205-с, 464, 445, 449, АТСС 13985, 30-84. ДНК матрицы слева направо (В): *P. chlororaphis* 62, 64, 66, 205-с, 464, 445, 449, 30-84.

4. Синтез АГЛ у штаммов *Pseudomonas* и *Serratia*

Способность синтезировать АГЛ в штаммах определяли с использованием репортеров *S. violaceum* CV026 и *A. tumefaciens* NT1/pZLR4.

При использовании в качестве репортера штамма *C. violaceum* CV026 штаммы, активно продуцирующие АГЛ, вызывали интенсивное фиолетовое окрашивание репортерного штамма вследствие синтеза пигмента виолацеина.

Для разделения и идентификации АГЛ в экстрактах была использована методика [Shaw *et al.*, 1997], в основе которой лежит C_{18} -обращенно-фазовая тонкослойная хроматография. ТСХ с применением специфических биосенсоров позволяет проводить быструю идентификацию АГЛ в культуральных экстрактах. Эта методика может быть использована для оценки видов АГЛ и приблизительного количества экстрагированных АГЛ, однако, она не предоставляет точных данных об их структуре.

По результатам ТСХ с использованием тестерной системы (на основе репортера CV026) у *P. aureofaciens* 30-84 было подтверждено наличие следующих АГЛ (Рисунок 11): C_4 -ГЛ (N-бутаноил-L-гомосеринлактон), C_6 -ГЛ (N-гексаноил-L-гомосеринлактон) и $3OC_6$ -ГЛ (N-(3-оксо-октаноил)-L-гомосерин лактон) [Khan *et al.*, 2007], а также был обнаружен четвертый, минорный тип АГЛ, предположительно, $3OC_8$ -ГЛ.

Данные показывают, что у штаммов *S. proteamaculans* обнаружен синтез двух АГЛ (Рисунок 11) C_6 -ГЛ и $3OC_6$ -ГЛ; у мутанта *sprI* синтез АГЛ отсутствует; а мутант *sprR* синтезирует C_6 -ГЛ и $3OC_6$ -ГЛ, как и *S. proteamaculans*. Активным продуцентом АГЛ является штамм *P. chlororaphis* 449, продуцирующий 3 типа АГЛ, а именно C_4 -ГЛ, C_6 -ГЛ, $3OC_6$ -ГЛ.

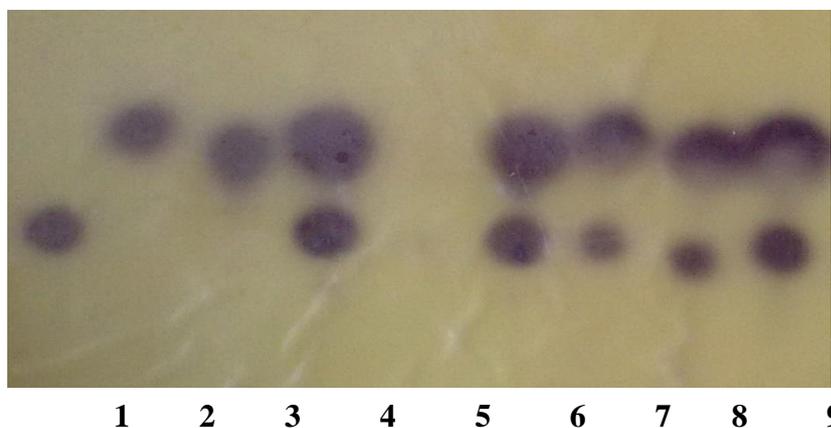


Рисунок 11. Идентификация АГЛ в культуральных экстрактах *P. chlororaphis* и *S. proteamaculans*

1 — C_6 -ГЛ; 2 — C_4 -ГЛ; 3 — $3OC_6$ -ГЛ; 4 — экстракт АГЛ из *P. aureofaciens* 30-84; 5 — экстракт АГЛ из *sprI*; 6 — экстракт АГЛ из *P. aureofaciens* 30-84 (разведен в 2 раза); 7 — экстракт АГЛ из *S. proteamaculans*; 8 — экстракт АГЛ из *S. proteamaculans* (разведен в 2 раза); 9 — экстракт АГЛ из *sprR*.

В качестве сенсора использован штамм *C. violaceum* CV026;

5. Определение действия летучих веществ бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на различные микроорганизмы

Следующим этапом работы было изучение влияния летучих веществ, образуемых бактериями *Pseudomonas* и *Serratia*, на рост фитопатогенных бактерий, цианобактерий и различных грибов. Ранее предполагалось, что все штаммы (за исключением *S. proteamaculans*), продуцирующие летучие вещества, могут выступать в качестве потенциальных агентов биологического контроля по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам [Dandurishvili *et al.*, 2011; Veselova *et al.*, 2008; Khmel *et al.*, 1998; Ovadis *et al.*, 2004], и что летучие вещества, выделяемые штаммами *Pseudomonas* и *Serratia*, вносят значительный вклад в их антагонистическую способность против этих фитопатогенов. Несмотря на то, что штамм *S. proteamaculans* 94 был выделен из испорченного мяса, а не из почвы или ризосферы растений, мы все же решили использовать его в этом исследовании, так как некоторые другие штаммы *Serratia proteamaculans* были выделены из ризосферы растений, например, из ризосферы рапса [Berg *et al.*, 2002].

Чтобы установить, действительно ли летучие вещества бактерий негативно влияют на рост микроорганизмов, мы применили систему совместного культивирования бактерий-продуцентов летучих веществ и микроорганизмов, на которые изучалось действие летучих веществ. Для этого использовали разделенные перегородкой чашки Петри. Питательные среды были разделены физическим барьером, поэтому антагонистическая активность бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* могла быть обусловлена только действием их летучих веществ. Таким образом, исключалась возможность подавления за счет других механизмов антагонизма.

5.1. Определение действия летучих веществ бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на фитопатогенные бактерии

Мы исследовали действие летучих веществ штаммов *P. chlororaphis* 449, 64, 62, 66, 445, 464, 205-с, *P. aureofaciens* ATCC 13985 и 30-84, *P. fluorescens* B-4117, *S. plymuthica* IC1270 и *S. proteamaculans* 94 на фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* C58, B6, 1D1, 636 и 388, а также *Erwinia carotovora* 133. Наиболее подробно было изучено действие бактерий *P. chlororaphis* на *A. tumefaciens* C58.

5.1.1. Действие на *Agrobacterium tumefaciens* C58

Бактерии *Agrobacterium tumefaciens* вызывают образование опухолей стебля двудольных растений, корончатых галлов. Адгезия бактерий к клеткам растения происходит в местах повреждений. Вирулентность *A. tumefaciens* обусловлена наличием в

клетках бактерий Ti-плазмиды (tumor inducing plasmid), специфический T-участок которой способен включаться в клетки двудольных растений и внедряться в их ядерную ДНК, что ведет к образованию специфических опухолей [Gelvin, 2012].

Эксперимент проводили в соответствии с методикой, указанной в разделе «Материалы и методы». Культивирование *A. tumefaciens* C58 проводили на среде PDA; на среде LA эффекта практически не было. Опыты с совместным культивированием с бактериями-антагонистами проводились на чашках с перегородками. Бактерии-антагонисты культивировали на среде LA (Рисунок 12).

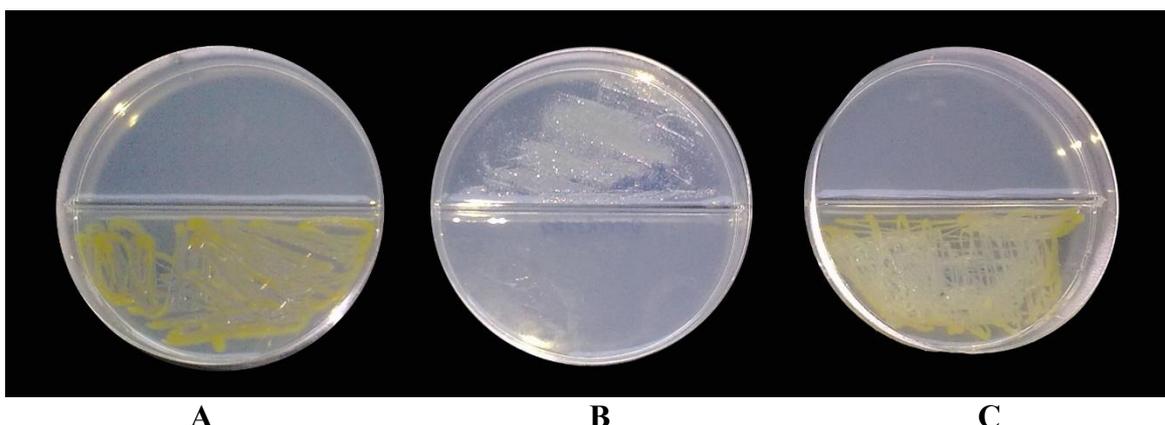


Рисунок 12. Подавление роста бактерий *A. tumefaciens* C58 летучими веществами штамма *P. chlororaphis* 205-с (А) и *P. chlororaphis* 449 (С). В контроле (В) на чашку были засеяны только клетки *A. tumefaciens* C58, бактерии-продуценты летучих веществ на второй половине чашки отсутствуют.

В ходе эксперимента было установлено, что все исследуемые штаммы *P. chlororaphis* подавляют рост бактерий *A. tumefaciens* C58 за счет синтеза пула летучих веществ (Таблица 5). В течение 2 суток при действии штаммов *P. chlororaphis* практически нет роста *A. tumefaciens* C58, на 3 сутки рост штамма C58 меньше, чем в контроле, начиная с 4 суток наблюдается заметное увеличение роста *A. tumefaciens* C58.

В ходе эксперимента было установлено, что исследуемые штаммы *S. proteamaculans* 94 и *S. plymuthica* IC1270 подавляют рост бактерий *A. tumefaciens* C58 за счет синтеза летучих веществ в 1 и 2 сутки совместного культивирования (Таблица 5). Как показал эксперимент на 3 сутки ингибирование *A. tumefaciens* C58 летучими соединениями сильно сокращается и рост *A. tumefaciens* C58 может достигнуть в опытных образцах того же уровня, что и в контроле.

Таблица 5. Ингибиторное действие летучих веществ различных штаммов *P. chlororaphis*, *S. proteamaculans* 94 и *S. plymuthica* IC1270 на *A. tumefaciens* C58, *Synechococcus* sp. PCC 7942 и грибы

Штаммы	<i>A. tumefaciens</i> C58	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>R. solani</i> **	<i>S. sclerotiorum</i> **	<i>H. sativum</i> **
Контроль	$1.6 \pm 0.6 \times 10^{11}$	$4 \pm 1 \times 10^7$	14 ± 3	16 ± 3	18 ± 3
<i>P. chlororaphis</i> 449	-*	-	-	10 ± 2	6 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> 30-84	-	-	-	12 ± 3	7 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> 62	-	-	-	9 ± 2	4 ± 1
<i>P. chlororaphis</i> 64	-	-	-	10 ± 3	8 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> 66	-	-	-	11 ± 4	6 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> 445	-	-	-	9 ± 2	3 ± 1
<i>P. chlororaphis</i> 464	-	-	-	9 ± 3	6 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> 205	-	-	-	11 ± 2	3 ± 1
<i>S. proteamaculans</i> 94	$4.5 \pm 0.5 \times 10^9$	-	3 ± 1	13 ± 3	5 ± 1
<i>P. fluorescens</i> B-4117	-	-	-	8 ± 2	4 ± 1
<i>S. plymuthica</i> IC1270	$2.5 \pm 0.6 \times 10^9$	-	3 ± 1	12 ± 2	9 ± 2

Примечание. * «-» нет видимого роста.

**Рост гриба измерялся в мм как расстояние от блока с грибом до границы роста мицелия

При совместном культивировании бактерий чашки Петри плотно заматывались парафильмом, поэтому чтобы подтвердить угнетение роста клеток за счет действия летучих веществ, выделяемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, а не из-за недостатка кислорода были проведены контрольные опыты.

При совместном культивировании густо засеянных клеток *A. tumefaciens* C58 и разведенной в 1000 раз культуры *P. chlororaphis* 449, подавления роста клеток *P. chlororaphis* 449 не наблюдалось.

При засевании на чашки культуры *E. coli* AB1157 вместо бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* совместно с *A. tumefaciens* C58 эффекта на рост агробактерий не наблюдалось.

Было определено, что густо засеянная культура *A. tumefaciens* C58 не влияет на рост *A. tumefaciens* C58, разведенной в 1000 раз и засеянной на другую половину чашки.

Результаты этих контрольных экспериментов доказывают, что на подавление роста *A. tumefaciens* C58 влияет воздействие летучих веществ, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, а не лимитирование по кислороду.

5.1.2. Действие на другие бактерии

Ночные культуры фитопатогенных бактерий *A. tumefaciens* 636 и 388 растили в жидкой среде LB и разводили в 2000 раз. Затем агробактерии засевали на среду PDA на чашках Петри с перегородкой и культивировали совместно со штаммами *P. chlororaphis* 449 и 64. Так как штамм *P. chlororaphis* 64 оказал сильный подавляющий эффект на рост

A. tumefaciens C58, было интересно сравнить его действие с эффектом модельного штамма *P. chlororaphis* 449 на бактерии *A. tumefaciens* 636 и 388 и *Erwinia carotovora* 133.

Таблица 6. Ингибиторное действие *P. chlororaphis* на *A. tumefaciens* 636, 388, 1D1 и *E. carotovora* 133

Штамм \ Время	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>						<i>Erwinia carotovora</i> 133	
	636		388		1D1		1 сутки	2 суток
	2 суток	3 суток	2 суток	3 суток	48 ч	60 ч		
Контроль	+	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
449	0	+	+	++	0	0	+	+
64	0	+	0	0	н.о.	н.о.	+	+

Примечание. «++++» - условное обозначение наиболее плотного роста агробактерий и *E. carotovora* 133 на чашках. «0» - полное отсутствие роста агробактерий и *E. carotovora* 133 на чашках. «н.о.» - действие не определялось.

По данным экспериментов подавление бактерий *A. tumefaciens* 636 летучими веществами штаммов *P. chlororaphis* 449 и 64 являются сравнимыми - 2 сутки совместного культивирования рост агробактерий полностью ингибирован (Таблица 6).

При действии штамма *P. chlororaphis* 64 на рост *A. tumefaciens* 388, эффект ингибирования роста агробактерии за счет синтеза летучих веществ заметно сильнее, чем у *P. chlororaphis* 449, возможно это обусловлено различным составом смесей летучих веществ, продуцируемых этими штаммами (Таблица 6).

Летучие вещества штамма *P. chlororaphis* 449 оказывают сильное ингибиторное действие на рост штамма *A. tumefaciens* 1D1 (Таблица 6). При этом исследуемые штаммы *P. chlororaphis* 449 и 64 практически не оказывают действия на рост *Agrobacterium* B6.

При проведении экспериментов с фитопатогенной бактерией *Erwinia carotovora* 133, поражающей все ткани растений, разведенную в 10000 раз ночную культуру *E. carotovora* 133 культивировали совместно с бактериями *P. chlororaphis* 449 и 64 на чашках с перегородкой со средой PDA в обеих половинках. По полученным результатам эксперимента ингибирующие эффекты штаммов *P. chlororaphis* 449 и 64 за счет летучих соединений на бактерии *E. carotovora* 133 являются значительными и практически одинаковыми (Таблица 6).

Таким образом, полученные результаты показали, что в течение первых трех суток летучие вещества бактерий исследуемых штаммов *Pseudomonas* и *Serratia* активно подавляют рост *A. tumefaciens* C58, 636 и 388 и *E. carotovora* 133, кроме *Agrobacterium* B6. Так как действие пула летучих веществ штамма *P. chlororaphis* 64 оказалось более эффективным при подавлении роста фитопатогенной бактерии *A. tumefaciens* 388, можно рассматривать этот штамм в качестве возможного агента для борьбы с агробактериями.

5.2. Определение действия летучих веществ бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* на цианобактерии

Мы исследовали действие летучих веществ штаммов *P. chlororaphis* 449, 64, 62, 66, 445, 464, 205-с, *P. aureofaciens* 30-84 и ATCC 13985, *P. fluorescens* B-4117, *S. proteamaculans*, *S. plymuthica* IC1270 на рост цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Рисунок 13).

Цианобактерии культивировали на среде BG11_N. Клетки *S. sp.* PCC 7942 растили в жидкой среде BG11_N и наносили суспензию клеток, в том числе в 10- и 100-кратных разведениях, на агаризованную среду BG11_N на чашках с перегородками.

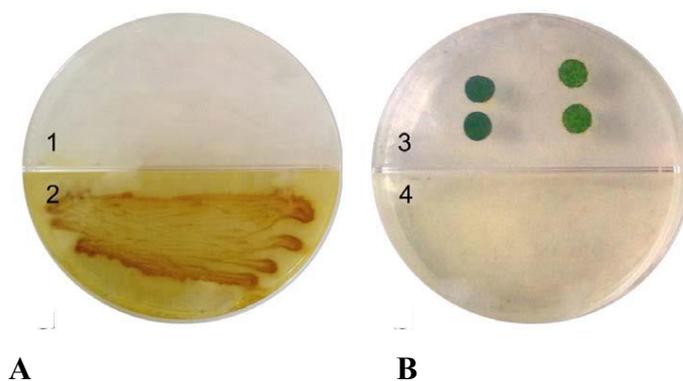


Рисунок 13. Подавление роста цианобактерий *S. sp.* PCC 7942 летучими веществами штамма *P. chlororaphis* 449 (A.1-2). Контроль в отсутствие *P. chlororaphis* 449 (B.3-4). Бактерии *P. chlororaphis* 449 на среде LA (A.2); цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 на среде BG11_N (9 суток роста) в контроле (B.3). Половинка чашки A.1: рост *S. sp.* PCC 7942 полностью подавлен; Половинка чашки B.4: клетки *P. chlororaphis* 449 не заседали.

Для того, чтобы определить, влияет ли питательная среда на антагонистическую способность почвенных бактерий, штаммы-продуценты летучих веществ при совместном культивировании с цианобактериями растили на средах LA и PDA. В контроле цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 на среде BG11_N на чашках, где нет почвенных бактерий на средах PDA и LA (Рисунок 13). По данным экспериментов, подавление роста цианобактерий *S. sp.* PCC 7942 летучими веществами штаммов *Pseudomonas* и *Serratia* происходит практически полностью (Таблица 5).

При культивировании штаммов-продуцентов летучих веществ на среде LA, так и на среде PDA наблюдается одинаково сильное подавление роста цианобактерий.

5.3. Определение действия летучих веществ бактерий на грибы

При изучении действия летучих веществ штаммов видов *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens* B-4117, *S. plymuthica* IC1270 и *S. Proteamaculans* 94 на грибы клетки бактерий культивировали совместно со следующими видами грибов:

Fusarium solani, *Fusarium moniliforme*, *Perycularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Helminthosporium sativum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia rolfsii*, *Colletotrichum* sp. Основным объектом среди них был выбран фитопатогенный гриб *Rhizoctonia solani*.

5.3.1. Действие на *Rhizoctonia solani*

Гриб *R. solani* относится к классу базидиомицетов и является фитопатогенным. При совместном культивировании на чашках с перегородками было установлено, что все исследуемые штаммы *Pseudomonas* значительно подавляют рост гриба *R. solani* (Таблица 5; Рисунок 14). Штаммы *S. proteamaculans* 94 и *S. plymuthica* IC1270 оказывает подавляющее действие на рост *R. solani*, сходное с ингибиторным действием штаммов *P. chlororaphis* (Таблица 5).

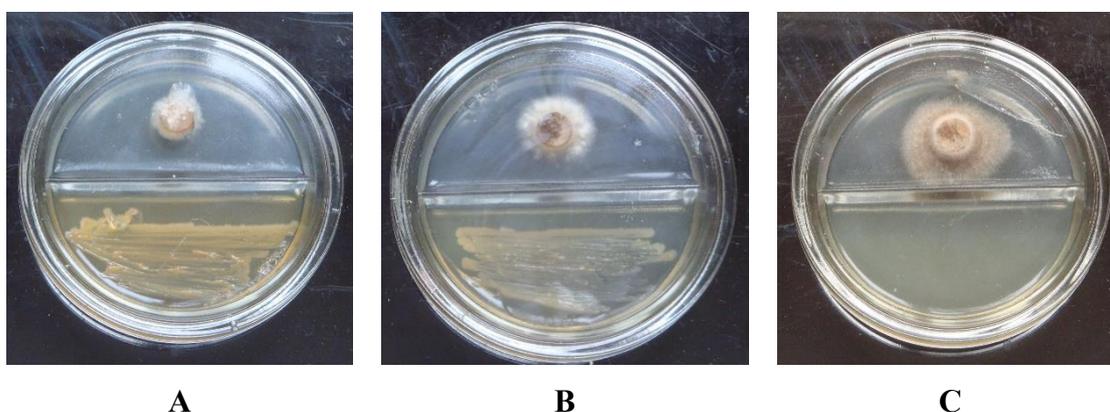


Рисунок 14. Подавление роста гриба *R. solani* летучими веществами штаммов *P. chlororaphis* 449 (А) и *P. fluorescens* В-4117 (В). Контроль при отсутствии бактерий (С). Бактерии культивировали на среде LA; грибы *R. solani* культивировали на среде Чапека и вырезанный блок со спорами гриба переносили на среду Чапека. Фотографии сделаны на 5 сутки совместного культивирования.

В Таблице 5 приведены данные о практически полном ингибировании роста грибов летучими веществами почвенных бактерий на 3 сутки совместного культивирования грибов и бактерий. При более длительном воздействии летучих веществ бактерий на *R. solani* (в течение 6 суток) наблюдались различия в ингибиторной способности пулов летучих веществ разных штаммов *P. chlororaphis* (Таблица 7). Наибольший эффект на грибы оказали штаммы *P. chlororaphis* 66 и 445 (100% подавление роста *R. solani* в течение 6 суток), меньший ингибиторный эффект продемонстрировали штаммы 62, 449, 30-84, ATCC 13985 (72,7-77,1%), промежуточное положение по ингибиторной способности летучих веществ занял штамм 205-с (66,2 %), а наиболее слабый ингибиторный эффект на рост *R. solani* на 6 сутки оказался при воздействии летучих веществ штаммов *P. chlororaphis* 64 и 464 (41,8% и 46,2%).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что компоненты смесей летучих веществ, синтезируемые различными штаммами почвенных бактерий, обладают разной ингибиторной способностью.

Таблица 7. Ингибирование роста *R. solani* на 6 сутки совместного культивирования с различными штаммами *Pseudomonas*

Штамм	Расстояние от блока с грибом до границы роста мицелия, мм	Степень ингибирования гриба на 6 сутки, %
Контроль	27,5	-
ATCC 13985	7,5	72,7
205-с	9,3	66,2
62	6,3	77,1
464	14,8	46,2
30-84	7,3	73,5
66	0	100,0
445	0	100,0
64	16	41,8
449	7,0	74,5

5.3.2. Действие на *Sclerotinia sclerotiorum*

Почвенный фитопатогенный гриб *S. sclerotiorum* относится к отделу Ascomycota и является возбудителем белой гнили подсолнечника. Источниками инфекции являются мицелий, склероции и аскоспоры.

Все исследуемые штаммы *Pseudomonas* и *Serratia* подавляют рост гриба *S. sclerotiorum* (Таблица 5). При действии бактериальных летучих веществ на *S. sclerotiorum* происходит подавление разрастания мицелия приблизительно на 40-50% относительно контроля без воздействия летучих веществ.

5.3.3. Действие на *Helminthosporium sativum*

Почвенный фитопатогенный гриб *H. sativum* относится к отделу Ascomycota. При совместном культивировании с бактериями-продуцентами летучих веществ его рост подавляется (Таблица 5), в присутствии бактерий почти нет спор и склероций и рост гриба гораздо менее плотный, чем в контроле. Однако, на 5 сутки совместного культивирования ингибиторный эффект летучих веществ бактерий снижается приблизительно на 15-30%, а при воздействии летучих веществ, синтезируемых штаммом *P. chlororaphis* 445 почти на 50% по сравнению с эффектом, наблюдаемым на 3 сутки. Действие летучих веществ *S. proteamaculans* 94 на рост *H. sativum* несколько ослабевает на 6 сутки. При действии всех

штаммов-продуцентов летучих веществ наблюдаемый эффект оказался фунгистатическим, кроме эффектов летучих веществ штаммов *P. chlororaphis* 64 и 66 на *H. sativum*. Пулы летучих веществ этих штаммов оказывали фунгицидное воздействие на *H. sativum*.

Таким образом, летучие вещества, синтезируемые штаммом *P. chlororaphis* 66, оказались наиболее эффективными при подавлении роста грибов *R. solani* и *H. sativum*, по сравнению с действием летучих веществ других штаммов почвенных бактерий. По-видимому, в состав пула летучих веществ этого штамма входят соединения, специфически действующие на клетки грибов. Поэтому штамм *P. chlororaphis* 66 может быть наиболее перспективным как агент биоконтроля фитопатогенных грибов *R. solani* и *H. sativum*.

5.3.4. Действие на другие грибы

Гриб *Verticillium dahliae* относится к отделу Ascomycota и является фитопатогеном. Этот гриб вызывает увядание у многих видов растений, обесцвечивание и скручивание листьев, а также может стать причиной гибели некоторых растений. Гриб *V. dahliae* растили на среде PDA, так как на среде Чапека он почти не растет. При совместном культивировании на чашках с *P. chlororaphis* 449 наблюдалось значительное подавление роста гриба, гифы и споры которого оказались расположенными в наиболее удаленном положении от 449.

Фитопатогенный гриб *Colletotrichum* sp. относится к отделу Ascomycota и поражает антракнозом огурцы, арбузы, дыни, репе тыквы. При совместном культивировании гриб *Colletotrichum* sp. растили на среде Чапека, а бактерии *P. chlororaphis* на LA. Было выяснено, что при воздействии летучих веществ бактерий на *Colletotrichum* sp. рост мицелия в опыте и в контроле одинаков. Но рост гриба в контроле оказался более плотным. На 6 сутки роста в контроле появлялись споры, а в опыте – нет. Также летучие вещества бактерий *S. proteamaculans* 94 и *P. chlororaphis* не действуют на грибы *Fusarium solani*, *F. moniliforme* и *Peryularia oryzae*.

Также мы исследовали степень подавления роста грибов *S. sclerotiorum* и *V. dahliae* в зависимости от среды, на которой культивировались клетки *P. chlororaphis* 449. Бактерии выращивали на средах LA и PDA. Существенной разницы в подавлении роста мицелия *S. sclerotiorum* обнаружено не было. А при действии летучих веществ *P. chlororaphis* 449 на штамм *V. dahliae* большая ингибирующая способность наблюдалась при росте *P. chlororaphis* 449 на среде LA, чем на среде PDA. Это свидетельствует о том, что при росте клеток *P. chlororaphis* 449 на разных средах составы смесей летучих соединений различаются.

Было установлено, что летучие вещества, образуемые всеми тестируемыми штаммами *Pseudomonas* и *Serratia* подавляют рост различных грибов, бактерии *A. tumefaciens* C58 и цианобактерии *S. sp.* PCC 7942, в том числе летучие вещества штамма *S. proteamaculans* 94. Таким образом, несмотря на то, что этот штамм не был выделен из ризосферы растений, летучие вещества, которые он продуцирует способны подавлять рост широкого спектра микроорганизмов, в том числе фитопатогенных.

Также впервые было показано, что подобный антагонистический эффект, обусловленный синтезом летучих веществ, характерен для различных штаммов *P. chlororaphis*, выделенных из разных географических зон, и что это общий эффект бактерий этого вида.

6. Изучение влияния мутаций в генах ряда глобальных регуляторов экспрессии генов бактерий на синтез летучих веществ

Для определения механизмов регуляции синтеза летучих веществ было исследовано влияние мутаций в ряде бактериальных генов, кодирующих глобальные регуляторы генной экспрессии, на синтез летучих веществ.

Мутанты штаммов *P. chlororaphis* 449 и *S. proteamaculans*, использованные в работе, получены в Лаборатории регуляции экспрессии генов в ходе ранее проводившихся исследований, мутанты штамма *S. plymuthica* IC1270 получены в лаборатории д.б.н. Л. С. Чернина Иерусалимского университета. Названия мутантов указаны в Таблице 1 в разделе «Материалы и Методы».

У мутанта *P. chlororaphis* 449 *rpoS* инактивирован ген *rpoS*, кодирующий σ^S -субъединицу РНК-полимеразы, которая отвечает за регуляцию клеточных механизмов бактерий при различных стрессах и при переходе в стационарную фазу роста, во время которой образуются вторичные метаболиты, в том числе, возможно, летучие вещества бактерий.

Мутация в гене *gacS* у *P. chlororaphis* 449 приводит к подавлению синтеза всех типов АГЛ, обнаруженных у *P. chlororaphis* 449, к резкому уменьшению синтеза феназинов и антагонистической активности [Veselova *et al.*, 2009]. Глобальная регуляторная двухкомпонентная система GacA/GacS у псевдомонад контролирует синтез вторичных метаболитов, поэтому можно было ожидать, что мутация в гене сенсорной киназы *gacS* будет приводить к снижению синтеза летучих веществ.

Исследовались мутанты штамма *S. plymuthica* IC1270, дефектные по генам *grrA*, *grrS* или *rpoS*, так как глобальная система регуляции GtrA/GtrS является гомологом GacA/GacS

системы *P. chlororaphis*, а ген *rpoS* кодирует σ^S -субъединицу РНК-полимеразы у *S. plymuthica* IC1270.

Клетки *P. chlororaphis* 449 содержат ген, высоко гомологичный гену *vfr* *P. aeruginosa*, ответственному за синтез белка Vfr (Virulence factor regulation), глобального регулятора экспрессии генов у *P. aeruginosa*. Однако, надо принять во внимание, что бактерии штамма *P. chlororaphis* 449 не являются вирулентными, поэтому функции белка Vfr в данном случае не связаны с регуляцией факторов вирулентности. Белок Vfr *P. chlororaphis* 449 гомологичен белку CRP *Escherichia coli*, глобальному регулятору, контролирующему экспрессию более 100 генов в клетках *E. coli*.

Белок Csr в клетках *E. coli* необходим для транскрипции генов, кодирующих β -галактозидазу. У *P. aeruginosa* продукт гена *vfr* участвует в контроле синтеза АГЛ; мутация в этом гене полностью снимает синтез АГЛ. Полученные ранее данные показывают, что мутация в гене *vfr* не влияет на синтез АГЛ и на синтез феназиновых антибиотиков штаммом *P. chlororaphis* 449.

Для изучения роли QS систем в регуляции различных клеточных процессов *P. chlororaphis* мы использовали штаммы с плазмидами *P. chlororaphis* 449/pME6000 и *P. chlororaphis* 449/pME6863.

Плазмида pME6863 несет ген лактоназы AiiA *Bacillus* spp. штамма A24, клонированный в векторной плазмиде pME6000 [Lipasova *et al.*, 2009]. Фермент гомосеринлактоназа расщепляет АГЛ, т.е. отключает QS-системы. Вектор pME6000 был использован в качестве контроля.

В работе использовались полученные в более ранних работах с помощью транспозонного мутагенеза клоны *P. chlororaphis* 449::miniTn5-14 и 449::miniTn5-3 с поврежденными генами феназинового оперона, *phzA* и *phzB* (449::miniTn5-14 и 449::miniTn5-3, соответственно), ответственными за синтез вторичных метаболитов, феназиновых антибиотиков.

Для изучения влияния QS регуляции на антагонистическую активность за счет летучих соединений у бактерий *S. proteamaculans*, в работе использовали полученные ранее мутанты *sprI*⁻ и *sprR*⁻, у которых нарушен синтез АГЛ-синтазы и рецепторного белка, связывающегося с АГЛ при QS регуляции, соответственно.

В ходе работы показано, что мутации в генах *gacS* *P. chlororaphis* 449, а также в генах *grrA* и *grrS* *S. plymuthica* IC1270 снижали ингибирующее рост агробактерий действие летучих веществ (Таблица 8), по-видимому, за счет снижения синтеза этих веществ. Присутствие плазмиды с геном лактоназы в клетках *P. chlororaphis* 449 и мутаций в генах *sprI* и *sprR* *S. proteamaculans* 94, контролирующих функционирование QS систем, а также

мутаций в генах *rpoS*, *vfr*, *phzA*, *phzB* *P. chlororaphis* не влияли на синтез летучих веществ (Таблица 8). Продукты этих генов, по-видимому, не участвуют в регуляции антагонистической активности указанных бактерий, обусловленной синтезом летучих соединений.

Таблица 8. Действие мутантов *P. chlororaphis* 449, *S. plymuthica* IC1270 и *S. proteamaculans* 94 на рост *A. tumefaciens* C58, *S. sp.*PCC 7942, *R. solani*

Штамм	<i>A. tumefaciens</i> C58	<i>S. sp.</i> PCC 7942	<i>R. solani</i>
449 <i>rpoS</i>	-	-	-
449 <i>gacS</i>	+	+	+
449 <i>vfr</i>	-	-	-
449/pME6000	-	-	-
449/pME6863	-	-	-
449 Tn5-3	-	-	-
449 Tn5-14	-	-	-
<i>S. plymuthica grrA</i>	+	-	-
<i>S. plymuthica grrS</i>	+	-	-
<i>S. plymuthica rpoS</i>	-	-	-
<i>sprR</i> ⁻	-	-	-
<i>sprI</i>	-	-	-

7. Синтез HCN штаммами родов *Pseudomonas* и *Serratia*

Среди летучих веществ, выделяемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia* и ингибирующих рост микроорганизмов, присутствует летучее неорганическое соединение – цианид (HCN), известный как «летучий» антибиотик и фактор биологического контроля многих полезных ризосферных штаммов, относящихся к роду *Pseudomonas* [Pierson и Thomashow, 1992; Corbell и Loper, 1995; Voisard *et al.*, 1989]. Поэтому мы исследовали способность изучаемых штаммов-продуцентов летучих веществ синтезировать HCN, в качестве положительного контроля использовали штаммы *P. aureofaciens* 30–84 [Svercel *et al.*, 2007] и *P. fluorescens* Pf-5 [Blumer и Haas, 2000], а *P. fluorescens* 2–79 [Blom *et al.*, 2011] в качестве отрицательного контроля.

Результаты, представленные в Таблице 9, показывают, что штаммы *P. chlororaphis* 449, 62, 64, 66 и 464 синтезировали значительные количества HCN. При этом другие штаммы, обладающие сильным ингибирующим эффектом за счет синтеза смеси летучих веществ *P. chlororaphis* (445 и 205), *S. proteamaculans* 94, *S. plymuthica* IC1270 и мутант

штамма *P. chlororaphis* 449 по гену *rpoS* почти не синтезируют цианид. Тем не менее, пулы летучих веществ, выделяемых всеми этими штаммами, независимо от того, синтезируют они HCN или нет, оказывали сильное ингибирующее действие на *A. tumefaciens* C58, *Synechococcus*, *R. solani*, и *H. sativum* (Таблицы 5, 8). Аналогичным образом, штаммы, не синтезирующие HCN, вызывали гибель *Drosophila*, что указывает на то, что наблюдаемые эффекты обуславливают другие летучие соединения.

Таблица 9. Синтез цианида штаммами *Pseudomonas* и *Serratia*

Штаммы	Синтез CN ⁻ , мг/л
<i>P. chlororaphis</i> 30–84	0.010
<i>P. chlororaphis</i> 62	0.020
<i>P. chlororaphis</i> 64	0.012
<i>P. chlororaphis</i> 66	0.035
<i>P. chlororaphis</i> 445	0.002
<i>P. chlororaphis</i> 464	0.030
<i>P. chlororaphis</i> 205	≤0.002
<i>S. proteamaculans</i> 94	≤0.002
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	0.030
<i>P. fluorescens</i> 2–79	0.000
<i>P. fluorescens</i> B-4117	≤0.002
<i>S. plymuthica</i> IC1270	0.000
<i>P. chlororaphis</i> 449/ <i>gacS</i>	0.000
<i>P. chlororaphis</i> 449	0.020
<i>P. chlororaphis</i> 449/ <i>rpoS</i>	≤0.002
<i>P. chlororaphis</i> 449/pME6863	0.002-0.004

Способность синтезировать HCN отличается у разных видов бактерий [Stotzky и Schenck, 1976]. Многие виды *Pseudomonas* синтезируют HCN при действии против грибов [Voisard *et al.*, 1989; Haas и Défago, 2005]. Цианид ингибирует активность некоторых металлосодержащих ферментов, особенно цитохром с-оксидазы дыхательной цепи переноса электронов. Поэтому HCN может вызывать токсический эффект у аэробных микроорганизмов, обитающих в одной нише с бактериями рода *Pseudomonades* [Effmert *et al.*, 2012].

На примере бактерии *P. aeruginosa* было показано, что биосинтез HCN контролируется QS регуляцией [Pessi и Haas, 2000]. В работе [Chernin *et al.*, 2011] представлены данные о том, что летучие вещества, синтезируемые ризосферными штаммами *P. fluorescens* B-4117 и *S. plymuthica* IC1270 могут ингибировать QS регуляцию различных бактерий, в том числе *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Pectobacterium* и *Pseudomonas*. Поэтому возможно, что синтез собственных летучих веществ штаммами *P. fluorescens* B-4117 и *S. plymuthica* IC1270 ингибирует биосинтез цианида.

8. Определение действия летучих веществ бактерий на дрозофилу

Мы исследовали действие летучих веществ штаммов бактерий *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* В-4117, *S. plymuthica* IC1270 и *S. proteamaculans* 94 на дрозофилу (*D. melanogaster*).

Экспозиция мух с пулом летучих веществ, выделяемых каждым из штаммов-продуцентов, приводила к необратимой гибели всех дрозофил на следующие сутки (Таблица 10). В контролях при соблюдении тех же условий культивирования, но в отсутствии бактерий, синтезирующих летучие вещества, все мухи оставались живы по меньшей мере в течение 5 дней наблюдений и сохраняли способность к размножению.

Добавление активированного угля на дно контейнера с мухами и *P. chlororaphis* 449 полностью нейтрализовывало ингибиторный эффект действия летучих веществ на дрозофил, все они сохраняли жизнеспособность (Таблица 10).

Таблица 10. Действие летучих веществ *Pseudomonas* и *Serratia* на *D. melanogaster*

Штаммы	24 часа	
	Время	
	Без активированного угля	С активированным углем
Контроль	10*	10
<i>P. chlororaphis</i> 449	0	10
<i>P. fluorescens</i> В-4117	0	10
<i>S. plymuthica</i> IC1270	0	10
<i>S. proteamaculans</i> 94	0	10

Примечание. *Количество мух

9. Определение действия летучих веществ бактерий на нематоды

Эксперименты с нематодами проводились совместно с сотрудниками лаборатории А.С. Миронова Государственного НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, С.Ю. Ереминой и О.А. Катковой-Жукоцкой.

Для определения влияния летучих веществ бактерий на жизнеспособность и развитие нематод *C. elegans* исследования проводились при совместном культивировании с четырьмя штаммами, продуцирующими летучие вещества, – *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* В-4117, *S. plymuthica* IC1270 и *S. proteamaculans* 94. В присутствии каждого из этих бактериальных штаммов подвижность червей и уровень их репродуктивности заметно падали в течение 24-72 часов. Воздействие летучих веществ бактериального происхождения приводило к заметному замедлению развития *C. elegans* по сравнению с контролем, где отсутствовали бактерии-продуценты летучих веществ. Наиболее сильный эффект наблюдался при действии летучих веществ, выделяемых *S. plymuthica* IC1270. В вариантах совместного культивирования с этим штаммом наблюдалась неспособность к

отложению яиц нематодами и отсутствие ювенальных форм, кроме того, черви, находившиеся в L4 стадии, и взрослые особи погибали в период 3–8 дней после начала экспериментов (Таблица 11).

Таблица 11. Действие летучих веществ *Pseudomonas* и *Serratia* на *C. elegans*. Количество L4 и взрослых особей, яиц, L1–L3 форм считали на 3 и 8 день.

Воздействие на нематоды летучих веществ штаммов	Развитие нематод							
	3 день				8 день			
	L4 формы	Взрослые нематоды	Яйца	L1-L2 формы	Взрослые нематоды	Яйца	L1-L3 формы	L4 формы
<i>P. chlororaphis</i> 449	6 ± 2	4 ± 1	1.2 ± 0.2 × 10 ²	14 ± 3 (только L1)	1.3 ± 0.3 × 10 ²	25 ± 5	1.4 ± 0.3 × 10 ²	0
<i>P. fluorescens</i> В-4117	0	10	1.5 ± 0.4 × 10 ²	25 ± 5	2 ± 0.5 × 10 ²	~3 × 10 ³	3 ± 1 × 10 ²	1.5 ± 0.5 × 10 ²
<i>S. plymuthica</i> IC1270	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. proteamaculans</i> 94	6 ± 2	5 ± 2	14 ± 4	7 ± 3 (только L1)	2 ± 0.4 × 10 ²	1.5 ± 0.4 × 10 ²	1.3 ± 0.3 × 10 ³	0
Контроль (без бактерий)	0	10	3 ± 1 × 10 ²	2 ± 0.6 × 10 ²	4 ± 1 × 10 ²	~4 × 10 ⁴	~3 × 10 ³	~4 × 10 ³

10. Определение качественного состава смеси летучих веществ

Составы летучих смесей определялись с помощью газо-твердофазной хромато-масс-спектрометрии с микроэкстракцией по методу, описанному в [Dandurishvili *et al.*, 2011]. Профили ЛОС определяли (учитывая совпадение > 95%) на базе масс-спектральной библиотеки (Data Version: NIST 05, Software Version 2.0d) с помощью программы XCALIBUR v1.3 (ThermoFinnigan, Сан-Хосе, Калифорния). Эта часть исследования проводилась в лаборатории д-ра Л. Чернина, Иерусалимский университет (совместная работа).

Фаза и условия роста могут влиять на состав смеси летучих веществ бактерий, поэтому были определены составы смесей летучих веществ при культивировании штамма *P. chlororaphis* 449 на двух средах - LA и PDA. Общее эмиссия летучих веществ достигает выхода на плато между 3 и 4 сутками после инокуляции [Kai *et al.*, 2007], поэтому анализ состава газовых смесей проводили через сутки и через 3 суток роста бактерий.

По данным хроматомасс-спектрометрии у штамма *P. chlororaphis* 449 после культивирования 24 и 72 часа синтезируются отсутствующие в контролях вещества: диметилдисульфид, 2-гептанон, 2,2,4,6,6-пентаметил-3-гептен, ундецен-1, 2-нонанон, 2-ундеканон, децен-1-ол ацетат, 1-бутанол, 2,4,4,6,6,8,8-гептаметил-1-нонен, которые потенциально могут определять антагонистическую активность этого штамма (Таблица 12).

Таблица 12. Состав ЛОС, присутствующих в газовой фазе штамма *P. chlororaphis* 449 при культивировании 24ч и 72ч на среде LA и 72ч на среде PDA

Соединение \ Проба	LA_К	PDA_К	LA 449 24ч	LA 449 72ч	PDA 449 72ч
3-метилбутаналь	+	+			
α -пиненили схожие	+	+			+
1-бутанол			+	+	
4,4-диметил-2-неопентил-1-пентен или схожие	+	+	+	+	+
2,2,4,6,6-пентаметилгептен-3 или схожие	+	+	+	+	+
(3E)-2,2,3,5,6-пентаметил-3-гептен или схожие	+	+	+	+	+
Бензальдегид	+				
2,4,4,6,6,8,8-гептаметил-1-нонен или схожие	+		+	+	
Фенилацетальдегид	+				
2-этил-1-деканол или схожие	+				
диметилдисульфид (ДМДС)			+	+	+
2-гептанон			+	+	
2,2,4,6,6-пентаметил-3-гептен или схожие		+	+	+	+
ундецен-1		+	+	+	+
2-нонанон			+	+	+
2-ундеканон			+	+	+
децен-1-ол ацетат или схожие			+	+	+
метилтиоацетат				+	
Z-3,4,4-триметил-2-пентен		+			
фенилацетальдегид		+			
неидентифицированные спирты					+
алкилкетоны					+

Примечание. LA_К – состав ЛОС в контроле на среде LA; PDA_К – состав ЛОС в контроле на среде LA.

В наибольшем количестве у штамма *P. chlororaphis* 449 синтезируются летучие вещества – 1-ундецен ($64.5 \pm 9.1\%$), 2-нонанон ($14.4 \pm 5.0\%$) и 2-ундеканон ($12.0 \pm 3.6\%$). Структуры этих соединений представлены на Рисунке 15. Других ЛОС продуцировалось значительно меньше, они были детектированы в количестве от ~ 0.1 до 1.4% от общего пула ЛОС. У штамма *S. plymuthica* IC1270 в газовой смеси летучих веществ по данным хроматомасс-спектрометрии присутствует в наибольшем количестве летучее соединение ДМДС – $50-70\%$ [Dandurishvili *et al.*, 2011]. Другой штамм *S. proteamaculans* 94 также в наибольших количествах синтезирует ДМДС ($68.7 \pm 15.3\%$), в смеси летучих веществ этого

штамма присутствует и 2-гептанон ($1.5 \pm 0.2\%$) (Porova *et al.*, 2014). Структуры ДМДС и 2-гептанона представлены на Рисунке 15.

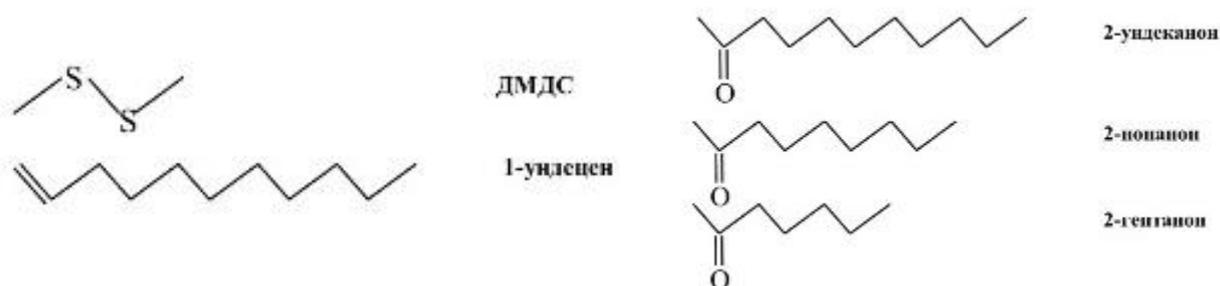


Рисунок 15. Химические структуры индивидуальных ЛОС, действие которых изучалось в работе

11. Действие индивидуальных летучих соединений на различные прокариотические и эукариотические организмы

11.1. Действие ЛОС на микроорганизмы

Ингибирующий эффект индивидуальных ЛОС, синтезируемых в наибольшем количестве, определялся по их действию на бактерию *A. tumefaciens* C58, цианобактерию *S. sp.* PCC 7942 и гриб *R. solani* (Таблица 13). Бактериостатический эффект ДМДС на *A. tumefaciens* C58 был продемонстрирован ранее на нескольких штаммах *Agrobacterium* [Dandurishvili *et al.*, 2011] и подтвержден в данной работе. ДМДС в количестве 100 мкмоль полностью подавляет рост цианобактерии *Synechococcus sp.* PCC 7942.

Значительное ингибирование штаммов *A. tumefaciens* C58, *S. sp.* PCC 7942 и *R. solani* наблюдалось при действии кетона – 2-нонанона (Рисунок 16). Другой кетон, 2-ундеканон, в количестве 100 мкмоль полностью ингибирует рост *S. sp.* PCC 7942 и *R. solani*, но не оказывает значительного эффекта на штамм *A. tumefaciens* C58 (Таблица 13).

Несмотря на то, что изучаемые бактерии-продуценты летучих веществ, не синтезируют 2-гептанон в больших количествах, в работе определялось его действие на различные организмы и сравнивалось с действием двух других кетонов. Было показано, что 2-гептанон обладает сильным ингибирующим эффектом на рост *A. tumefaciens* C58 и *S. sp.* PCC 7942, в то время как эффект на *R. solani* был менее выраженным (Таблица 13). Во всех случаях эффект этих ЛОС на *R. solani* был фунгистатическим. Схожая фунгистатическая активность наблюдалась при действии ДМДС на некоторые фитопатогенные грибы, включая *R. solani*. 1-ундецен не оказывал значительного эффекта ни на один из трех тестируемых микроорганизмов (Таблица 13).

Таблица 13. Действие ЛОС на *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Synechococcus* sp. PCC 7942 и *Rhizoctonia solani*. Все эксперименты были проведены в 3-4 повторностях на двух или трех чашках для каждого варианта.

ЛОС	<i>A. tumefaciens</i> C58 (КОЕ)		<i>S. sp.</i> PCC 7942 (КОЕ)	<i>R. solani</i> (мм)	
	Количество ЛОС (мкмоль)				
	10	100	100	10	100
2-нонанон	$2 \pm 0.4 \times 10^{10}$	-*	-	4 ± 0.9	-
2-гептанон	$3 \pm 0.2 \times 10^9$	-	-	9 ± 4	$4 \pm 0.7^{**}$
2-ундеканон	$4 \pm 1 \times 10^{11}$	$3 \pm 1 \times 10^{11}$	-	6 ± 1.5	-
ДМДС	$4 \pm 0.8 \times 10^{11}$	$4 \pm 2 \times 10^{10}$	-	13 ± 3	9 ± 3
1-ундецен	$3 \pm 0.6 \times 10^{11}$	$3 \pm 1 \times 10^{11}$	$2 \pm 0.3 \times 10^7$	12 ± 4	11 ± 2
Контроль (без ЛОС)	$1.6 \pm 0.6 \times 10^{11}$		$4 \pm 1 \times 10^7$	14 ± 3	

Примечание. *«-» нет видимого роста.

**Расстояние между блоком с *R. solani* и внешней границей мицелия (мм).

Из микроорганизмов наиболее чувствительными к действию ЛОС оказались цианобактерии (Рисунок 16). Недавно было показано, что лизис цианобактериальных клеток вызывают некоторые ЛОС, такие как 8-метил-2-нонанон, 2-деканон и 3-метил-1-бутанол [Ozaki *et al.*, 2008].

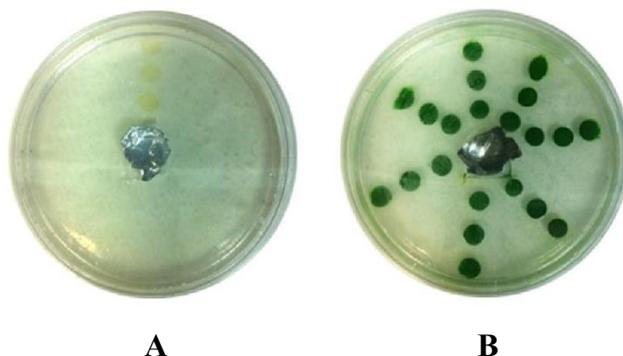


Рисунок 16. А. Подавление роста *S. sp.* PCC 7942 в присутствии 2-нонанона. В. Контроль с водой вместо 2-нонанона

11.2. Действие ЛОС на дрозофилу и нематоды

Помимо значительного ингибиторного действия на грибы и бактерии исследованные ЛОС оказывали сильный эффект на жизнеспособность *D. melanogaster* и *C. elegans*. ДМДС и кетоны 2-нонанон и 2-ундеканон в количестве 25 мкмоль убивали нематод после трех дней экспозиции с ними. При действии 25 мкмоль 2-гептанона 100% L4 форм нематод, помещенных на чашки в начале экспериментов, развились во взрослых особей в течение первых трех дней инкубации, но при этом они были лишены способности откладывать яйца и, соответственно, на чашках наблюдалось полное отсутствие ювенальных форм. Дальнейшая инкубация с 2-гептанолом приводила к гибели всех нематод. Алкен 1-ундецен

в отличие от других индивидуальных соединений не подавляет рост *A. tumefaciens*, *Synechococcus* и *R. solani*, однако, это соединение оказало сильное влияние на развитие нематоды *C. elegans*. 1-ундецен ингибировал развитие нематод. На 3 день инкубации с 1-ундеценом (25 мкмоль) на чашках было обнаружено 30% взрослых нематод, 15% яиц и отсутствие L1–L3 ювенальных форм. На 8 день на чашках было 23% взрослых нематод, 5% яиц 10% L1–L3 ювенальных форм, при этом отсутствовали особи в L4 форме. В количестве 100 мкмоль 1-ундецен приводил к гибели всех нематод в течение 3 дней.

На жизнеспособность *D. melanogaster* наиболее сильный эффект наблюдался при действии ДМДС, 2-гептанона и 2-нонанона. Эти ЛОС оказывали летальный эффект на мух уже в количестве 5-10 мкмоль, 1-ундецен в количестве 25–100 мкмоль также приводил к их гибели. Наиболее слабый эффект на *Drosophila* оказал 2-ундеканон (Таблица 14).

Таблица 14. Действие индивидуальных ЛОС на *D. melanogaster*

ЛОС	Количество выживших мух <i>Drosophila</i>			
	Количество ЛОС (мкмоль)			
	5	10	25	100
ДМДС	3 ± 1	0	0	0
2-нонанон	5 ± 2	3 ± 1	0	0
2-гептанон	3 ± 1	0	0	0
1-ундецен	10 ± 0	10 ± 0	0	0
2-ундеканон	10 ± 0	9 ± 1	7 ± 2	4 ± 2

Примечание. В каждой пробирке в начале опыта было по 10 мух, в таблице указано число мух, оставшихся в живых через 5 дней после добавления соответствующих ЛОС. В контрольных вариантах все мухи были живы.

Штаммы *P. chlororaphis* 449 и *S. proteamaculans* 94 продуцировали по меньшей мере, 14 и 6 идентифицированных соединений, соответственно. Очевидно, что это лишь небольшая часть выделяемых летучих веществ, обнаруженных на сегодняшний день для различных бактерий [Kai *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2007], что свидетельствует о том, что многие другие соединения остаются объектами для изучения. Нельзя исключить, что помимо летучих веществ, тестируемых в этой работе в качестве отдельных химических соединений, некоторые другие летучие вещества могут внести свой вклад в наблюдаемые эффекты как часть пула биологически активных летучих веществ, продуцируемых тестируемыми бактериями.

Синтез летучего серосодержащего соединения ДМДС в настоящее время активно исследуется в качестве альтернативы фумигации почвы с помощью бромистого метила. Также предполагается, что ДМДС действует в качестве природного фумиганта и играет роль в естественной защите растений [Kyung и Lee, 2001]. В ряде работ была показана активность ДМДС в контроле роста фитопатогенных грибов [Kai *et al.*, 2009], сорняков

[Freeman *et al.*, 2009], а также нематод [Coosemans, 2005]. Эти сведения были подтверждены и расширены установлением фактов о том, что ДМДС может подавлять рост штаммов *Agrobacterium* [Dandurishvili *et al.*, 2011; Popova *et al.*, 2014], а также рост мицелия нескольких фитопатогенных грибов, червей (*C. elegans*) и насекомых (*D. melanogaster*).

Кроме ДМДС, и другие ЛОС, продуцируемые ризосферными бактериями, могут осуществлять фунгистатическое и бактериостатическое действие в почве [Zou *et al.*, 2007]. Неорганические и органические летучие соединения могут присутствовать в почвенных микрокапиллярах в определенных диапазонах концентраций и проявлять фунгистатическую активность в почве [Wheatley, 2002].

Микробные ЛОС способны взаимодействовать с насекомыми как хемоаттрактанты и репелленты и могут приводить формированию нейтральных, полезных или антагонистических отношений между видами в общих экологических нишах. Изучение способности насекомых воспринимать химические стимулы и реагировать на них дает возможность глубже понять эволюцию поведенческих реакций насекомых на летучие соединения [Davis *et al.*, 2013]. Некоторые ЛОС, выделяемые грибами, например, 2-октанон, 2,5-диметилфуран и 3-октанол, приводят к гибели *D. melanogaster*, отчасти из-за образования активных форм кислорода [Inamdar *et al.*, 2010; Inamdar *et al.*, 2012]. Гораздо меньше известно о механизме действия ЛОС, продуцируемых бактериями, на этих и других мух. Активность некоторых ЛОС бактериального происхождения, приводящая к гибели *Drosophila*, может определять дополнительную потенциальную роль ЛОС в качестве защитников растений от насекомых [Wasserkort и Koller, 1998]. Тем не менее, чтобы подтвердить эту способность, инсектицидную активность ЛОС необходимо проверить относительно широкого спектра вредных для растений насекомых.

Некоторые ЛОС, включая кетоны и спирты, могут выступать в качестве природных хемоаттрактантов или репеллентов и для нематод *C. elegans*, в частности, 2-нонанон [Bargmann и Horvitz, 1991; Bargmann *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 2010].

В работе [Dugravot *et al.*, 2003] было показано, что ДМДС оказывает нейротоксическое действие на насекомых (тараканов *Periplaneta americana*), приводящее к митохондриальной дисфункции и активации АТФ-зависимых кальциевых каналов (K_{АТФ}). При действии на тараканов *P. americana* ДМДС влияет на синаптическую передачу на пресинаптическом уровне, что приводит к ингибированию высвобождения нейромедиаторов из синаптических пузырьков, то есть блокирует передачу электрического импульса. Было показано, что ДМДС индуцирует в митохондриях ингибирование комплекса IV (цитохром с-оксидазы) и впоследствии уменьшает внутриклеточную концентрацию АТФ, что приводит к гиперполяризации мембраны и снижению активности

нейронов [Dugravot *et al.*, 2003]. Возможно одной из мишеней ДМДС при воздействии на организмы нематод и дрозophil также могут являться K_{ATP} каналы.

12. Изучение действия кетонов 2-нонанона и 2-ундеканона на фотосинтетический аппарат *S. sp.* PCC 7942

Совместно с сотрудниками кафедры биофизики, группой экологической биофизики С.И. Погосьяна (биологический факультет, МГУ), была проведена работа по изучению действия кетонов 2-нонанона и 2-ундеканона на фотосинтетический аппарат цианобактерий.

Было показано, что 2-нонанон и 2-ундеканон в концентрациях 2 мМ и 0.2 мМ, соответственно, и выше ингибируют перенос электронов через фотосистему II (ФС II) в клетках цианобактерии *S. sp.* PCC 7942. Это было определено по уменьшению квантового выхода первичных фотореакций ФС II, а также по изменениям кривых индукции флуоресценции хлорофилла ФС II. Изменения в состоянии фотосинтетического аппарата цианобактерии происходили под действием кетонов очень быстро (в течение первых 2-5 минут). Вероятно, это является результатом прямого действия кетонов на компоненты фотосинтетического аппарата. В течение первых минут инкубации эффект кетонов был аналогичен эффекту DCMU, который является хорошо известным ингибитором переноса электронов на акцепторный участок реакционного центра ФС II [Bulychev и Vredenberg, 2001].

Параметры флуоресценции хлорофилла являются показателями состояния и эффективности фотосинтетического аппарата цианобактерий и, в частности, характеризуют изменения в цепи транспорта электронов. К параметрам флуоресценции относится исходный уровень флуоресценции (F_0), который соответствует флуоресценции хлорофилла в условиях, когда все реакционные центры способны тушить флуоресценцию антенны (все реакционные центры открыты), так как все молекулы первичного хинонного акцептора Q_A готовы принять электрон от P680; максимальный уровень флуоресценции (F_m); переменная флуоресценции (F_v , $F_v = F_m - F_0$); относительная флуоресценция (F_v/F_m), которая коррелирует с квантовым выходом фотосинтеза [Рубин и Кренделева, 2003].

При добавлении 2-нонанона в концентрациях ≥ 2 мМ и 2-ундеканона в концентрациях $\geq 0,2$ мМ происходит уменьшение величины относительной флуоресценции F_v/F_m , которая у цианобактерий зависит от темнового дыхания, ведущего к восстановлению пула пластохинонов и частичному закрытию реакционных центров ФС II [Mullineaux и Allen 1986]. Резкое снижение (вплоть до нуля) значений соотношения F_v/F_m , наблюдаемое под действием кетонов, было принято, как свидетельство об ингибировании переноса

электронов через ФС II, так как уменьшение величины F_v/F_m , согласно [Рубин и Кренделева, 2003], обусловлено главным образом повышением уровня F_0 , что указывает на необратимое восстановление первичного акцептора электронов Q_A в ФС II. Это позволяет предположить, что кетоны, 2-нонанон и 2-ундеканон, ингибируют перенос электронов между акцепторами электронов хинонами Q_A и Q_B .

По результатам этой совместной работы с группой Погосьяна С.И. по изучению действия кетонов на фотосинтетический аппарат цианобактерий была подготовлена и послана в печать статья «Natural ketones 2-nonanone and 2-undecanone inhibit photosynthetic activity in the cyanobacterium *Synechococcus*».

13. Инсерционный мутагенез с помощью транспозона и анализ генов цианобактерии *S. sp.* PCC 7942, определяющих чувствительность к кетонам

С целью изучения генетического контроля чувствительности цианобактерии к действию кетонов 2-нонанона, 2-ундеканона и 2-гептанона были получены мутанты при использовании транспозона Tn5-692. Более 2 500 транспозонных мутантов высевали на чашки и инкубировали с каждым из трех кетонов в концентрации 100 мкмоль. После анализа степени резистентности клеток мутантов к кетонам были отобраны 11 мутантов, устойчивых к действию 2-нонанона, 7 мутантов, устойчивых к действию 2-ундеканона, и 8 мутантов, устойчивых к действию 2-гептанона.

Для идентификации генов, нарушенных транспозоном, были выбраны мутанты, устойчивые к действию 2-нонанона, так как этот кетон оказывает сильное ингибирующее действие на клетки дикого типа цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 и одновременно с этим синтезируется бактериями-продуцентами ЛОС в большем количестве, чем другие кетоны.

Из четырех мутантов *S. sp.* PCC 7942, устойчивых к 2-нонанону, была выделена геномная ДНК и подвергнута рестрикции эндонуклеазой *SalI*, не имеющей сайтов узнавания внутри транспозона. Фрагменты ДНК, относящиеся к транспозону и те, которые являются участками примыкающих к нему инактивированных генов, после лигирования были перенесены в компетентные клетки *E. coli* XL-Blue. Из колоний, устойчивых к антибиотикам стрептомицину, спектиномицину и эритромицину ($Sm_{25}Sp_{50}Em_{50}$), выращивали ночные культуры и выделяли плазмиды, несущие транспозон Tn5-692 и фрагменты генов, определяющих чувствительность к кетону. Они были обозначены pNR401, pNR385, pNR365, pNR359 (Таблица 1). Эти плазмиды были отсеквенированы с праймером pW-TnR:923L21 (5'-CGGGAAACTCCTGAGCCAACT-3') к концу транспозона Tn5-692. При секвенировании с этим праймером прочитывается нуклеотидная последовательность фрагмента гена, фланкирующего транспозон. Полученные

нуклеотидные последовательности сравнивались с помощью программы BLAST с базой данных секвенированного генома *S. sp. PCC 7942* (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/SYNPCC7942>).

Удалось идентифицировать четыре гена, мутации в которых приводят к устойчивости цианобактерии *S. sp. PCC 7942* к 2-нонанону. Идентифицированные гены кодируют следующие белки:

1. Ген SYNPC7942_RS06965 (*Synpcc7942_1362*) кодирует муреин-пептид-лигазу (Mpl, UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase; ABB57392.1), которая участвует в рециклизации муреина в процессе биогенеза клеточной стенки цианобактерий.

2. Ген SYNPC7942_RS01785 (*Synpcc7942_0353*) кодирует субстрат-связывающий белок системы ABC-транспорта MlaD (ABB56383.1), имеющий сходство с белками ABC транспортерами, определяющими устойчивость к органическим растворителям.

3. Ген SYNPC7942_RS03755 (*Synpcc7942_0726*) кодирует гипотетический белок (ABB56758.1), содержащий VRR-NUC домен, который присутствует в ферментах рестрикции-модификации третьей группы и репарации ДНК.

4. Ген SYNPC7942_RS03785 (*Synpcc7942_0732*) кодирует маленький гипотетический белок (ABB56764.1) с неизвестной функцией.

14. Направленная инсерционная инактивация генов SYNPC7942_RS06965 (NR401), SYNPC7942_RS03755 (NR 385), SYNPC7942_RS01785 (NR 365) и SYNPC7942_RS03785 (NR 359) в штамме дикого типа цианобактерии *S. sp. PCC 7942*

Мутанты *Synechococcus sp. PCC 7942*, устойчивые к действию 2-нонанона были получены с помощью ненаправленного транспозонного мутагенеза. После идентификации генов *S. sp. PCC 7942*, инактивированных транспозоном Tn5-692, следующим этапом работы было получение инсерционных мутантов *S. sp. PCC 7942* с нокаутом этих генов для подтверждения того, что инактивация именно этих генов определяет устойчивость цианобактерий к действию 2-нонанона.

Используя полученные сиквенсы фрагментов ДНК, мы подобрали по паре специфических праймеров к генам SYNPC7942_RS06965 (*Synpcc7942_1362*), SYNPC7942_RS03755 (*Synpcc7942_0726*), SYNPC7942_RS01785 и SYNPC7942_RS03785 (Таблица 3).

Делетированные с концов копии генов были синтезированы с помощью ПЦР-амплификации при использовании геномной ДНК *S. sp. PCC 7942* в качестве матрицы и праймеров (Таблица 3). Условия ПЦР-амплификации для получения делетированных копий

генов: начальная денатурация 95° С 2 мин., последующие 35 циклов 95° С 30сек., 66° С 40 сек., 72° С 1 мин., последний цикл 72° С 10 мин, с праймерами NR401-F, R и NR359-F, R (Таблица 3); начальная денатурация 95° С 2 мин., последующие 35 циклов 95° С 30сек., 64° С 40 сек., 72° С 1 мин., последний цикл 72° С 10 мин, с праймерами NR385-F, R и NR365-F, R (Таблица 3).

Размеры генов SYNPCС7942_RS06965, SYNPCС7942_RS01785, SYNPCС7942_RS03755 и SYNPCС7942_RS03785 составляют 486 пар нуклеотидов, 1134 н.п., 363 н.п. и 210 н.п., соответственно (Рисунок 17).

Полученная в результате ПЦР делетированная копия гена SYNPCС7942_RS06965 была клонирована по сайту *EcoRI* в вектор pRL498, образовав плазмиду, которую мы обозначили как pNR401-del. Делетированный фрагмент гена SYNPCС7942_RS03755 был клонирован в плазмиду pJET1.2 (CloneJet PCR Cloning Kit, Fermentas), вырезан из нее по сайту рестрикции *BglIII*, выделен из агарозного геля (Набор для выделения ДНК из агарозного геля, Helicon) и переклонирован по сайту *VamHI* в плазмиду pRL498. Полученную плазмиду обозначили как pNR385-del.

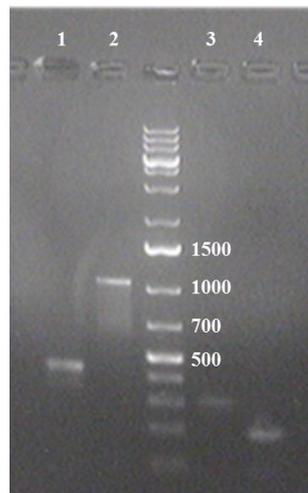


Рисунок 17. Гель-электрофорез ПЦР-продуктов генов (1) Synpcс7942_1362 (NR401), (2) SYNPCС7942_RS01785 (NR 365), (3) SYNPCС7942_RS03755 (NR 385) и (4) SYNPCС7942_RS03785 (NR 359)

Штаммы *E. coli* XL-Blue, трансформированные плазмидами pNR401-del и pNR385-del, использовали для конъюгационного переноса этих плазмид в клетки дикого типа *S. sp.* РСС 7942. Конъюгацию осуществляли в соответствии с методикой для переноса плазмиды pRL692, описанной в разделе «Материалы и методы», с использованием хэлперной конъюгативной плазмиды pRL443. Конъюганты, в которых путем гомологичной рекомбинации нуклеотидных последовательностей генов SYNPCС7942_RS06965 и SYNPCС7942_RS03755 и их делетированных копий в хромосому интегрируется плаزمида pRL498, устойчивы к канамицину.

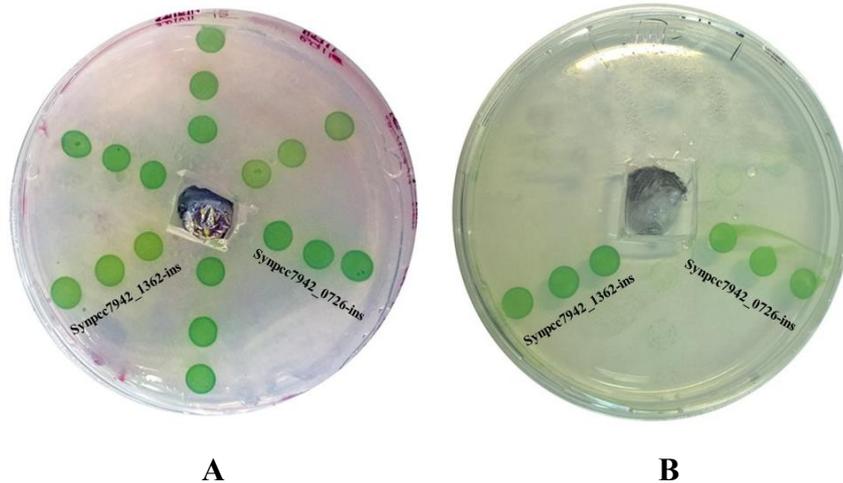


Рисунок 18. Действие 2-нонона на дикий тип *S. 7942* (А) и инсерционных мутантов NR401_{ins} и NR385_{ins} по генам SYNPC7942_RS06965 (*Synpcc7942_1362*) и SYNPC7942_RS03755 (*Synpcc7942_0726*) (В)

При инкубации с 2-нононом инсерционные мутанты NR401_{ins} и NR385_{ins} (PCC 7942::pNR401-del и PCC 7942::pNR385-del) показали ту же степень устойчивости к его действию, какая наблюдалась при действии 2-нонона на соответствующих транспозонных мутантов (Рисунок 18). Таким образом, локализация транспозонных мутаций в генах SYNPC7942_RS06965 и SYNPC7942_RS03755, была успешно подтверждена направленной инсерционной инактивацией.

Фенотипы мутантов *S. 7942* по генам SYNPC7942_RS06965 и SYNPC7942_RS03755 отличаются от фенотипа штамма дикого типа длиной клеток (Рисунок 19).

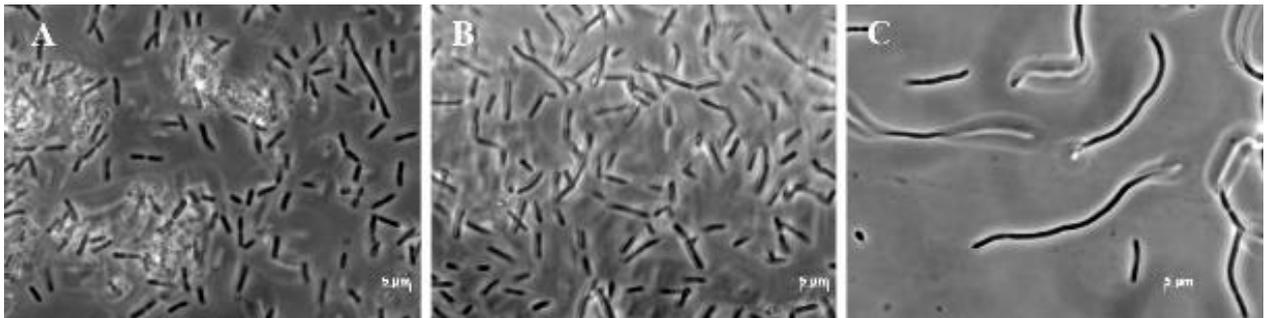


Рисунок 19. Фенотипы дикого типа и мутантов *S. 7942*. А. Мутант NR385_{ins} по гену SYNPC7942_RS03755. В. Дикий тип *S. 7942*. С. Мутант NR401_{ins} по гену SYNPC7942_RS06965.

Так как гены цианобактерии *S. sp.* PCC 7942, ответственные за чувствительность к действию 2-нонона, оказались кодирующими белки с разнообразными функциями, вероятно, механизм действия ЛОС на клетки цианобактерий является плеiotропным.

Ген *mpl*, кодирующий L-аланил-γ-D-глутамил-мезо-диаминопимелат лигазу *E. coli* был идентифицирован по гомологии аминокислотной последовательности с геном *murC*. Открытая рамка считывания *yjfG* этого гена расположена на 96 минуте генетической карты

хромосомы *E. coli* [Berlyn *et al.*, 1998]. Продукт этого гена участвует в рециклизации неповрежденных молекул трипептида L-аланил- γ -D-глутамил-мезо-диаминопимелата [Mengin-Lecreulx *et al.*, 1996], образующихся при деградации значительной части слоя пептидогликана в клетках бактерий при каждом делении [Mengin-Lecreulx *et al.*, 1996]. Соединения, образовавшиеся в результате процесса рециклизации, составляют 30-60% муреинового слоя после синтеза новой клеточной стенки у Грам-отрицательных бактерий [Uehara и Park, 2008]. Рециклизация муреина протекает параллельно с функционированием ферментов MurC, MurD и MurE, осуществляющим биосинтез пептидогликана *de novo* [Barreteau *et al.*, 2008]. При инактивации гена *mpl* в штамме *E. coli* оказалось, что содержание пептидогликана в клетках этого мутанта не снижалось и что отсутствие продукта этого гена не влияло на жизнеспособность клеток [Mengin-Lecreulx *et al.*, 1996]. Тем не менее, при отсутствии активности муреин-пептид-лигазы в клетках мутанта на 50% уменьшается содержание предшественника пептидогликана и предположительно накапливаются продукты деградации пептидогликана [Mengin-Lecreulx *et al.*, 1996]. Поэтому можно предположить, что присутствие этих продуктов в периплазматическом пространстве может представлять собой дополнительное препятствие для проникновения молекул 2-нонанона в цитоплазму клеток и таким образом определять устойчивость клеток мутанта NR401 к действию этого кетона.

У мутанта NR385 не функционирует ген, продукт которого в клетках дикого типа содержит VRR-Nuc домен. VRR-Nuc домены наиболее распространены и разнообразны в геномах бактериофагов и профагов и принимают значимое участие в репликации и рекомбинации фаговых хромосом [Iyer *et al.*, 2006]. Хотя функции генов, кодирующих VRR-Nuc домены, неизвестны, большинство из них расположены в оперонах, которые включают известные ферменты репарации ДНК, отсюда и название VRR_NUC (Virus-type Replіcation-Repair NUClease) [Iyer *et al.*, 2006]. Домены VRR_nuc содержат PD-(D/E)XK мотив, обнаруженный в активном центре многих нуклеаз рестрикции [Kosinski *et al.*, 2005]. В настоящее время гомологи эндонуклеазы FAN1 (K1AA1018) являются единственными известными эукариотическими белками, содержащими VRR NUC домен [MacKay *et al.*, 2010]. То, каким образом мутация, при которой не функционирует этот белок, приводит к устойчивости цианобактериальных клеток к действию 2-нонанона, не является очевидным. Возможно белок с VRR-NUC доменом вовлечен в какой-либо регуляторный каскад и его дисфункция приводит к отсутствию мишени, чувствительной к кетону. В базе данных этот белок описан как гипотетический, поэтому для понимания его роли в метаболизме цианобактерий, в частности *S. sp.* PCC 7942, необходимы функциональные исследования этого белка.

У мутанта NR365 инактивирован ген, который в клетках дикого типа кодирует ABC-транспортер MlaD. Гомологичный белок и его функция ABC-транспортной системе белков Mla описаны для *E. coli* [Malinverni и Silhavy, 2009]. Mla-белки участвуют в предотвращении накопления фосфолипидов в наружном слое внешней мембраны клеток *E. coli* [Malinverni и Silhavy, 2009]. Присутствие фосфолипидов в наружном слое внешней мембраны увеличивает ее проницаемость для гидрофобных растворителей [Nikaido, 2003, 2005] и многие Грам-отрицательные бактерии обладают механизмами, которые разрушают или удаляют фосфолипиды с поверхности клетки. Mla-комплекс ABC-транспортеров в клетках *E. coli* включает белки MlaF, MlaE, MlaB и MlaD (Рисунок 20). MlaE представляет собой интегральный белок, находящийся во внутренней мембране и выполняющий функции пермеазы; MlaD представляет собой гипотетический субстрат-связывающий белок, локализующийся в периплазматическом пространстве; белки MlaB и MlaF является цитоплазматическим [Malinverni и Silhavy, 2009] (Рисунок 20). При отсутствии любого из этих белков, в том числе MlaA и MlaC, фосфолипиды накапливаются в наружном слое внешней мембраны, и это приводит к увеличению ее проницаемости для органических растворителей [Malinverni и Silhavy, 2009].

У мутанта NR365 в клетках отсутствует белок MlaD, который связывает фосфолипиды, переносимые другим транспортером через периплазматическое пространство. Так как при этом клетки *S. sp.* PCC 7942 становятся устойчивыми к 2-нонанону, можно предположить, что меняется конформация белков, входящих в комплекс с MlaD, и этот комплекс перестает функционировать и переносить соединения в цитоплазму, в том числе кетоны.

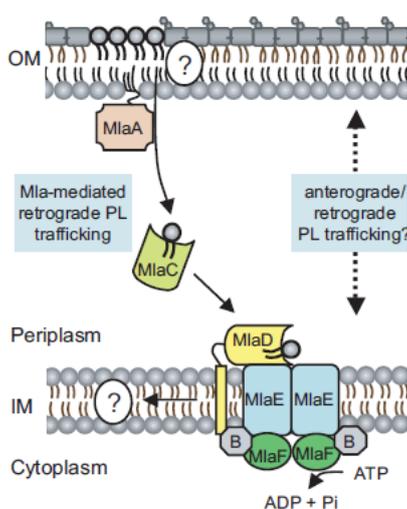


Рисунок 20. Фрагмент схемы из статьи [Malinverni и Silhavy, 2009]. Белки MlaA и MlaC переносят фосфолипиды из внешней мембраны клеток на комплекс белков MlaFEDB на внутренней мембране. Авторы статьи [Malinverni и Silhavy, 2009] предполагают, что с помощью этого комплекса фосфолипиды могут встраиваются во внутреннюю мембрану. OM (outer membrane) – внешняя мембрана; IM (inner membrane) – внутренняя мембрана.

Глава 2. Биологическая активность небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина (БМАА)

1. Действие БМАА на рост *N. sp.* PCC 7120

Эффект БМАА на рост клеток цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 изучался при воздействии различных концентраций аминокислоты. Так как *N. sp.* PCC 7120 является азотфиксирующей цианобактерией, эксперименты проводились при её культивировании на средах, содержащих связанный азот (BG11_{NO₃} или BG11_{NH₄}) и на среде без азота (BG11₀) для того, чтобы определить чувствительность этого штамма к длительной экспозиции с БМАА в условиях обеспечения клеток азотом и в diaзотрофных условиях.

На Рисунке 21 видно, что БМАА в концентрациях 20 и 50 мкМ оказывает негативный, концентрационный эффект на рост культуры. При действии БМАА на среде с нитратом (Рисунок 21.А) рост клеток сильно подавлен и заметно отличается от контроля при обеих концентрациях БМАА. Эффекты 20 и 50 мкМ БМАА заметно отличаются друг от друга на среде без азота (Рисунок 21.В). В условиях diaзотрофного роста клетки *N. sp.* PCC 7120 росли медленнее, чем на среде с азотом, но штамм показал себя немного более устойчивым к 20 мкМ БМАА. Тем не менее, более высокие концентрации БМАА от 50 (Рисунок 21.В) до 200 мкМ значительно подавляли рост клеток *N. sp.* PCC 7120.

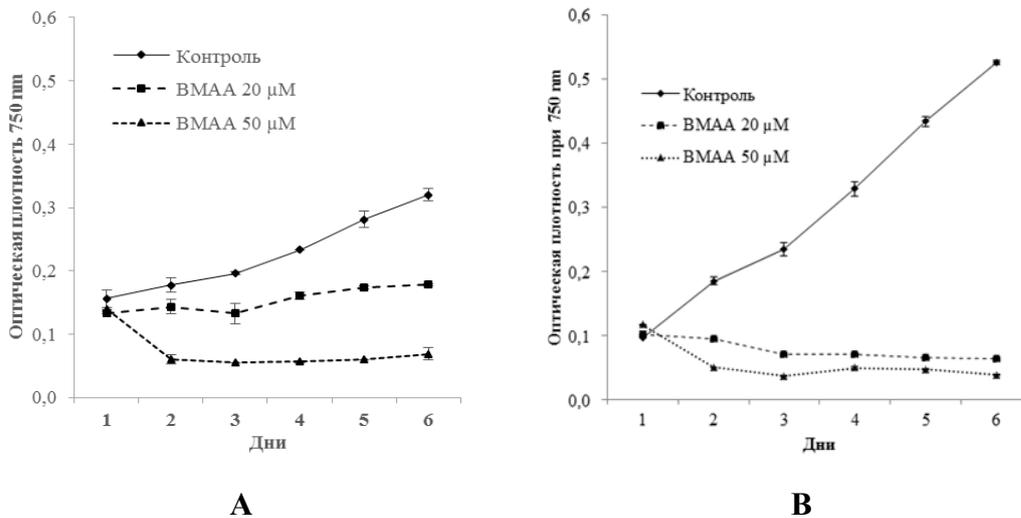


Рисунок 21. Эффект БМАА на рост в культуре *N. sp.* PCC 7120. А. Кривые роста *N. sp.* PCC 7120 на среде без азота BG11₀. В. Кривые роста *N. sp.* PCC 7120 на среде с нитратом BG11_{NO₃}.

При культивировании *N. sp.* PCC 7120 в течение 4 суток на среде с аммонием в качестве источника азота клетки выдерживали более высокие концентрации БМАА (от 20 до 100 мкМ), чем на нитрате. Заметное подавление роста *N. sp.* PCC 7120 на аммонии наблюдалось при увеличении концентрации БМАА до 200 мкМ.

2. Действие БМАА на дифференцировку гетероцист при росте цианобактерии на разных источниках азота

Азотфиксирующая цианобактерия *N. sp.* PCC 7120 на среде без азота защищает фермент азотфиксации нитрогеназу от инактивации кислородом, образуя специализированные клетки - гетероцисты. В ходе работы изучался эффект БМАА как на зрелые гетероцисты, уже сформированные в культуре цианобактерии до добавления аминокислоты, так и на способность цианобактерии формировать гетероцисты в процессе голодания по азоту.

Действие БМАА на культуру со зрелыми гетероцистами. При изучении действия БМАА на культуру *N. sp.* PCC 7120 с уже сформированными зрелыми гетероцистами, поддерживавшуюся в течение нескольких дней на среде BG11₀, было показано, что добавление БМАА практически не влияет на частоту гетероцист (Таблица 15, Рисунок 22.А, В). При фиксации молекулярного азота в контрольной культуре частота гетероцист составляла 5,4%, а в культуре с добавлением 20 мкМ БМАА присутствовало 4,4% дифференцированных клеток на 3 сутки эксперимента.

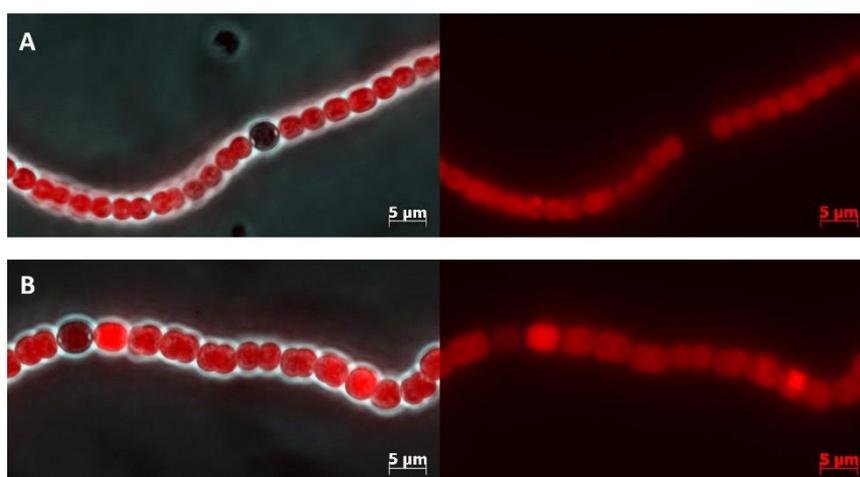


Рисунок 22. Микрофотографии филаментов культуры *N. sp.* PCC 7120 на 3 сутки культивирования на среде без азота. На левой панели филаменты в световом поле, совмещенном с флуоресцентным. На правой панели аутофлуоресценция хлорофилла. Гетероцисты не флуоресцируют. А. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11₀. В. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11₀ + 20 мкМ БМАА.

Таблица 15. Частота гетероцист и гетероцистоподобных клеток на 3 сутки инкубирования с различными концентрациями БМАА

Среда роста	Концентрация БМАА				
	Контроль (без БМАА)	20 мкМ БМАА	50 мкМ БМАА	100 мкМ БМАА	200 мкМ БМАА
BG11 _{NO₃}	0%	3,7%	-	-	-
BG11 _{NH₄}	0%	0%	0,72%	2,2%	6,8%
BG11 ₀	5,4%	4,4%	-	-	-
BG11 ₀ (голодание)	6%	0%	-	-	-

Действие БМАА на формирование гетероцист. Для изучения влияния БМАА на формирование гетероцист клетки *N. sp.* PCC 7120 инкубировали с 20 мкМ БМАА в условиях азотного голодания, когда в клетках начинают экспрессироваться гены, обеспечивающие дифференцировку вегетативных клеток в гетероцисты в условиях diaзотрофного роста.

Цианобактерии способны формировать функциональные фиксирующие молекулярный азот гетероцисты через сутки после наступления азотного голодания (Kumar *et al.*, 2010), при микроскопии гетероцисты полностью различимы через 36-48 часов. При действии 20 мкМ БМАА на голодающую культуру *N. sp.* PCC 7120 через 48 и 72 часа наблюдалось полное ингибирование образования гетероцист (Рисунок 23.А, В), при этом на третьи сутки роста цианобактерий частота гетероцист в контроле достигала 6% (Таблица 15).

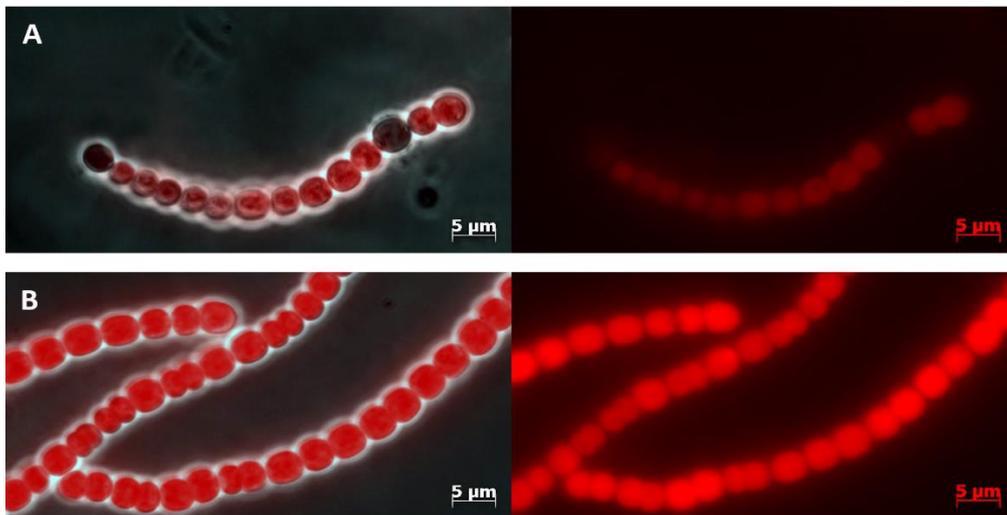


Рисунок 23. Микрофотографии филаментов культуры *N. sp.* PCC 7120 на 3 сутки культивирования в условиях голодания по азоту. На левой панели филаменты в световом поле, совмещенном с флуоресцентным. На правой панели аутофлуоресценция хлорофилла. Гетероцисты не флуоресцируют. А. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11₀, 48 часов голодания. В. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11₀, 48 часов голодания + 20 мкМ БМАА

На четвертые сутки инкубирования цианобактерий с БМАА при микроскопии в образцах было обнаружено большое количество деградировавших клеток и филаментов, что свидетельствовало о гибели культуры, гетероцисты и прогетероцисты отсутствовали.

Действие БМАА на культуру в присутствии связанного азота в среде роста. В ходе исследования свойств БМАА была обнаружена способность этого соединения вызывать образование гетероцистоподобных клеток в культуре *N. sp.* PCC 7120, растущей на среде с разными источниками азота (17 мМ нитрата натрия и 5 мМ хлорида аммония).

В качестве гетероцистоподобных клеток рассматривались те клетки в составе филаментов, которые имели более округлую форму, чем вегетативные клетки, в них не

наблюдалась аутофлуоресценция хлорофилла, как и в зрелых гетероцистах, а также в некоторых из них при 100-кратном увеличении можно было детектировать зачатки полярных телец (Рисунок 24.А, В).

Гетероцистоподобные клетки при микроскопировании образцов, взятых из культур *N. sp.* PCC 7120, росших на среде с аммонием или нитратом, обнаруживались через 72 часа инкубирования с БМАА, при этом в контрольных культурах эти клетки отсутствовали (Рисунок 24.С, D). Для определения частоты образования гетероцистоподобных клеток на среде с нитратом в присутствии 20 мкМ БМАА было проанализировано более 2200 клеток, входящих в состав филаментов *N. sp.* PCC 7120. На третьи сутки дифференцировка среди этих клеток наблюдалась с частотой 3,7%. Через 96 часов инкубирования с 20 мкМ БМАА частота гетероцистоподобных клеток увеличилась до 4,1%.

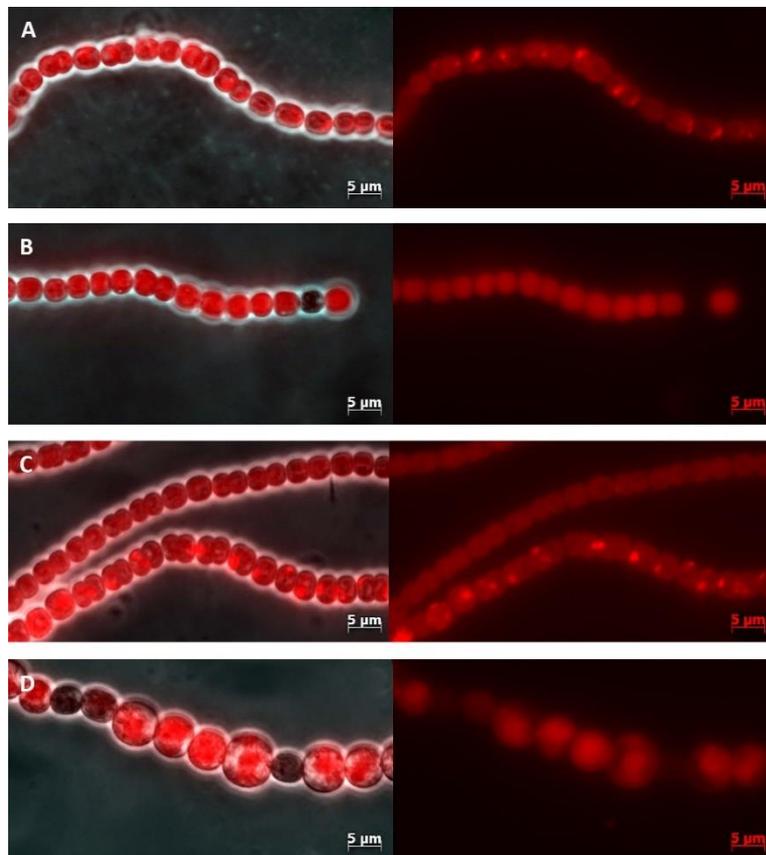


Рисунок 24. Микрофотографии филаментов цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 на 3 сутки культивирования на среде с азотом. На левой панели филаменты в световом поле, совмещенном с флуоресцентным. На правой панели аутофлуоресценция хлорофилла. Гетероцистоподобные клетки не флуоресцируют. А. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11NO₃. В. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11NO₃ + 20 мкМ БМАА. С. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11NH₄. D. *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11NH₄ + 100 мкМ БМАА

При использовании в среде роста в качестве источника связанного азота хлорида аммония гетероцистоподобные клетки начинали образовываться в культуре при

концентрации БМАА 50 мкМ, а увеличение их числа в филаментах наблюдалось в присутствии 100 мкМ БМАА. Так, при такой концентрации БМАА гетероцистоподобные клетки присутствовали в цианобактериальной культуре с частотой 2,2%. При увеличении количества БМАА до 200 мкМ частота гетероцистоподобных клеток увеличивалась до 6,8%, кроме того, наблюдалось появление сдвоенных гетероцистоподобных клеток. Сдвоенные гетероцистоподобные клетки также были обнаружены в культуре *N. sp.* PCC 7120 в присутствии 100 мкМ БМАА на четвертые сутки инкубирования. При этом средняя частота гетероцистоподобных клеток при этой концентрации БМАА на четвертые сутки увеличилась более, чем втрое и составила 7,3% (Таблица 15).

Филаменты в культуре *N. sp.* PCC 7120 при росте на средах BG11₀ и BG11_{NO₃} не подвергались значительной деградации только при концентрации БМАА, не превышающей 20 мкМ. Поэтому для микроскопии брали клетки *N. sp.* PCC 7120, растущие на этих средах, в присутствии 20 мкМ БМАА.

Так как при росте *N. sp.* PCC 7120 на среде с аммонием в качестве источника азота клетки выдерживали более высокие концентрации БМАА, чем на нитрате (от 20 до 200 мкМ) в течение 4 суток, то при культивировании цианобактерий на BG11_{NH₄} была показана концентрационная зависимость частоты гетероцистоподобных клеток от количества БМАА в среде (Таблица 15).

Таким образом, при изучении действия БМАА на дифференцировку гетероцист цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 на разных источниках азота было определено, что БМАА (1) подавляет процесс дифференцировки гетероцист в условиях голодания по азоту; (2) не влияет на частоту зрелых гетероцист; (3) вызывает образование гетероцистоподобных клеток при росте культуры на средах со связанным азотом.

3. Действие БМАА на нитрогеназную активность *N. sp.* PCC 7120

Для определения функциональности гетероцист и гетероцистоподобных клеток в присутствии БМАА нитрогеназная активность измерялась с помощью метода восстановления ацетилена.

При инкубировании клеток *N. sp.* PCC 7120 с 20 мкМ и 50 мкМ БМАА наблюдалось значительное ингибирование нитрогеназной активности. На вторые сутки способность гетероцист фиксировать азот была снижена в присутствии 20 мкМ БМАА практически в три раза по сравнению с контролем. Добавление 50 мкМ аминокислоты приводило к 17-кратному подавлению нитрогеназной активности *N. sp.* PCC 7120 (Рисунок 25).

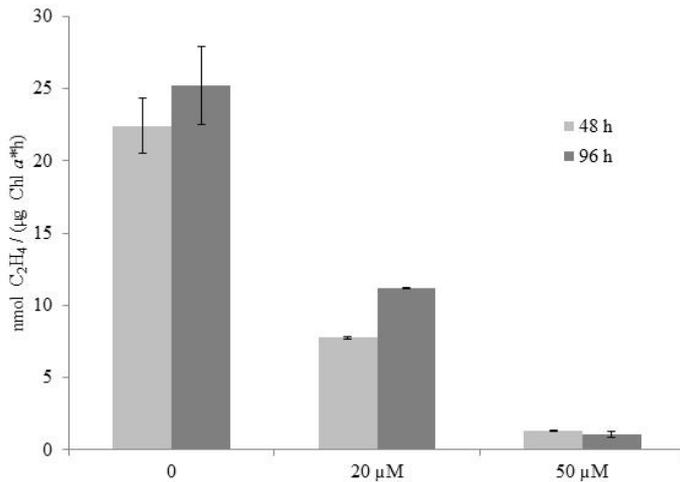


Рисунок 25. Действие БМАА на азотфиксацию *N. sp.* PCC 7120. Клетки *N. sp.* PCC 7120 росли на среде BG11₀ в присутствии 20 и 50 мкМ БМАА. Нитрогеназная активность представлена в сравнении с контролем (рост без БМАА) на 2 и 4 сутки роста.

На четвертые сутки (через 96 часов) роста в присутствии 20 мкМ БМАА нитрогеназная активность *N. sp.* PCC 7120 оставалась значительно сниженной по сравнению с контролем, но при этом немного увеличилась по сравнению с нитрогеназной активностью на вторые сутки. Эффект БМАА в концентрации 50 мкМ на нитрогеназную активность клеток не изменился к четвертым суткам – азотфиксация практически отсутствовала.

Ген *nifH*, кодирующий компонент фермента нитрогеназы - динитрогеназа-редуктазу, традиционно используется в качестве маркера для изучения процесса азотфиксации. При исследовании действия БМАА на культуру со зрелыми гетероцистами, с помощью ПЦР в реальном времени было обнаружено подавление экспрессии гена *nifH* (Рисунок 26) при практически неизменной частоте гетероцист (Таблица 15).

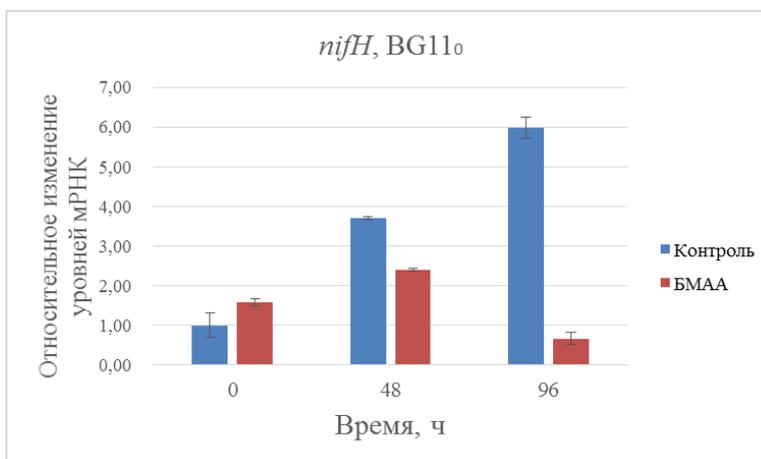


Рисунок 26. Относительные уровни мРНК гена *nifH* в контроле (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при росте культуры *N. sp.* PCC 7120 со зрелыми гетероцистами на среде без азота.

При росте в diaзотрофных условиях гетероцисты фиксируют молекулярный азот благодаря ферменту нитрогеназе, преобразующей его в ионы аммония. С помощью фермента глутаминсинтетазы (ГС) аммоний ассимилируется в реакции с глутаматом и полученный в результате реакции глутамин транспортируется из гетероцист в вегетативные клетки в качестве источника азота (Рисунок 27.А) [Flores и Herrero, 2005]. Так как БМАА является аналогом глутамата [Brownson *et al.*, 2002] и конкурирует с ним за связывание с белками (GluR) и, в частности, с переходными металлами [Weiss и Sensi, 2000], то возможно способен также конкурировать за связывание с ферментом глутаминсинтетазой, специфичной для глутамата и содержащей Mn^{2+} в реакционном центре. Таким образом, связываясь с ГС вместо глутамата, БМАА может препятствовать образованию глутамина, ионы аммония при этом аккумулируются в клетке. При накоплении ионы аммония способны ингибировать экспрессию гена *nifH* [Vintila и El-Shehawy, 2007], что приводит к снижению и подавлению нитрогеназной активности гетероцист (Рисунок 27.В).

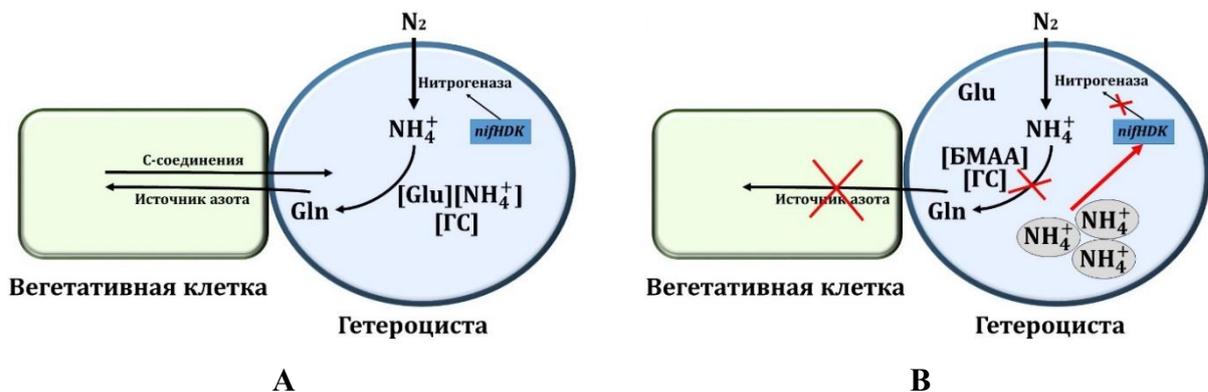


Рисунок 27. А. Ассимиляция молекулярного азота в контроле. В. Схема возможного действия БМАА на нитрогеназную активность

Для определения функциональности гетероцистоподобных клеток, образующихся в культуре *N. sp.* PCC 7120, растущей на среде со связанным азотом в присутствии БМАА, с помощью метода восстановления ацетилена определяли нитрогеназную активность культуры после инкубирования с БМАА и сравнивали со способностью осуществлять восстановление ацетилена у культуры *N. sp.* PCC 7120, поддерживаемой на среде BG11₀ и содержащей зрелые функциональные гетероцисты (Таблица 16). В качестве негативного контроля использовали данные, полученные при измерении нитрогеназной активности культуры *N. sp.* PCC 7120, которую растили на среде с азотом без БМАА и в которой гетероцистоподобные клетки отсутствуют. В Таблица 16 представлены результаты проведенных измерений. Отметим, что нитрогеназная активность гетероцистоподобных клеток фактически отсутствует, она находится на уровне восстановления ацетилена клетками в негативном контроле, то есть там, где нет гетероцист. Таким образом, было

показано, что гетероцистоподобные клетки, образование которых индуцирует БМАА на среде, содержащей нитрат натрия, не являются функциональными.

Таблица 16. Нитрогеназная активность и частота гетероцист и гетероцистоподобных клеток на 3 сутки инкубирования с 20 мкМ БМАА.

Условия (среда, присутствие БМАА)	Частота гетероцист и гетероцистоподобных клеток, %	Нитрогеназная активность, нмоль [Eth]/мкг[Chl]*ч
Контроль, BG11 _{NO₃}	0%	0,0
BG11 _{NO₃} , 20 мкМ БМАА	3,7%	0,0
Контроль, BG11 ₀	5,4%	22,4
BG11 ₀ , 20 мкМ БМАА	4,4%	7,8

4. Действие БМАА на экспрессию генов *N. sp.* PCC 7120, вовлеченных в процесс дифференцировки гетероцист и азотный метаболизм

С помощью ПЦР в реальном времени было определено действие БМАА на экспрессию генов *ntcA*, *nirA*, *glnA*, *gltS*, *hetR* *hepA* и *nifH*, продукты которых вовлечены в азотный метаболизм цианобактерий (Таблицы 17, 18). Экспрессия генов нормировалась относительно транскрипта гена домашнего хозяйства *rnpB*. Расчет относительных уровней экспрессии проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации $\Delta\Delta C_t$.

4.1. Действие БМАА на экспрессию генов *N. sp.* PCC 7120 при азотном голодании

Было обнаружено, что БМАА изменяет экспрессию генов, вовлеченных в формирование гетероцист. Одним из важных регуляторных ключевых белков, контролирующих процесс образования гетероцист, является белок HetR, продукт экспрессии гена *hetR*, представляющий собой протеазу серинового типа и связывающийся с промоторами нескольких генов, участвующих в регуляции формирования гетероцист. Морфогенез полисахаридной капсулы и гликолипидного слоя гетероцист контролируется двумя семействами генов, *hep* и *hgl*, которые косвенно активируются регулятором HetR. Продукт гена *hepA* представляет собой транспортер ABC-типа и необходим для синтеза полисахаридной капсулы гетероцисты. Обнаружено, что гены *hetR* и *hepA*, ответственные за формирование гетероцист, репрессированы в присутствии БМАА (Рисунок 28.А, В), что коррелирует с отсутствием гетероцист в условиях голодания культуры *N. sp.* PCC 7120 по азоту в присутствии БМАА (Рисунок 23.В).

Гетероцисты в культуре *N. sp.* PCC 7120 морфологически были различимы и функциональны на вторые сутки после наступления азотного голодания, что соответствует

литературным данным [Hebbar и Curtis, 2000]. При добавлении БМАА к клеткам цианобактерии процесс образования гетероцист не инициируется, о чем свидетельствует отсутствие прогетероцист и гетероцист в голодающей по азоту культуре.

Ранние этапы дифференцировки гетероцист запускаются после того, как цикл ГС / ГОГАТ перестает функционировать [Zhang *et al.*, 2006], сигнальная молекула α -КГ накапливается и взаимодействует с глобальным регулятором NtcA [Zhang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010] (Рисунок 29.А).

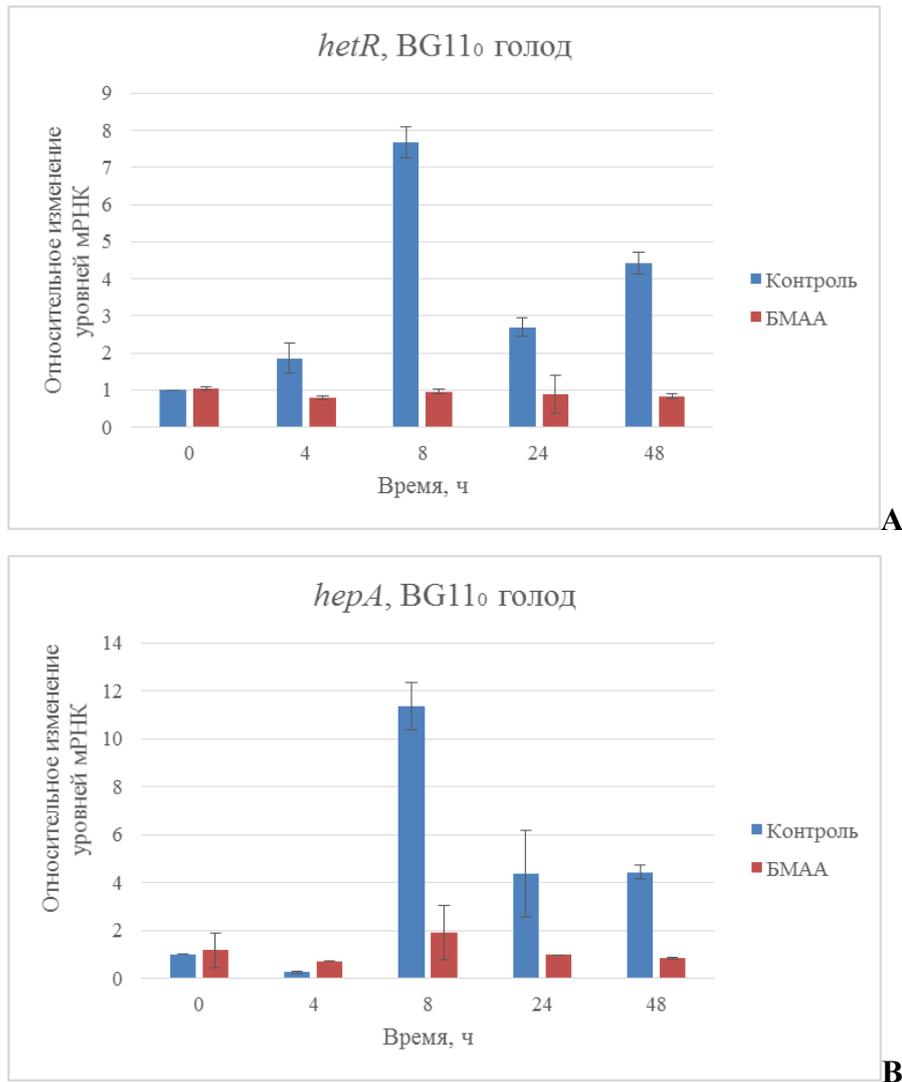


Рисунок 28. Относительные уровни мРНК генов *hetR* (А) и *hepA* (В) без добавления БМАА к клеткам (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при голодании культуры *N. sp.* PCC 7120 по азоту.

После активации NtcA усиливается экспрессия гена *hetR* [Black *et al.*, 1993; Buikema и Haselkorn, 1991], продукт которого присутствует в клетках в минорных количествах при росте на связанном азоте. В течение первых 24 ч после начала голодания БМАА в целом не влияет на экспрессию гена *ntcA*, не считая небольшого снижения экспрессии этого гена

через 8 часов голодания (Рисунок 30). Регуляторы транскрипции *HetR* и *NtcA* усиливают транскрипцию собственных генов и генов друг друга и в контрольных образцах наблюдается увеличение экспрессии генов *hetR* и *ntcA* по сравнению с моментом начала голодания (нулевой точкой) через 4 и 8 ч (Рисунки 28.А, 30). В присутствии БМАА в течение всего периода измерений (48 ч) после начала голодания экспрессия *hetR* в не отличается от низкого начального уровня, заметно значительное ингибирование экспрессии *hetR* по сравнению с экспрессией в контроле (Рисунки 28.А, Таблица 17). Следовательно, в клетках по-прежнему присутствуют только минорные количества белка *HetR* и нет усиления транскрипции *ntcA* через 8 часов после начала голодания.

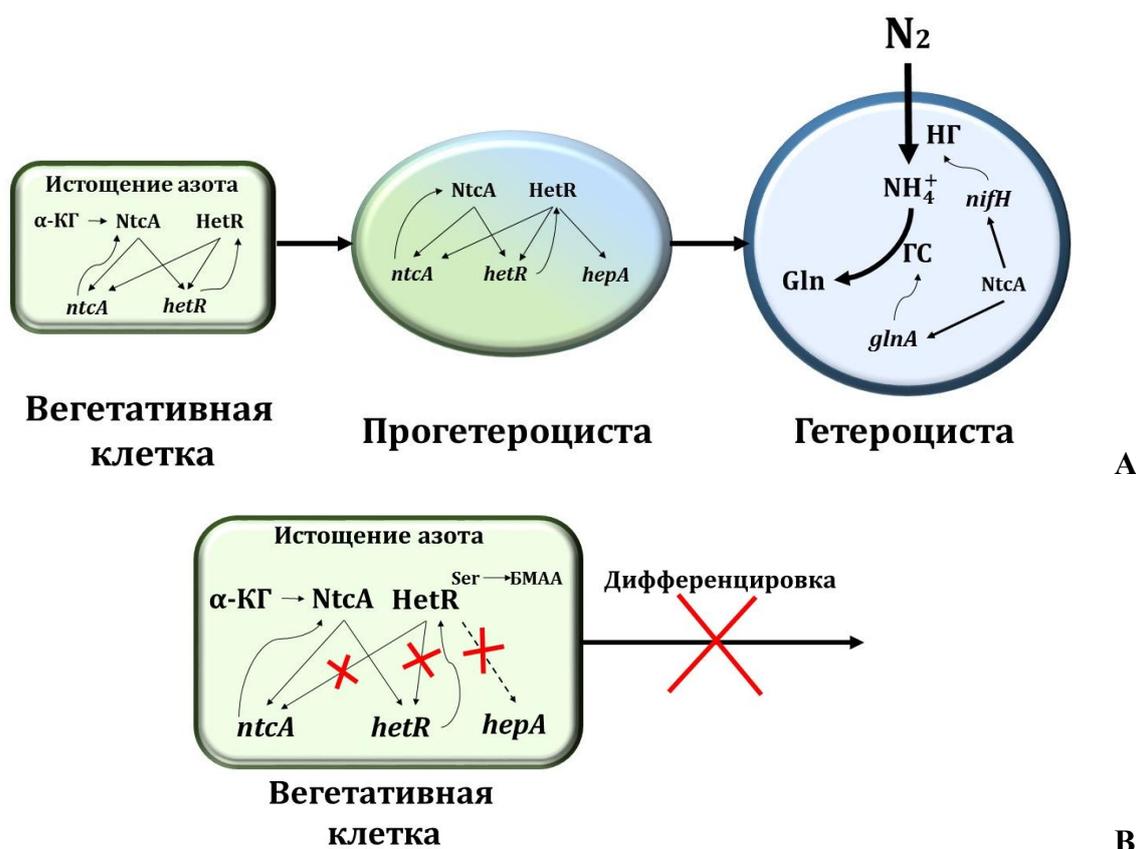


Рисунок 29. А. Схема регуляции экспрессии генов *ntcA*, *hetR*, *nifH* и *glnA* в ходе формирования гетероцист при азотном голодании. В. Схема нарушения функций белка *HetR* при возможном встраивании БМАА в его первичную структуру вместо серина на начальных стадиях формирования гетероцист. Пунктиром обозначена потенциальная регуляция экспрессии гена *hepA* белком *HetR*, осуществляемая в прогетероцистах.

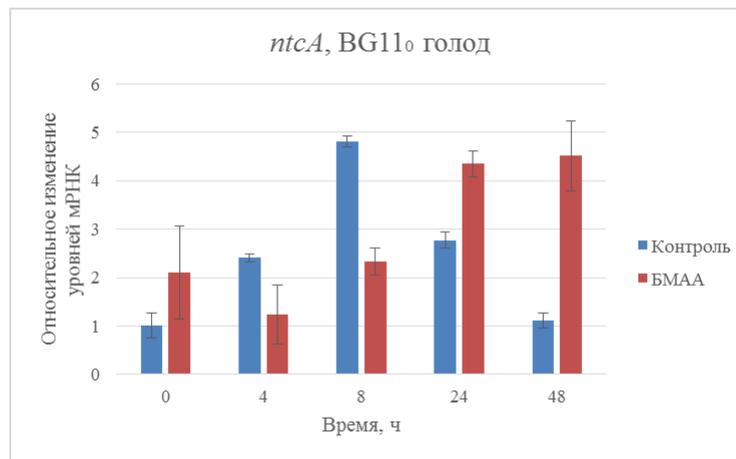


Рисунок 30. Относительные уровни мРНК гена *ntcA* без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при голодании культуры *N. sp.* PCC 7120 по азоту.

Так как значимого снижения экспрессии гена *ntcA* относительно контроля при добавлении БМАА к клеткам не наблюдается в течение первых 24 ч голодания (Рисунок 30), когда процессы дифференцировки гетероцист иницируются в цианобактериальных клетках, по-видимому, БМАА не ингибирует связывание молекулы α -КГ и белка NtcA и влияет на последующие регуляторные процессы при формировании гетероцист.

ДНК-связывающий белок HetR является сериновой протеазой, способной к автодеградации [Dong *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1998], а так как БМАА способен ошибочно встраиваться в белки вместо серина при их образовании, то одной из гипотез подавления дифференцировки может быть потеря реакционной способности белка HetR, в том числе связанной с присутствием БМАА в его первичной структуре. HetR взаимодействует с промоторами нескольких генов, связанных с регуляцией гетероцист, в частности, с промоторами генов *hetR*, *hepA* и *patS* [Du *et al.*, 2012; Feldmann *et al.*, 2011; Higa и Callahan, 2010; Huang *et al.*, 2004], а также усиливает свою собственную экспрессию и экспрессию NtcA [Muro-Pastor и Hess, 2012]. При голодании через 8 ч значительно увеличивается экспрессия *hepA* в контроле, что соответствует финальным стадиям формирования гетероцист – синтезу полисахаридной капсулы, защищающей нитрогеназу от кислорода. В присутствии БМАА уровень экспрессии *hepA* не изменяется относительно низкого начального уровня и заметно значительно ингибирование по сравнению с экспрессией в контроле. Так как белок HetR является одним из ключевых регуляторов образования гетероцист и контролирует экспрессию *hepA*, то ингибирование экспрессии гена *hetR* в присутствии БМАА в значительной степени обуславливает низкую экспрессию *hepA* (Рисунок 29.В).

Таблица 17. Относительное изменение уровней мРНК генов *N. sp.* PСС 7120 в условиях азотного голодания в контроле и в присутствии 20 мкМ БМАА. Уровень транскрипции генов в нулевой точке принят за единицу.

Ген	Контроль				БМАА			
	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч
<i>glnA</i>	0,7±0,2	1,7±0,1	3,1±0,1	0,4±0,1	0,5±0,3	2,5±0,4	0,4±0,2	6,1±0,7
<i>gltS</i>	0,7±0,2	1,4±0,7	0,3±0,1	2,2±0,0	0,4±0,1	0,5±0,0	0,6±0,0	2,0±0,0
<i>ntcA</i>	2,4±0,1	4,8±0,1	2,8±0,5	1,1±0,2	1,2±0,6	2,3±0,3	4,3±0,3	4,5±0,7
<i>hetR</i>	1,9±0,4	7,7±0,4	2,7±0,2	4,4±0,3	0,8±0,0	1,0±0,1	0,9±0,5	0,8±0,1
<i>hepA</i>	0,3±0,0	11,4±1,0	4,4±1,8	4,4±0,3	0,7±0,0	1,9±1,1	1,0±0,0	0,8±0,1
<i>nifH</i>	0,5±0,0	2,4±0,1	7,9±0,1	179,6±36,6	1,3±0,7	1,2±0,5	21,4±0,1	9,0±0,9

Заключительные этапы процесса дифференцировки гетероцист включают регулируемые перестройки ДНК, которые, в частности, происходят в генах *nifHDK*, кодирующих субъединицы нитрогеназы. Так как БМАА ингибирует экспрессию генов *hetR* и *hepA*, то к моменту запуска транскрипции гена *nifH* гетероцисты не сформированы и экспрессия *nifH*, в частности, в присутствии БМАА после первых суток голодания снижается (Рисунок 31).

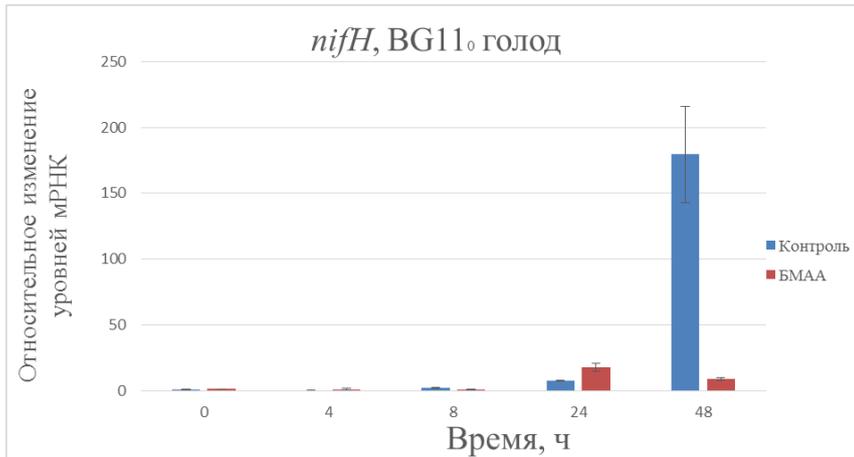


Рисунок 31. Относительные уровни мРНК гена *nifH* без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при голодании культуры *N. sp.* PСС 7120 по азоту.

В течение первых 8 ч после начала голодания, когда происходит процесс инициации дифференцировки вегетативных клеток в гетероцисты, экспрессия гена, кодирующего фермент ГС, *glnA*, в контроле и в присутствии БМАА значительно не отличается (Рисунок 32.А). Экспрессия *glnA* в контроле к 24 ч голодания культуры увеличивается в 3 раза, что соответствует функционированию фермента ГС в гетероцистах, и снижается в присутствии БМАА до уровня в 2 раза ниже исходного. Экспрессия гена *gltS*, кодирующего фермент ГОГАТ, в контроле и в присутствии БМАА колеблется практически на исходном уровне в течение первых 24 ч голодания (Рисунок 32.В).

В результате повышенной транскрипции гена *glnA* после начала азотного голодания увеличивается активность глутаминсинтетазы (ГС) [Tumer *et al.*, 1983]. В гетероцистах синтезированный после фиксации азота аммоний ассимилируется глутаминсинтетазой и транспортируется в вегетативные клетки, где глутамин превращается в глутамат с помощью фермента ГОГАТ [Thiel, 2005]. Активность ГОГАТ в гетероцистах очень низкая или отсутствует [Thomas *et al.*, 1977], и глутамат транспортируется в гетероцисты из соседних вегетативных клеток.

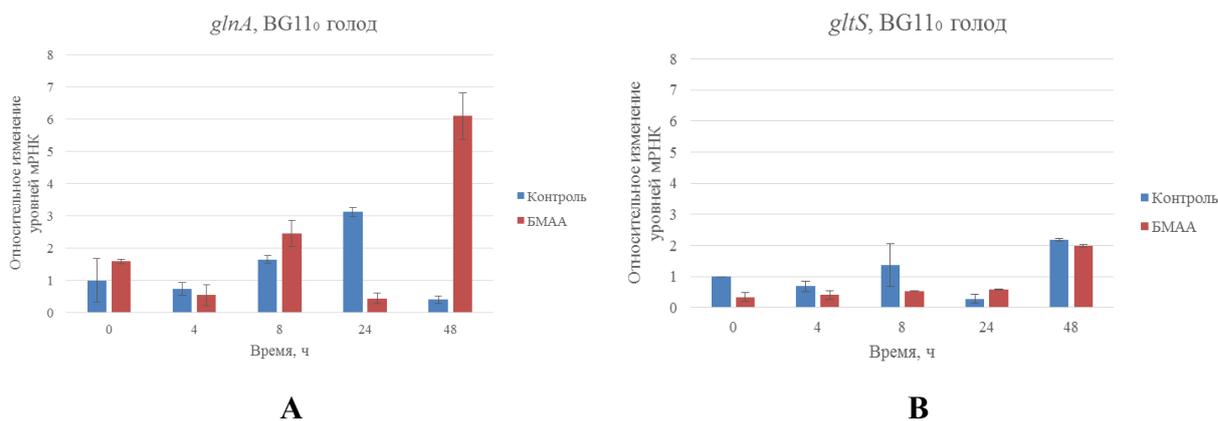


Рисунок 32. Относительные уровни мРНК генов *glnA* (А) и *gltS* (В) без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при голодании культуры *N. sp.* PCC 7120 по азоту.

4.2. Действие БМАА на экспрессию генов *N. sp.* PCC 7120 в присутствии источников связанного азота

α -КГ стимулирует ДНК-связывающую активность NtcA [Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994] и в отсутствие α -КГ транскрипция генов, зависимых от NtcA, не начнется [Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a; Tanigawa *et al.*, 2002]. На экспрессию гена *ntcA* при росте клеток *N. sp.* PCC 7120 БМАА практически не оказывает влияния (Таблица 18).

При росте цианобактерий на нитрате при действии БМАА образовывались гетероцистоподобные клетки. В присутствии связанного азота в среде внутри клеток нитрат последовательно восстанавливается до нитрита и аммония ферментами нитратредуктазой и нитритредуктазой, которые являются продуктами *narB* и *nirA* генов, соответственно [Rubio *et al.*, 1996; Luque *et al.*, 1993], при этом эксперименты показали, что на среде с аммонием в качестве источника азота культура способна выдержать присутствие больших концентраций БМАА, чем на среде с нитратом. Поэтому одной из гипотез, связанных с механизмом воздействия БМАА на цианобактериальную клетку, могло быть ингибирование функциональной способности ферментов, участвующих в ассимиляции нитрата, или их синтеза при ингибировании экспрессии генов *narB* и *nirA*, кодирующих нитрат- и нитритредуктазу, соответственно, но результаты ПЦР в реальном времени

показали, что в присутствии БМАА экспрессия гена *nirA* практически не отличается от контроля в течение 96 часов экспозиции с БМАА (Рисунок 33).

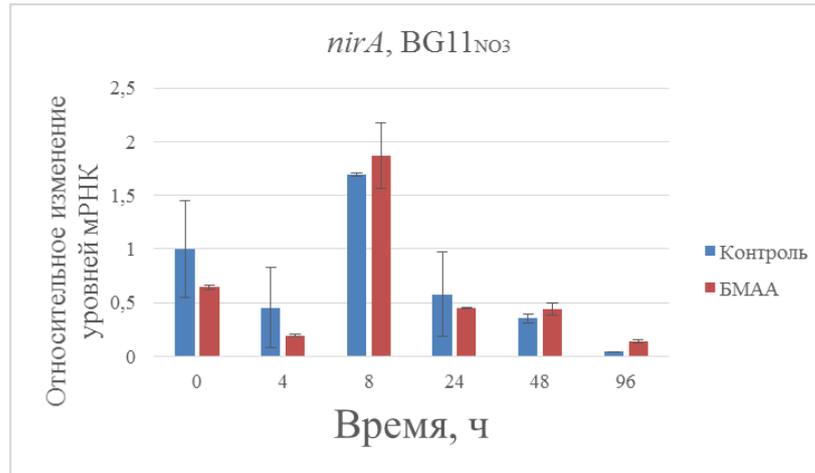


Рисунок 33. Относительные уровни мРНК гена *nirA* без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при культивировании *N. sp.* PCC 7120 на среде с нитратом

В норме, если в среде есть источник азота, экспрессия генов *hetR* и *hepA* отсутствует или снижена до минорного уровня, однако, в присутствии БМАА экспрессия генов *hetR*, *hepA* и *nifH* возрастает по сравнению с контролем (Таблица 18, Рисунок 34), что свидетельствует о поступлении сигнала об истощении азота в среде и инициации формирования гетероцист. Увеличение уровней транскрипции этих генов соответствует времени образования гетероцистоподобных клеток и соответствует фенотипу, который мы наблюдаем при микроскопии (Рисунок 24).

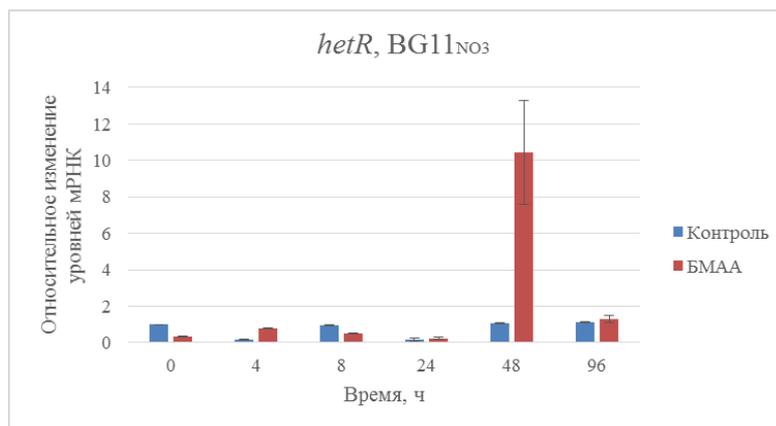
Таблица 18. Относительное изменение уровней мРНК генов *N. sp.* PCC 7120 в условиях роста культуры на нитрате в контроле и в присутствии 20 мкМ БМАА. Уровень транскрипции генов в нулевой точке принят за единицу.

Ген	Контроль					БМАА				
	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч	96 ч	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч	96 ч
<i>glnA</i>	0,3±0,1	0,9±0,0	0,2±0,1	1,1±0,1	0,2±0,0	0,3±0,1	1,2±0,4	0,2±0,0	6,5±0,7	2,0±0,2
<i>gltS</i>	0,3±0,2	3,1±0,1	0,6±0,3	0,8±0,1	1,6±0,2	0,2±0,1	1,6±0,1	2,3±0,4	4,5±0,5	4,5±0,4
<i>ntcA</i>	0,2±0,2	2,5±0,1	0,3±0,2	0,9±0,1	0,7±0,1	0,2±0,2	1,9±1,1	0,4±0,3	2,5±0,5	1,9±0,3
<i>hetR</i>	0,2±0,0	1,0±0,1	0,2±0,1	1,1±0,1	1,1±0,0	0,8±0,0	0,5±0,0	0,2±0,1	10,4±2,9	1,3±0,2
<i>hepA</i>	1,6±0,0	0,7±0,5	1,6±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	7,7±0,4	2,7±1,6	10,4±2,9	1,3±0,2
<i>nifH</i>	0,1±0,0	0,7±0,4	0,2±0,2	0,9±0,0	1,2±0,3	0,2±0,0	0,5±0,1	0,9±0,6	53,7±1,2	28,6±1,8
<i>nirA</i>	0,5±0,4	1,7±0,0	0,6±0,4	0,4±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1	1,9±0,3	0,5±0,0	0,4±0,1	0,1±0,0

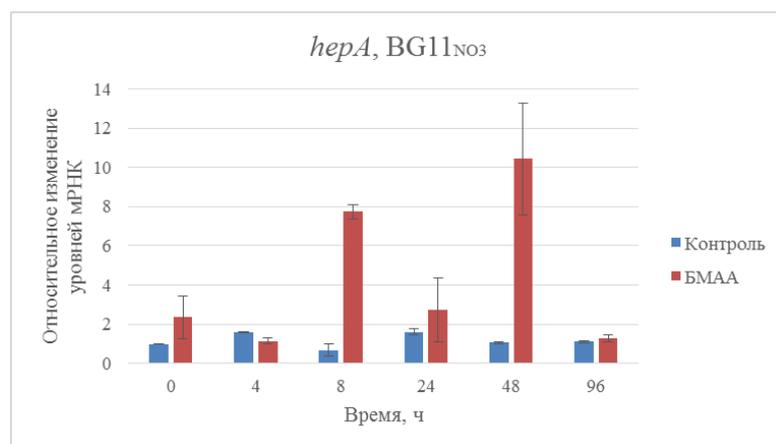
Так как БМАА способствует образованию клеток, схожих с гетероцистами, в культуре нитчатой цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 при росте на среде со связанным азотом, для определения возможных молекулярных механизмов действия БМАА мы сравнили

действие БМАА с другими небелковыми аминокислотами, которые вызывают депрессию гетероцист в различных цианобактериальных культурах в присутствии связанного азота на среде их роста.

Известными агентами, индуцирующими образование гетероцист в цианобактериальных культурах, растущих на среде в присутствии связанного азота, то есть депрессию гетероцист, являются аналоги незаменимых аминокислот MSX (L-метионинсульфоксимин), Aza-Trp (7-азатриптофан) и B2TA (β -2-тиенилаланин) (Таблица 19).



А



В

Рисунок 34. Относительные уровни мРНК генов *hetR* (А) и *hepA* (В) без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при культивировании *N. sp.* PCC 7120 на среде с нитратом.

Таблица 19. Небелковые аминокислоты, влияющие на дифференцировку клеток цианобактерий в присутствии связанного азота, и их белковые аналоги

	Название			
	БМАА	MSX	azaTrp	B2TA
Строение				
Аналог	Глутамат	Глутамат	Триптофан	Фенилаланин

При сравнении действия БМАА и небелковых аминокислот были отмечены сходства и различия (Таблица 20). Небелковая аминокислота MSX так же, как и БМАА, является аналогом глутамата.

Таблица 20. Сравнение эффектов БМАА на клетки *N. sp.* PCC 7120 с действием небелковых аналогов аминокислот, индуцирующих дерепрессию гетероцист

	БМАА	MSX	azaTrp	B2TA
Действие на рост цианобактерий	Ингибирует*	Ингибирует	Не ингибирует	Не ингибирует
Индукция дерепрессии гетероцист на среде с источником связанного азота и их функциональность	Индуцирует образование гетероцистоподобных клеток, не фиксирующих N ₂	Индуцирует образование гетероцист, способных к фиксации N ₂	Индуцирует образование гетероцист, способных к фиксации N ₂	Индуцирует образование гетероцист, не фиксирующих N ₂
Влияние на частоту гетероцист	Увеличение частоты гетероцистоподобных клеток пропорционально концентрации БМАА**	Увеличивает частоту гетероцист	Увеличивает частоту гетероцист	Не влияет на частоту гетероцист
Действие на активность глутамин синтетазы (ГС)	-	Ингибирует активность ГС	Не ингибирует активность ГС, но ингибирует активность ГОГАТ	Не ингибирует активность ГС

*БМАА значительно ингибирует рост *N. sp.* PCC 7120 на среде BG11_{NO₃}, начиная с первого дня инкубации с БМАА, а при росте на среде BG11_{NH₄} значительное ингибирование роста культуры наблюдается после более длительного срока инкубации с БМАА.

**Данные приводятся только для случая культивирования *N. sp.* PCC 7120 с различными концентрациями БМАА на среде BG11_{NH₄}, так как на среде с нитратом в качестве источника азота филаменты в цианобактериальной культуре подвержены высокой степени деградации при более высоких концентрациях, чем 20 мкМ и невозможно определить количество гетероцистоподобных клеток для сравнительного анализа.

В концентрации 1мкМ MSX значительно снижает интенсивность роста *Anabaena variabilis* на среде, содержащей 5 мМ аммония, за первые четверо суток инкубирования [Rogerson, 1979], в то время как добавление 50-100 мкМ БМАА на среде с 5 мМ аммония не вызывает значительного ингибирования роста цианобактерии в течение такого же времени культивирования. Такой эффект MSX на рост *A. variabilis* в присутствии аммония похож на действие БМАА на рост цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 на среде с нитратом. Установлено, что MSX ингибирует активность фермента глутаминсинтетазы (ГС) и таким образом обеспечивает дерепрессию гетероцист [Rogerson, 1979; Stacey *et al.*, 1978]. Поэтому для дальнейшего изучения механизма действия БМАА планируется определение эффекта БМАА на активность фермента ГС.

azaTrp и B2TA индуцируют образование гетероцист на среде с аммонием по другому механизму. Эти соединения не ингибируют активность ГС, но azaTrp подавляет активность ГОГАТ, благодаря чему в среде накапливается α -КГ, дающий сигнал к образованию гетероцист [Stacey *et al.*, 1978; Rogerson, 1979; Chen *et al.*, 1987]. Небелковая аминокислота аза-серин также является ингибитором ГОГАТ и других амидотрансфераз, при этом она не способна индуцировать образование гетероцист при добавлении к культуре *Anabaena* sp. SA, растущей на нитрате [Chen *et al.*, 1987]. При образовании гетероцист в присутствии MSX и azaTrp сохраняется способность этих клеток фиксировать молекулярный азот и поддерживается нитрогеназная активность гетероцист [Rogerson, 1979; Stacey *et al.*, 1978]. Таким образом, гетероцисты в этих культурах обеспечивают азотом вегетативные клетки, в которых заблокирован путь ассимиляции азота через ГС/ГОГАТ цикл.

Результаты ПЦР в реальном времени показали, что БМАА незначительно влияет на экспрессию генов *glnA* и *gltS* в течение первых 24 часов после добавления БМАА к клеткам *N. sp.* PCC 7120, растущим на среде с азотом (Таблица 18). Но его действие может быть связано с нарушением функционирования цикла ГС/ГОГАТ. Как аналог глутамата БМАА может конкурировать с ним за связывание с ферментом ГС, глутамат в этом случае накапливается и нарушается функционирование цикла ГС/ГОГАТ, что приводит к аккумуляции сигнальной молекулы α -КГ, взаимодействующей с NtcA (Рисунок 35). Кроме того, так как глутамат является конечным продуктом реакции с участием фермента ГОГАТ, есть вероятность, что БМАА ингибирует деятельность этого фермента или накопившийся глутамат в качестве конечного продукта. В этом случае также происходит накопление сигнальной молекулы α -КГ. Таким образом, в присутствии БМАА создаются условия для возникновения сигнала к началу экспрессии генов, вовлеченных в дифференцировку клеток, в частности, к активации глобального регулятора этого процесса, белка NtcA, участвующего во всех стадиях созревания гетероцисты (Рисунок 35). Эта гипотеза объясняет увеличение экспрессии генов *hetR* и *hetA* в присутствии БМАА и запуск начальных стадий образования гетероцист.

При голодании по азоту цикл ГС/ГОГАТ не функционирует, видимо, поэтому БМАА в первую очередь связывается не с ГС, а предположительно вступает во взаимодействие с белком HetR.

БМАА также может вступать в комплексообразование с переходными металлами [Nunn *et al.*, 1998]. Для восстановления нитрита до аммония ферредоксин-зависимая нитритредуктаза цианобактерий обеспечивает перенос электронов через железосерный кластер от восстановленного ферредоксина на сирогем. В процессе восстановления нитрита до аммония при взаимодействии БМАА с Fe^{2+} может быть нарушен любой из этих этапов.

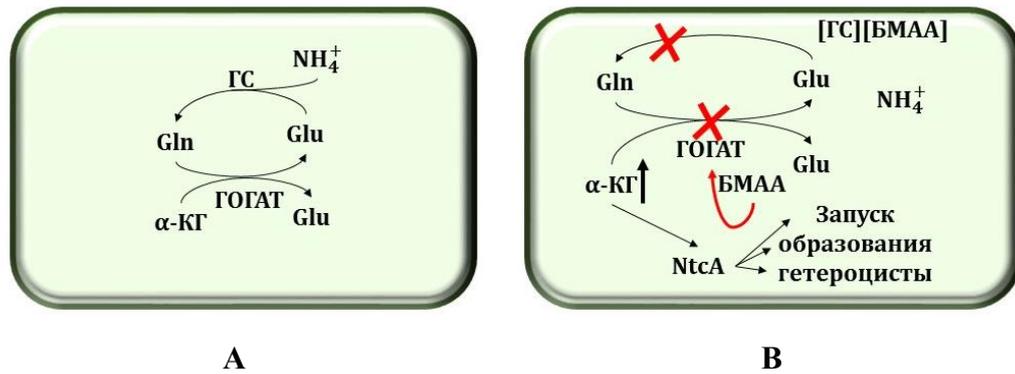


Рисунок 35. Гипотеза образования гетероцистоподобных клеток на среде с азотом в присутствии БМАА. А. Схема функционирования цикла ГС/ГОГАТ. В. Нарушение функционирования цикла ГС/ГОГАТ в присутствии БМАА.

Ингибирующее действие БМАА на рост цианобактерий может быть обусловлено окислительным стрессом. При разложении БМАА в качестве конечных продуктов в среде образуются метиламин и аммоний [Nunn и Ponnusamy, 2009]. Далее метиламин окисляется до формальдегида, перекиси водорода и аммония [Nunn, 2009]. В присутствии высокой концентрации ионов аммония в среде равновесие реакции распада БМАА на метиламин и аммоний может смещаться в сторону субстрата, что обуславливает большую устойчивость клеток к БМАА на среде с аммонием, чем на среде с нитратом.

При воздействии MSX на *A. sp. strain ATCC 33047* на среде без азота, как и при действии БМАА на культуру в diazotrophic условиях роста не наблюдается влияния на присутствие и частоту зрелых гетероцист. После добавления этих аминокислот к зрелым культурам при diazotrophic условиях роста гетероцисты по-прежнему присутствуют в составе филаментов. Но в присутствии MSX нитрогеназная активность гетероцист сопоставима с нитрогеназной активностью в контроле [Ramos и Guerrero, 1983], а при инкубировании клеток с БМАА нитрогеназная активность заметно снижается [Verntzon *et al.*, 2013; эта работа], что может быть связано с взаимодействием БМАА с железосодержащими белками в составе нитрогеназы и их дестабилизацией и/или окислительным стрессом от продуктов распада БМАА и других путей образования активных форм кислорода (АФК) в присутствии токсина [Verntzon *et al.*, 2013].

Присутствие аминокислот, необходимых для синтеза белков в процессе дифференцировки гетероцист, обеспечивается в среде благодаря протеолизу некоторых компонентов вегетативных клеток. Кроме того, протеиназы, синтез которых быстро индуцируется после начала голодания по азоту, являются биохимическими маркерами сигналов об истощении азота в среде, которые участвуют в запуске дифференцировки гетероцист и синтеза нитрогеназы [Wood и Haselkorn, 1980]. Так как Aza-Trp не ингибирует активность ГС, но также приводит к депрессии гетероцист с функциональным

нитрогеназным комплексом [Stacey *et al.*, 1978], существуют предположения, что Aza-Trp сигнализирует клеткам цианобактерий об азотном голодании, индуцируя специфическую протеолитическую активность, направленную на снижение уровня С-фикоцианина в клетках *Anabaena* [Chen *et al.*, 1987]. Распад фикобилипротеинов в клетках *Anabaena* в присутствии аммония наблюдается и при воздействии MSX [Wood и Haselkorn, 1980].

Гетероцистоподобные клетки не способны фиксировать азот, что свидетельствует либо об отсутствии условий для синтеза нитрогеназы, либо условий для ее функционирования. При микроскопии (Рисунок 24) видно, что эти клетки меньше или сравнимы по размеру с вегетативными, в то время как зрелые гетероцисты, как правило, крупнее вегетативных клеток. Кроме того, гетероцисты обладают толстой внешней оболочкой, защищающей нитрогеназу от кислорода, и эта оболочка у гетероцистоподобных клеток отсутствует. Вероятно, при дифференцировке клеток, инициированной БМАА, процесс формирования гетероцист не проходит все стадии, так как БМАА возможно блокирует активность участвующих в процессе дифференцировки белков на уровне созревания гетероцисты. Так при нарушении функциональности регуляторного белка HetR, который косвенно активирует экспрессию генов *hep* и *hgl* [Huang *et al.*, 2004], обеспечивающих синтез компонентов оболочки гетероцист, может происходить нарушение биогенеза полисахаридной капсулы и гликолипидного слоя, что приводит к отсутствию оболочек у гетероцистоподобных клеток.

На следующем этапе изучения деталей механизмов действия БМАА на азотный метаболизм цианобактерий планируется определить влияние токсина на протекание ферментативных реакций, в частности, действие на активность ГС.

5. Действие БМАА на внутриклеточную концентрацию ионов кальция

Известно, что БМАА является агонистом глутаматного рецептора позвоночных. Глутаматный рецептор представляет собой ионный канал, проницаемый для ионов K^+ , Na^+ и Ca^{2+} , лигандом этого рецептора является глутамат. У позвоночных и беспозвоночных глутаматный рецептор участвует в передаче возбуждающих сигналов в синапсах нервной системы. Глутаматный рецептор был также обнаружен у растений и у самих цианобактерий. У *A. thaliana* глутаматный рецептор, кодируемый геном *AtGLR1.1*, регулирует метаболизм азота и углерода [Kang *et al.*, 2004], функция глутаматного рецептора у цианобактерий пока неизвестна. У цианобактерий кальций вовлечен в передачу сигналов при азотном голодании и формировании гетероцист [Torrecilla *et al.*, 2004].

Мы предположили, что, если БМАА может связываться с глутаматным рецептором млекопитающих, возможно эта аминокислота может связываться и с собственным

глутаматным рецептором, регулируя поток кальция в клетках цианобактерий. Поэтому мы провели серию экспериментов для того, чтобы определить влияет ли присутствие БМАА на изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция в цианобактериях.

При построении калибровочной кривой *in situ* были определены следующие значения констант: $R_{max} = 0.156184$, $R_{min} = 0.054292$, $Sf2 = 255.1086$, $Sb2 = 130.099$. С помощью значений этих констант была рассчитана ориентировочная концентрация внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$ в клетках *N. sp. PCC 7120*, которая составила $\sim 144 \pm 90$ нМ (10^{-9} моль).

Действие BG11_N и АВА. Было показано, что добавление BG11_N изменяет (уменьшает или увеличивает) концентрацию кальция в клетках дикого типа на 8%, в пределах погрешности метода. Мы определили, что в 1 из 4 проб АВА увеличивает внутриклеточную концентрацию $[Ca^{2+}]_i$ в клетках дикого типа на 30%, в 3 других клетках концентрация кальция увеличивалась, но в пределах 10%.

Действие БМАА (1мкМ). Измерение действия БМАА на флуоресценцию клеток дикого типа *N. sp. PCC 7120* было выполнено в 21 клетке. В 8 из них кривые флуоресценции были нестабильны. В 77% стабильных образцов (10 клеток) изменение флуоресценции колебались на уровне погрешности метода ($0.75 < \dots < 10$, %) (Таблица 21). В остальных 23% случаев (3 клетки) наблюдалось заметное увеличение флуоресценции клеток *N. sp. PCC 7120* ($> 15\%$). В одном из экспериментов при добавлении БМАА к *N. sp. PCC 7120* $R_{340/380}$ увеличивается на 70%.

Таблица 21. Действие БМАА на отношение флуоресценций ($R_{340/380}$ нм)

Действие БМАА на клетки <i>N. sp. PCC 7120</i>			
Степень изменения $R_{340/380}$	Кол-во клеток	% от общего кол-ва клеток	% от стабильного кол-ва измерений
$0.75 < \dots < 10$, %	10	47,62%	77%
$> 15\%$	3	14,29%	23%
нестабильный	8	38,1%	-

При пересчете значений флуоресценции в концентрацию $[Ca^{2+}]_i$ в нМ было определено, что в 5 повторностях из 21, БМАА значительно увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция в клетках *N. sp. PCC 7120*. Средние значения до и после добавления БМАА к клеткам *N. sp. PCC 7120* указаны в Таблице 22. Таким образом, было определено, что в 38% стабильных измерений БМАА повышает внутриклеточную концентрацию кальция на 62,6%.

Таблица 22. Внутриклеточная концентрация кальция в клетках *N. sp.* PCC 7120 до и после добавления БМАА, нМ.

Внутриклеточная концентрация $[Ca^{2+}]_i$,		Δ^* , %
До добавления БМАА	После добавления БМАА	
156 ± 8	417 ± 188	62,58982

Примечание. * Δ – разница концентраций до и после добавления БМАА в %

Структура β -карбамата, образуемого из БМАА в растворе бикарбоната, имеет большее сходство со структурой эксайтотоксических аминокислот, в частности, со структурой глутамата (Рисунок 1), и БМАА в форме β -карбамата более эффективно повышает концентрацию ионов кальция в клетках мозга крысы, чем БМАА [Brownson *et al.*, 2002].

В серии экспериментов с добавлением β -карбамата к клеткам *N. sp.* PCC 7120 разница между концентрациями кальция в клетках после добавления β -карбамата колеблется от 20 до 70% (Таблица 23). Такое увеличение концентраций кальция в клетках *N. sp.* PCC 7120 наблюдается в 19 из 29 клеток. При измерениях в 7 клетках из 35 наблюдалась нестабильность флуоресценции. При добавлении НС к 3 из 5 клеток не наблюдалось изменения концентрации кальция.

Таблица 23. Внутриклеточная концентрация кальция в клетках *N. sp.* PCC 7120 до и после добавления β -карбамата, нМ

Внутриклеточная концентрация $[Ca^{2+}]_i$,		Δ^* , %
До добавления β -карбамата	После добавления β -карбамата	
103 ± 46	244 ± 177	57,7

* Δ – разница концентраций до и после добавления БМАА в %

Действие L-глутамата (10мкМ). При действии глутамата на клетки *N. sp.* PCC 7120 в 4 измерениях из 9 не наблюдалось увеличение значения $R_{340/380}$. В одном случае после добавления глутамата наблюдалось значительное увеличение флуоресценции – на 19%. В остальных 4 случаях наблюдалось снижение флуоресценции клеток относительно начального уровня. Добавление БМАА к клеткам *N. sp.* PCC 7120 в присутствии глутамата не влияло на флуоресценцию клеток больше, чем на 3-4% в 8 клетках из 9. В 1 клетке наблюдалась нестабильность кривых флуоресценции.

Предварительные результаты экспериментов показали, что при добавлении БМАА к клеткам дикого типа *N. sp.* PCC 7120 в 77% экспериментов со стабильными кривыми флуоресценции внутриклеточная концентрация $[Ca^{2+}]_i$ увеличивалась незначительно. В 23% экспериментов в присутствии БМАА внутриклеточная концентрация $[Ca^{2+}]_i$

увеличивалась примерно на 60%. При воздействии β -карбамата 65,5% экспериментов со стабильными кривыми флуоресценции концентрация $[Ca^{2+}]_i$ также увеличивалась практически на 60%. Так как в состав среды BG11_N входит Na_2CO_3 , а для протекания реакции карбоксилирования аминогруппы БМАА не требуется соблюдения особых условий и БМАА с карбонатом взаимодействуют при физиологических концентрациях [Myers и Nelson, 1990], то БМАА может конвертировать в карбамат и способствовать увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в клетках *N. sp.* PCC 7120 в форме β -карбамата.

При блокировании глутаматного рецептора (одного из кальциевых каналов) лигандом (L-глутаматом) увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция после добавления БМАА к клеткам *N. sp.* PCC 7120 не наблюдалось, но необходимо также учитывать функционирование потенциал-зависимых кальциевых каналов, присутствующих в клетках помимо глутаматного рецептора.

Так как в высоких концентрациях глутамат может оказывать эксайтотоксический эффект на клетки животных, важно определить, какие концентрации глутамата не влияют на $[Ca^{2+}]_i$ при действии на цианобактериальные клетки и какова пороговая концентрация глутамата, при добавлении которой может наблюдаться эксайтотоксический эффект, индикатором которого будет значительное увеличение концентрации ионов кальция в клетках дикого типа *N. sp.* PCC 7120. Необходимо исследовать эффект действия БМАА после внесения к клеткам той концентрации глутамата, которая блокирует рецептор, но не вызывает его перевозбуждение.

При анализе полученных результатов измерения внутриклеточных концентраций кальция описанным выше методом оказалось, что достаточно большой процент полученных кривых флуоресценции относится к нестабильным. Кроме того, при пробоподготовке требовалось инкубирование цианобактериальных клеток с флуоресцентным красителем Fura 2-AM в течение 5 часов для более эффективного проникновения красителя через клеточную стенку цианобактерий и увеличения его концентрации внутри клеток. При определении соотношения $R_{340/380}$ в каждом из образцов, 50 мкл каждого из которых фиксировали полилизинном на стекле, было возможным измерять флуоресценцию только в одной клетке из каждого образца, так как каждое измерение длилось от 30 до 40 минут в зависимости от времени наступления стабилизации значений $R_{340/380}$ на экране компьютера, соединенного с микроскопом. Поэтому при измерении флуоресценции во второй клетки того же зафиксированного образца в течение 30-40 минут суспензия цианобактерий высыхала на стекле. Кроме того, после добавления реактива, изменяющего концентрацию кальция, например, БМАА, к образцу во время

измерения флуоресценции первой клетки, концентрация кальция менялась и в других клетках в образце.

Поэтому с целью устранения этих технических сложностей и для повышения статистической значимости результатов измерения совместно с Цитриной А.А. в институте биологии развития им. Н.К. Кольцова была проведена серия экспериментов по измерению внутриклеточной концентрации кальция в культуре *N. sp.* PCC 7120 на более современном оборудовании и впоследствии с другим флуоресцентным красителем.

В новой серии экспериментов флуоресценция в суспензии клеток цианобактерий измерялась при помощи фильтров 485 нм (возбуждение) и 535 нм (эмиссия) на мультиридере Beckman coulter DTX800, в 96 луночных планшетах, что позволило сократить время между измерениями в разных пробах. Вероятно, из-за сложного строения клеточной стенки цианобактерий краситель Fura-2 AM проникал лишь в небольшой процент клеток *N. sp.* PCC 7120 и ассоциировал в основном с клеточной поверхностью. В ряде экспериментов также использовался другой флуорофор Fluo-4 AM, с помощью которого клетки цианобактерий удалось пометить с большей эффективностью, чем с помощью Fura-2 AM. Предварительные результаты продемонстрировали увеличение концентрации кальция в клетках цианобактерий при воздействии 50 мкМ БМАА в условиях азотного голодания в 5-7 раз. В условиях роста клеток в среде, содержащей нитрат натрия, эффекты добавления БМАА не были столь заметны.

По результатам микроскопических наблюдений (конфокальный микроскоп Leica SP5) нами были сделаны предварительные выводы о том, что локализация флуоресцентного зонда Fluo-4 может не соответствовать цитозолю клетки. Т.к. цианобактерии обладают двухмембранной клеточной стенкой и межмембранным пространством, нельзя исключать возможности накопления зонда в одном из этих компартментов, что, в свою очередь, может вносить значительные погрешности в измерения (отсутствие значимой реакции на большие дозы ионофора кальция). Наиболее значительное накопление зонда Fluo-4 было отмечено в погибающих и морфологически измененных клетках что так же может вносить погрешности в измерения. Еще одной причиной отсутствия значительного увеличения эмиссии Fluo-4 в ответ на экспериментальное воздействие можно объяснить поглощением испускаемых зондом фотонов белковыми комплексами, содержащими флуорохромы (хлорофилл *a* и фикобилины).

Таким образом, проведенные исследования с использованием двух разных флуоресцентных красителей для мониторинга ответа цианобактериальных клеток на изменение количества ионов кальция при воздействии БМАА продемонстрировали наличие серьезных методических сложностей. В работе было установлено, что метод

определения внутриклеточных концентраций кальция путем окрашивания клеток флуоресцентными красителями не является оптимальным для цианобактериальных культур вследствие низкой проницаемости клеточной стенки цианобактерий для красителей и трудностей при определении флуоресценции красителя внутри клеток.

Для дальнейших исследований влияния БМАА на концентрацию ионов кальция внутри цианобактериальных клеток нами будет использован другой экспериментальный подход, основанный на использовании люминесцентного белка экворина, активируемого ионами кальция, в рекомбинантном штамме *N. sp.* PCC 7120 [Torrecilla *et al.*, 2000].

Флуорофор Fura 2-AM является одним из наиболее используемых красителей для изменения внутриклеточных концентраций кальция. Его широко применяют для окрашивания эукариотических клеток, в частности, протопластов растений [Sebastiani *et al.*, 1999; Yemelyanov *et al.*, 2011], но также его использовали для измерения концентраций кальция в грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Selenomonas ruminantium*) и грамположительных (*Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptomyces coelicolor*) бактериях [Gangola и Rosen, 1987; Tisa и Adler, 1995; Futsaether и Johnsson, 1994; Nakamura *et al.*, 1996; Daigle *et al.*, 2015], поэтому он был выбран нами для измерений внутриклеточных концентраций кальция в клетках цианобактерий.

В работе [Gangola и Rosen, 1987] было впервые показано, что краситель Fura 2-AM может быть использован для определения внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} в бактериальных клетках. Так как *E. coli* не имеет внутриклеточных компартментов, в которых мог бы скапливаться загруженный краситель, то значения для $[\text{Ca}^{2+}]_i$ отражают среднюю концентрацию цитозольного свободного кальция внутри клеток, и эта концентрация составляет 90 ± 9 нМ [Gangola и Rosen, 1987]. Флуоресцентный метод с использованием Fura-2 для измерений кальция в клетках *E. coli* был применен в работе [Tisa и Adler, 1995]. Методы измерений в этих двух исследованиях отличались способом загрузки флуоресцентного красителя в клетки *E. coli*. В первой работе перед добавлением красителя клетки обрабатывали с помощью Tris/EDTA [Gangola и Rosen, 1987], а во второй работе Fura-2 вводили в клетки с помощью электропорации [Tisa и Adler, 1995]. В обоих исследованиях концентрация свободных ионов Ca^{2+} составила около 100 нМ.

Для строго анаэробной грамотрицательной бактерии *S. ruminantium* оптимальным методом загрузки Fura-2/AM оказалось совместная обработка клеток плуроником F127 и бычьим сывороточным альбумином после предобработки ЭДТА [Nakamura *et al.*, 1996]. При этом обработка клеток только одним из реагентов (ЭДТА, плуроником F127 или лизоцимом), а также плуроником F127 и ЭДТА совместно не создавала условий для

эффективной окраски клеток Fura-2/AM. С помощью этой методики удалось определить, что концентрация свободного $[Ca^{2+}]_i$ в клетках *S. ruminantium* составляет $48,1 \pm 2,2$ нМ.

При измерении внутриклеточных концентраций кальция в грамположительных бактериях с использованием Fura-2/AM удалось определить, что в клетках *P. acnes* при низком содержании кальция в среде внутренняя концентрация составила 135 ± 13 нМ, а при высокой концентрации Ca^{2+} вне клеток (1мМ) внутриклеточная концентрация увеличивалась до 280 ± 40 нМ [Futsaether и Johnsson, 1994]. Методика также оказалась успешной для измерения концентраций кальция в двух других грамположительных бактериях [Clementi *et al.*, 2014; Daigle *et al.*, 2015]. С ее помощью удалось определить, что при предварительной обработке раствором, содержащим 100 мМ KCl и 30 мМ MOPS (3-морфолинопропансульфоновой кислоты), при pH 7.2 с последующим добавлением Fura-2/AM и инкубированием при 30°C в течение 60 мин клеток дикого типа *S. coelicolor* уровень кальция составил 116.5 ± 11.8 нМ [Daigle *et al.*, 2015].

Работа [Clementi *et al.*, 2014] посвящена разработке протокола для оптимального определения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках *S. pneumoniae* с помощью Fura-2/AM. Краситель растворяли в плуронике и ДМСО. Клетки отмывали натрий-фосфатным буфером (PBS), добавляли раствор Fura-2/AM и инкубировали 75 мин при 37°C, несколько раз отмывали с помощью PBS и инкубировали 30 мин при 37°C и снова отмывали PBS перед микроскопированием.

Для всех вышеописанных бактерий интенсивность флуоресценции Fura-2/AM определяли при возбуждении на двух длинах волн – 340 нм и 380 нм, и эмиссии при 510–550 нм флуоресцентных микроскопах, как и в нашей работе.

Это свидетельствует о том, что в целом флуоресцентный краситель Fura-2/AM подходит для мечения клеток бактерий с разной морфологией при том, что для каждого вида необходимо экспериментально подбирать оптимальный способ загрузки клеток красителем. По-видимому, как отмечалось выше, для цианобактериальных клеток этот способ менее эффективен и возможно целесообразней применение метода с использованием люминесцентного белка экворина.

Предварительные результаты измерений внутриклеточных концентраций кальция с помощью Fura-2/AM в клетках *N. sp.* PCC 7120 показали, что количество ионов кальция в нМ одного порядка с количествами, определенными в других бактериях. Тем не менее, мы также установили, что примененные в нашей работе методики с использованием флуоресцентных красителей Fura-2/AM и Fluo-4 не являются оптимальными для точного и статистически значимого измерения внутриклеточных концентраций кальция в клетках цианобактерий. Поэтому мы предполагаем, что использование рекомбинантного штамма *N. sp.* PCC 7120 согласно методике, описанной в статье [Torrecilla *et al.*, 2000], позволит

уточнить полученные нами данные и результаты по измерению концентраций ионов кальция внутри клеток будут более статистически значимыми.

6. Действие БМАА на размер клеток *N. sp.* PCC 7120

В ходе световой микроскопии было обнаружено, что в присутствии БМАА размеры клеток *N. sp.* PCC 7120 отличаются от размеров клеток в контрольных вариантах, где БМАА не был добавлен. Так как размеры клеток в культуре нитчатой цианобактерии *N. sp.* PCC 7120 являются достаточно гетерогенными, то при оценке результатов сравнивали средние размеры клеток *N. sp.* PCC 7120, росших на средах BG11_{NO₃}, BG11_{NH₄} и BG11₀ без БМАА и в присутствии токсина (Таблица 24). При сравнении средних размеров клеток *N. sp.* PCC 7120 прослеживается тенденция к увеличению размеров клеток *N. sp.* PCC 7120 в присутствии БМАА по сравнению с клетками, растущими без БМАА (Рисунки 22-24; Таблица 24).

При изучении воздействия БМАА на различные типы клеток эукариот было обнаружено значительное, зависимое от концентрации БМАА изменение в физическом состоянии белков цитоскелета эритроцитов человека. Было показано, что БМАА может вызывать значительное усиление белок-белковых взаимодействий в цитоскелете в мембранах эритроцитов. При этом БМАА не оказал никакого влияния на физическое состояние липидного бислоя в мембранах эритроцитов [Butterfield *et al.*, 1993]. Нарушение структуры мембран при воздействии БМАА рассматривается как один из возможных аспектов, обуславливающих нейротоксичность БМАА.

Таблица 24. Средние размеры площадей клеток на 3 сутки при культивировании на средах BG11_{NO₃}, BG11_{NH₄} и BG11₀. Концентрация БМАА на средах BG11_{NO₃} и BG11₀ 20 мкМ и 100 мкМ на среде BG11_{NH₄}

Среда	Средняя площадь клеток, мкм ²	
	Контроль	+ БМАА
BG11 _N	11,50	15,27
BG11 _{NH₄}	15,33	18,66
BG11 ₀	10,18	12,61

Известно, что у цианобактерий экспрессируется белок MreB, гомологичный белку, входящему в цитоскелет эукариотических клеток, а именно актину. Мутация в гене *mreB* приводит к изменению палочковидной формы клеток в культуре *N. sp.* PCC 7120 на сферическую [Hu *et al.*, 2007]. Было показано, что экспрессия *mreB* активируется при дифференциации гетероцист и акинетов из вегетативных клеток [Campbell *et al.*, 2007].

В культуре *Synechococcus* sp. PCC 7942 белок MreB накапливается до более высоких уровней в мутантах по клеточному делению *ftn2* и *ftn6* [Koksharova *et al.*, 2007]. Таким образом, накопление MreB может быть связано с формированием увеличенных в размере и / или удлинённых клеток у цианобактерий [Singh и Montgomery, 2011]. Уровни транскриптов *mreB* негативно регулирует белок, который кодирует ген *bolA*, и ингибирует накопление белка MreB [Freire *et al.*, 2008]. Клетки *E.coli* с избыточной экспрессией *bolA* обладают сферической формой, экспрессия этого морфогена индуцируется в стационарной фазе и при различных стрессах, что приводит к образованию сферической формы клеток путем снижения экспрессии *mreB* [Freire *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 1999]. При воздействии БМАА на клетки цианобактерий наблюдалось увеличение средних размеров клеток на всех вариантах сред и изменение формы клеток на более сферическую. Эти данные могут свидетельствовать о возможном негативном воздействии БМАА на белок MreB или индуцировании экспрессии гена *bolA* в стрессовых условиях, обусловленных присутствием БМАА.

V. ВЫВОДЫ

1. Бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia* синтезируют пул летучих соединений, обладающих ингибиторным действием на рост фитопатогенных бактерий, грибов и цианобактерий, а также эукариотических организмов – *Drosophila melanogaster* и нематоды *Caenorhabditis elegans*.
2. Ингибиторное и летальное действие на про- и эукариотические организмы оказывают идентифицированные компоненты пула летучих соединений, синтезируемые в наибольшем количестве, - кетоны (2-нонанон, 2-ундеканон, 2-гептанон) и диметилдисульфид (ДМДС).
3. Гены, кодирующие муреин-пептид-лигазу, участвующую в процессе биогенеза клеточной стенки цианобактерий, ABC транспортер и белок, содержащий VRR-NUC домен, присутствующий в ферментах рестрикции-модификации, определяют чувствительность цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 к действию 2-нонанона.
4. Небелковая аминокислота бета-N-метиламин-L-аланин (БМАА) репрессирует образование гетероцист и синтез фермента нитрогеназы в процессе азотфиксации в клетках цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120.
5. Действие БМАА приводит к изменению экспрессии генов, продукты которых вовлечены в азотный метаболизм и клеточную дифференцировку цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К вторичным метаболитам бактерий относится широкий спектр веществ различной химической природы, которые обладают разнообразными биологическими функциями. Эти соединения представляют большой интерес, и в настоящее время в микробиологии активно формируется новое направление – «химическая экология», предметом которой является изучение химических веществ, участвующих во взаимодействиях живых организмов, а фокус направлен на изучение синтеза и биологических функций этих метаболитов, а также клеточных ответов на их присутствие в окружающей среде. В этой работе мы изучали биологическую активность соединений органической природы, синтезируемых микроорганизмами, занимающими общие биологические ниши, а именно летучих органических соединений (ЛОС), первичными продуцентами которых являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*, выделенные в основном из ризосферы растений, и небелковой аминокислоты БМАА, синтезируемой цианобактериями, которые обитают не только в морских и пресных водоемах, но и в почвах разной влажности, а также активно образуют симбиозы с растениями. Синтез и природная активность ЛОС и БМАА имеют большое экологическое значение.

В последние годы синтез ЛОС с антимикробной активностью почвенными и ризосферными бактериями привлекает все больше внимания исследователей, так как предполагают, что ЛОС могут быть важным фактором в симбиотических и антагонистических отношениях микроорганизмов, наряду с синтезом антибиотиков, сидерофоров, а также при взаимодействии с высшими организмами. В ходе работы мы изучили влияние бактериальных ЛОС, синтезируемых штаммами *Pseudomonas* и *Serratia*, на представителей фитопатогенных микроорганизмов (бактерий и грибов), цианобактерий и беспозвоночных животных (*C. elegans* и *D. melanogaster*). Полученные результаты, представленные в работе, указывают на потенциал некоторых групп летучих органических соединений, выделяемых ризосферными и другими микроорганизмами, с точки зрения защиты растений, в том числе экономически необходимых культур, от микробных фитопатогенов и патогенных видов нематод.

Большая часть современных исследований биологической активности ЛОС носит в основном описательный характер. В данной работе получены результаты, важные для выявления механизмов, лежащих в основе наблюдаемых эффектов микробных летучих веществ. Благодаря получению мутантов цианобактерий, устойчивых к действию кетонов, было показано, что эти соединения, в частности 2-нонанон, синтезируемые почвенными бактериями в составе смеси летучих веществ, способны воздействовать на клетки микроорганизмов различными путями, в том числе, воздействуя на ферментные системы,

участвующие в формировании клеточной стенки бактерий, в метаболизме ДНК, что, свидетельствует об их плеiotропном действии.

Другим метаболитом, который изучался в данной работе, является нейротоксическая небелковая аминокислота БМАА (бета-метиламин-L-аланин), которую продуцируют цианобактерии. БМАА оказывает разнообразное действие на фитопланктон, растения и животных и имеет большое медицинское и экологическое значение. Аккумуляция этого цианотоксина в природе в пищевых цепях вызывает опасения. Неизвестна роль этой небелковой аминокислоты в клетках цианобактерий. Поэтому фундаментальные исследования функций БМАА в клетках самих цианобактерий важны как для более глубокого понимания природы этих древнейших фотоавтотрофных организмов, так и для определения способов биоконтроля накопления БМАА в окружающей среде и продуктах питания.

В данной работе впервые было показано, что БМАА в микромолярных количествах обладает выраженной биологической активностью, оказывая заметный эффект на процесс клеточной дифференцировки и на нитрогеназную активность в клетках цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. В природе БМАА может накапливаться в среде при высокой плотности популяций клеток цианобактерий, продуцирующих эту аминокислоту. Возможно, синтез БМАА, приводящий к ингибированию таких ключевых процессов, как образование гетероцист, необходимых для фиксации атмосферного азота, и нитрогеназная реакция, может быть использован цианобактериями для регуляции численности собственной популяции при истощении питательных веществ в среде обитания. Исследования механизмов синтеза и функциональной роли БМАА в клетках цианобактерий могут способствовать более глубокому пониманию значения этой молекулы в экологии этих микроорганизмов. Полученные знания могут быть учтены при выработке стратегии борьбы с интенсивными разрастаниями цианобактерий («цветением» водоемов), а также использоваться для контроля за накоплением БМАА в природе.

VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Веселова М. А., Клейн Ш., Басс И.А., Липасова В.А., Метлицкая А.З., Овадис М.И., Чернин Л.С., Хмель И.А. Quorum Sensing системы регуляции, синтез феназиновых антибиотиков и фунгицидная активность у ризосферного штамма *Pseudomonas chlororaphis* 449 // Генетика. - 2008. - Т. 44(12). - С. 1617-1627.
- Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция // Биохимия. - 2004. - Т. 69(10). - С. 1301-1313.
- Зайцева Ю., Волошина П., Лиу Х., Овадис М., Берг Г., Чернин Г., Хмель И. 2009. Участие глобальных регуляторов GrrS, RpoS и SplIR в формировании биопленок у *Serratia plymuthica* // Генетика. - 2010. - Т. 46(5). - С. 616-621.
- Кокшарова О.А. Применение методов молекулярной генетики и микробиологии в экологии и биотехнологии цианобактерий // Микробиология. - 2010. - Т. 79(6). - С. 1-16.
- Кокшарова О.А. Бактерии и фенотоз // Биохимия. - 2013. - Т. 78(9). - С. 1229-1238.
- Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. Издательство «Мир», 1976.
- Рубин А. Б., Кренделева Т. Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза // Успехи биологической химии. - 2003. - Т. 43. - С. 225-266.
- Скулачев В.П. Что такое “фенотоз” и как с ним бороться? // Биохимия. - 2012. - Т. 77. - С. 827-846.
- Хмель И.А. Quorum-Sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // Микробиология. - 2006. - Т. 75. - С. 457-464.
- Хмель И.А., Веселова М.А., Метлицкая А.З., Клейн Ш., Липасова В.А., Маяцкая А.В., Чернин Л.С. Синтез сигнальных N-ацил-гомосерин-лактонов, участвующих в межклеточном обмене информацией, у ризосферных и почвенных бактерий *Pseudomonas* и *Xanatomonas* // Генетика. - 2002. - Т. 36. - С. 568-570.
- Abed R.M.M., Dobretsov S., Sudesh K.. Applications of cyanobacteria in biotechnology // J. Appl. Microbiol. - 2009. - V. 106. - P. 1-12.
- Aguilar C., Bertani I., Venturi V. Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (*rpoS*) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416 // Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - V. 69. - P.1739-1747.
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi // Nature. - 2005. - V. 435. - P. 824–827.
- Alström S. Characteristics of bacteria from oil seed rape in relation to their biocontrol of activity against *Verticillium dahliae* // J. Phytopathol. - 2001. - V. 149. - P. 57–64.

- Arimura G., Ozawa R., Kugimiya S., Takabayashi J., Bohlmann J. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-cimene and transcript accumulation of (E)-ocimene synthase in *Lotus japonicus* // *Plant Physiol.* - 2004. - V. 135. - P. 1976-1983.
- Baines S.B., Fisher N.S., Cole J.J. Uptake of dissolved organic matter (DOM) and its importance to metabolic requirements of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* // *Limnol. Oceanogr.* - 2005. - V. 50(1). - P. 36-47.
- Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M. How plants communicate using the underground information superhighway // *Trends Plant Sci.* - 2004. - V. 9. - P. 26–32.
- Bargmann C.I., Horvitz H.R. Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans* // *Neuron.* - 1991. - V. 7. - P. 729-742.
- Bargmann C.I., Hartweg E., Horvitz H.R. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. Elegans* // *Cell.* - 1993. - V. 74. - P. 515-527.
- Banack S.A., Caller T.A., Stommel E.W. The cyanobacteria derived toxin Beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis // *Toxins (Basel).* - 2010. - V. 2(12). - P. 2837-2850.
- Banack S.A., Cox P.A. Distribution of the neurotoxic nonprotein amino acid BMAA in *Cycas micronesica* // *Bot. J. Linn. Soc.* - 2003. - V. 143. - P. 165-168.
- Banack S.A., Johnson H.E., Cheng R., Cox P.A. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium // *Mar. Drugs.* - 2007. - V. 5(4). - P. 180-196.
- Banack S.A., Metcalf J.S., Spáčil Z., Downing T.G., Downing S., Long A., Nunn P.B., Cox P.A. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids // *Toxicon.* - 2011. - V. 57. - P. 730-738.
- Baptista M.S., Cianca R.C., Lopes V.R., Almeida C.M., Vasconcelos V.M. Determination of the nonprotein amino acid beta-N-methylamino-l-alanine in estuarine cyanobacteria by capillary electrophoresis // *Toxicon.* - 2011. - V. 58. - P. 410-414.
- Barreteau H., Kovac A., Boniface A., Sova M., Gobec S., Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2008. - V. 32(2). - P. 168-207.
- Bending G.D., Lincoln S.D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products // *Soil Biol. Biochem.* - 2000. - V. 32. - P. 1261–1269.
- Benhamou N., Kloepper J.W., Tuzun S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response // *Planta.* - 1998. - V. 204. - P. 153-168.

- Berg G., Roskot N., Steidle A., Eberl L., Zock A., Smalla K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2002. - V. 68. - P. 3328-3338.
- Berges J. A., Falkowski P. G. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation // *Limnol. Oceanogr.* - 1998. - V. 43(1). - P. 129-135.
- Berlyn MK. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 1998. - V. 62(3). - P. 814-984.
- Berman-Frank I., Bidle K. D., Haramaty L., Falkowski P. G. The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway // *Limnol. Oceanogr.* - 2004. - V. 49(4). - P. 997-1005.
- Berntzon L., Erasmie S., Celepli N., Eriksson J., Rasmussen U., Bergman B. BMAA inhibits nitrogen fixation in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120 // *Mar. Drugs.* - 2013. - V. 11(8). - P. 3091-3108.
- Bidle K. D., Bender S. J. Iron starvation and culture age activate metacaspases and programmed cell death in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* // *Eukaryot. Cell.* - 2008. - V. 7(2). - P. 223-236.
- Black T.A., Wolk C.P. Analysis of a Het-mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing // *J. Bacteriol.* - 1994. - V. 176(8). - P. 2282-2292.
- Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2001. - V. 4. - P. 343-350.
- Blom D., Fabbri C., Eberl L., Weisskopf L. Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2011. - V. 77. - P. 1000-1008.
- Blumer C., Haas D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis // *Arch. Microbiol.* - 2000. - V. 173. - P. 170-177.
- Boomsma F., van Dijk J., Bhaggoe U.M., Bouhuizen A.M., van den Meiracker A.H. Variation in semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in plasma and tissues of mammals // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* - 2000. - V. 126(1). - P. 69-78.
- Borg-Karlson A.K., Englund F.O., Unelius C.R. Dimethyl oligosulphide, major volatile released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus* // *Phytochemistry.* - 1994. - V. 35(2). - P. 889-892.
- Borthakur P.B., Orozco C.C., Young-Robbins S.S., Haselkorn R., Callahan S.M. Inactivation of *patS* and *hetN* causes lethal levels of heterocyst differentiation in the filamentous

- cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* - 2005. - V. 57(1). - P. 111-123.
- Bouwmeester H.J., Matusova R., Sun Z.K., Beale M.H. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2003. - V. 6. - P. 358–364.
- Bradley W.G., Mash D.C. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases // *Amyotroph. Lateral. Scler.* - 2009. - V. (2). - P. 7-20.
- Brand L.E., Pablo J., Compton A., Hammerschlag N., Mash D.C. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida aquatic food webs // *Harmful Algae.* - 2010. - V. 9(6). - P. 620-635.
- Brenner E.D., Martinez-Barboza N., Clark A.P., Liang Q.S., Stevenson D.W., Coruzzi G.M. Arabidopsis mutants resistant to S(+)-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist // *Plant Physiol.* - 2000. - V. 124(4). - P. 1615-1624.
- Brenner E.D., Stevenson D.W., McCombie R.W., Katari M.S., Rudd S.A., Mayer K.F., Palenchar P.M., Runko S.J., Twigg R.W., Dai G., Martienssen R.A., Benfey P.N., Coruzzi G.M. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant // *Genome Biol.* - 2003. - V. 4(12). - P. R78.
- Brownson D.M., Mabry T.J., Leslie S.W. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells // *J. Ethnopharmacol.* - 2002. - V. 82(2-3). - P. 159-167.
- Buikema W. J., Haselkorn R. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120 // *Genes Devel.* - 1991. - V. 5. - P. 321-330.
- Bulychev A.A., Vredenberg W.J. Modulation of Photosystem II chlorophyll fluorescence by electrogenic events generated by Photosystem I // *Bioelectrochem.* - 2001. - V. 54. - P. 157-168.
- Butterfield D.A., Hall N.C., Cross S.J. Effects of beta-(N-methylamino)-L-alanine on cytoskeletal proteins of erythrocyte membranes // *Chem. Res. Toxicol.* - 1993. - V. 6(4). - P. 417-420.
- Callahan S.M., Buikema W.J. The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* - 2001. - V. 40(4). - P. 941-950.
- Campbell E.L., Summers M.L., Christman H., Martin M.E., Meeks J.C. Global gene expression patterns of *Nostoc punctiforme* in steady-state dinitrogen-grown heterocyst-containing cultures and at single time points during the differentiation of akinetes and hormogonia // *J. Bacteriol.* - 2007. - V. 189(14). - P. 5247-5256.

- Cane D.E., Watt R.M. Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. - V. 100. - P. 1547–1551.
- Capone D. G., Montoya J. P. Nitrogen Fixation and Denitrification // Methods in Microbiology / edited by Paul, J. – London, UK: Academic Press, 2001. – P. 501-505.
- Casagrande D.J., Given P.H. Geochemistry of amino acids in some Florida peat accumulation-II. Amino acid distributions // Geochim. Cosmochim. Acta. - V. 44. – 1980. – P. 1493-1507.
- Cervantes Cianca R.C., Baptista M.S., Lopes V.R., Vasconcelos V.M. The non-protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates // Amino Acids. - 2012 - V. 42(6). - P. 2473-2479.
- Cha C., Gao P., Chen Y., Shaw P., Farrand S. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria // Mol. Plant Microbe Interact. - 1998. - V. 11. - P. 1119-1129.
- Chancey, S.T., Wood D. W., Pierson L.S. III. Two component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens* // Appl. Environ. Microbiol. - 1999. - V. 65. - P. 2294-2299.
- Chaurasia B., Pandey A., Palni L.M.S., et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformation in pathogenic fungi *in vitro* // Microbiol. Res. - 2005. - V. 160. - P. 75–81.
- Chen C.H., Van Baalen C., Tabita F.R. Nitrogen starvation mediated by DL-7-azatryptophan in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CA // J. Bacteriol. - 1987. - V. 169(3). - P. 1107-1113.
- Chernin L.S., Ismailov Z., Haran S., Chet I. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens // Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - V. 61. - P. 1720-1726.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles // Environ. Microbiol. Rep. - 2011. - V.3(6). - P. 698-704.
- Chuankun X., Minghe M., Leming Z., Keqin Z. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds // Soil Biol. Biochem. - 2004. - V. 36. - P. 1997–2004.
- Clementi E.A., Marks L.R., Roche-Håkansson H., Håkansson A.P. Monitoring changes in membrane polarity, membrane integrity, and intracellular ion concentrations in *Streptococcus pneumoniae* using fluorescent dyes // J. Vis. Exp. - 2014. - V. 17(84). - P. e51008.
- Cohen M.F., Meeks J.C., Cai Y.A., Wolk C.P. Transposon mutagenesis of heterocyst-forming filamentous cyanobacteria // Methods Enzymol. - 1998. - V. 297. - P. 3-17.

- Cohen, S.A. Analytical techniques for the detection of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid // *Analyst*. - 2012. - V. 137. - P. 1991–2005.
- Coleman J., Blake-Kalff M., Davies E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation // *Trends in Plant Science*. - 1997. - V. 2(4). - P. 144–151.
- Contardo-Jara V., Schwanemann T., Pflugmacher S. Uptake of a cyanotoxin, β -N-methylamino-L-alanine, by wheat (*Triticum aestivum*) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2014. - V. 104. P. 127-131.
- Cook R.J., Tomashow L.S., Weller D.M., et al. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1995. - V. 92. - P. 4197-4201.
- Coosemans J., Dimethyl disulphide (DMDS): a potential novel nematicide and soil disinfectant // *ISHS Acta Hort*. 2005. V. 698. P. 57-63.
- Corbell N.A., Loper J.E. A global regulator of second metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 // *J. Bacteriol.* - 1995. - V. 177. - P. 6230–6236.
- Coronil T., Lara C., Guerrero M.G. Shift in carbon flow and stimulation of amino-acid turnover induced by nitrate and ammonium assimilation in *Anacystis nidulans* // *Planta*. - 1993. - V. 189(3). - P. 461-467.
- Corrales-Guerrero L., Flores E., Herrero A. Relationships between the ABC-exporter HetC and peptides that regulate the spatiotemporal pattern of heterocyst distribution in *Anabaena* // *PLoS One*. - 2014. - V. 9(8). - P. e104571.
- Corrales-Guerrero L., Mariscal V., Flores E., Herrero A. Functional dissection and evidence for intercellular transfer of the heterocyst-differentiation PatS morphogen // *Mol. Microbiol.* - 2013. - V. 88(6). - P. 1093-1105.
- Cosgrove J., Borowitzka M.A. Chlorophyll fluorescence terminology: An Introduction // *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications* / edited by Sugett D., Prásil O., Borowitzka M.A. – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2010. - P. 1-17.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2003. - V. 100(23). - P. 13380-13383.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., et al. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2005. - V. 102(14). - P. 5074-5078.
- Cui Z., Zhang Y., Inoue H., Yogo S., Hirasawa E. Purification and molecular analysis of a monoamine oxidase isolated from *Narcissus tazetta* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 2013. - V. 77(8). - P. 1728-1733.

- Dahllöf I., Baillie H., Kjelleberg S. *rpoB*-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2000. - V. 66(8). - P. 3376-3380.
- Daigle F., Lerat S., Bucca G., et al. A *terD* domain-encoding gene (SCO2368) is involved in calcium homeostasis and participates in calcium regulation of a DosR-like regulon in *Streptomyces coelicolor* // *J. Bacteriol.* - 2015. - V. 197(5). - P. 913-923.
- Dainty R.H., Edwards R.A., Hibbard C.M., Marnewick J.J. Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperature. *J. Appl. Bacteriol.* - 1989. - V.66(4). - P. 281-289.
- Dandurishvili N., Toklikishvili N., Ovadis M. et al. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown-gall tumors on tomato plants // *J. Appl. Microbiol.* - 2011. - V. 110. - P. 341–352.
- Davis T.S., Crippen T.L., Hofstetter R.W., Tomberlin J.K. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals // *J. Chem. Ecol.* - 2013. - V. 39. - P. 840–859.
- Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y., et al. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor // *Protein Expr. Purif.* - 2006. - V. 47. - P. 551–561.
- Dickschat J.S., Martens R., BrinkhoV.T., Simon M., Schulz S. Volatiles released by a *Streptomyces* species isolated from the North Sea // *Chem. Biodivers.* - 2005. - V. 2. - P. 837–865.
- Dirinck P.J., De Pooter H.L., Willaert G.A., Schamp N. M. Flavor quality of cultivated strawberries: the role of the sulfur compounds // *J. Agric. Food Chem.* - 1981. - V. 29. - P. 316-321.
- Dong Y., Huang X., Wu X.Y., Zhao J. Identification of the active site of HetR protease and its requirement for heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 2000 - V. 182(6). - P. 1575-1579.
- Downing S., Banack S.A., Metcalf J.S., Cox P.A., Downing T.G. Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of β -N-methylamino-L-alanine // *Toxicon.* - 2011. - V. 58(2). - P. 187-194.
- Downing S., Contardo-Jara V., Pflugmacher S., Downing T.G. The fate of the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine in freshwater mussels // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2014. - V.101. - P. 51-58.

- Downing S., Esterhuizen-Londt M., Downing T. G. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) metabolism in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2015. - V. 120. - P. 88-92.
- Downing S., van de Venter M., Downing T.G. The effect of exogenous β -N-methylamino-L-alanine on the growth of *Synechocystis* PCC6803 // *Microb. Ecol.* - 2012. - V. 63(1). - P.149-156.
- Downing S., Downing T.G. The metabolism of the non-proteinogenic amino acid β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 // *Toxicon.* - 2016. - V. 115. - P. 41-48.
- Downing T.G., Phelan R.R., Downing S. A potential physiological role for cyanotoxins in cyanobacteria of arid environments // *J. Arid Environ.* - 2015. - V. 112. - P. 147-151
- Du Y., Cai Y., Hou S., Xu X. Identification of the HetR recognition sequence upstream of *hetZ* in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 2012. - V. 194(9). - P. 2297-2306.
- Duncan M.W., Villacreses N.E., Pearson P.G., et al. 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1991. - V. 258(1). - P. 27-35.
- Dunlop R.A., Cox P.A., Banack S.A., Rodgers K.J. The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation // *PLoS One.* - 2013. - V. 8(9). - P.e75376.
- Dugravot S., Grolleau F., Macherel D., et al. Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect $K_{(ATP)}$ channels // *J. Neurophysiol.* - 2003. - V. 90(1). - P. 259-270.
- Effmert U., Kalderás J., Warnke R., Piechulla B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil // *J. Chem. Ecol.* - 2012. - V. 38(6). - P. 665-703.
- Elhai J., Vepritskiy A., Muro-Pastor A.M., Flores E., Wolk C.P. Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 1997. - V. 179(6). - P. 1998-2005.
- Elhai J., Wolk C. P. A versatile class of positive selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers // *Gene.* -1988. - V.68. - P. 119–138.
- Ehira S., Ohmori M. NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* - 2006a. - V. 59(6). - P. 1692-1703.

- Ehira S., Ohmori M. NrrA directly regulates expression of *hetR* during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 2006b. - V. 188(24). - P. 8520-8525.
- Esterhuizen M., Downing T.G. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2008. - V. 71(2). - P. 309-313.
- Esterhuizen M., Pflugmacher S., Downing T.G. β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011. - V.74(1). - P. 74-77.
- Esterhuizen-Londt M., Pflugmacher S., Downing T.G. The effect of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum* // *Toxicon.* - 2011. - V. 57(5). - P. 803-810.
- Etschmann M.M.W., Bluemke W., Sell D., Schrader J. Biotechnological production of 2-phenylethanol // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2002. - V. 59. - P. 1–8.
- Faassen E.J. Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: what do we really know? // *Toxins.* - 2014. - V. 6(3). - P. 1109-1138.
- Faassen E.J., Gillissen F., Lurling M. A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria // *PLoS One.* - 2012. - V. 7(5). - P. e.36667.
- Faassen E.J., Gillissen F., Zweers H.A.J., Lüring M. Determination of the neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (α -, γ -diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms // *Amyotroph. Lateral Scler.* - 2009. - V.10. - P. 79–84.
- Fadi Aldehni M., Sauer J., Spielhauer C., Schmid R., Forchhammer K. Signal transduction protein P(II) is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 // *J. Bacteriol.* - 2003. - V. 185(8). - P. 2582-2591.
- Farmer E.E. Surface-to-air signals // *Nature.* - 2001. - V. 411. - P. 854–856.
- Farag M.A., Pare P.W. C6-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato // *Phytochemistry.* - 2002. - V. 61. - P. 545–554.
- Farag M.A., Ryu C.M., Summer L.W., Pare P.W. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants // *Phytochemistry.* - 2006. - V. 67. - P. 2262-2268.
- Feldmann E.A., Ni S., Sahu I.D., et al.. Evidence for direct binding between HetR from *Anabaena* sp. PCC 7120 and PatS-5 // *Biochemistry.* - 2011. - V.50(43). - P. 9212-9224.

- Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A.S., Savchuk S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles // *Soil Biol. Biochem.* - 2005. - V. 37. - P. 955–964.
- Flavier A.B., Schell M.A., Denny T.P. An RpoS (CT^s) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum* // *Mol. Microbiol.* - 1998. - V. 28. - P. 475-486.
- Flores E., Herrero A. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria // *Biochem. Soc. Trans.* - 2005. - V. 33(1). - P. 164-167.
- Flores E., Herrero A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2010. - V. 8(1). - P. 39-50.
- Forchhammer K. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2004. - V. 28(3). - P.319-333.
- Franklin D. J., Brussaard C.P.D., Berges, J. A. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? // *Eur. J. Phycol.* - 2006. - V. 41. - P. 1-14.
- Freeman J., Rideout S., Wimer A. Dimethyl disulfide use for bacterial wilt management and weed control in *Virginia tomatoes* // *Hort Science.* - 2009. - V. 44. - P. 571.
- Freire P., Moreira R.N., Arraiano C.M. BolA inhibits cell elongation and regulates MreB expression levels // *J. Mol. Biol.* - 2009. - V. 385(5). - P.1345-1351.
- Frías J.E., Flores E., Herrero A. Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 14(4). P. 823-832.
- Frías J.E., Flores E., Herrero A. Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 1997. - V. 179(2). - P. 477-486.
- Frías J.E., Flores E., Herrero A. Activation of the *Anabaena nir* operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors // *Mol. Microbiol.* - 2000. - V. 38(3). - P. 613-625.
- Frías J.E., Herrero A., Flores E. Open reading frame all0601 from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 represents a novel gene, *cnaT*, required for expression of the nitrate assimilation *nir* operon // *J. Bacteriol.* - 2003. - V. 185(17). - P. 5037-5044.
- Futsaether C.M., Johnsson A. Using fura-2 to measure intracellular free calcium in *Propionibacterium acnes* // *Can. J. Microbiol.* - 1994. - V. 40. - P. 439-445.
- Iyer L.M., Babu M.M., Aravind L. The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA // *Cell Cycle.* - 2006. - V. 5(7). - P. 775-782.

- Gangola P., Rosen B. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. - 1987. - V. 262. - P. 12570–12574.
- García-Domínguez M., Reyes J.C., Florencio F.J. Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - V. 96(13). - P. 7161-7166.
- García-Domínguez M., Reyes J.C., Florencio F.J. NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Mol. Microbiol. - 2000. - V. 35(5). - P. 1192-1201.
- Gelvin S.B. Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome // Front Plant Sci. - 2012. - V. 3. - P. 52.
- Gershenzon J., Kreis W. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins // Biochemistry of plant secondary metabolism, annual plant reviews / edited by Wink M. – Sheffield: Academic, 1999. – P. 222–280.
- Girard G., Bloemberg G. V. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa* // Future Microbiol. - 2008. - V. 3(1). - P. 97-106.
- Glick B. R. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria // Imperial College Press, London. - 1999. - P. 1–13.
- Glover W.B., Liberto C.M., McNeil W.S., Banack S.A., Shipley P.R., Murch S.J. Reactivity of β -methylamino-L-alanine in complex sample matrixes complicating detection and quantification by mass spectrometry // Anal. Chem. - 2012. - V. 84(18). - P. 7946-7953
- Glover W.B., Mash D.C., Murch S.J. The natural non-protein amino acid N- β -methylamino-L-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis // Amino Acids. - 2014. - V. 46. - P. 2553-2559.
- González A., Bes M.T., Valladares A., Peleato M.L., Fillat M.F. FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120 // Environ. Microbiol. - 2012. - V. 14(12). - P. 3175-3187.
- González A., Valladares A., Peleato M.L., Fillat M.F. FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120 // FEBS Lett. - 2013. - V. 587(16). - P. 2682-2690.
- Goto J.J., Koenig J.H., Ikeda K. The physiological effect of ingested β -N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an *in vivo* preparation // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. - 2012. - V. 156(3-4). - P. 171-177.
- Gramatikova S.I., Christen P. Pyridoxal 5'-phosphate-dependent catalytic antibody // J. Biol. Chem. - 1996. - V. 271(48). - P. 30583-30586.

- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem. - 1985. - V. 260(6). - P. 3440-3450.
- Gubisne-Haberle D., Hill W., Kazachkov M., Richardson J.S., Yu P.H. Protein cross-linkage induced by formaldehyde derived from semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination of methylamine // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2004. - V. 310(3). - P. 1125-1132.
- Guengerich F.P. Metabolic activation of carcinogens // Pharmacol. Ther. - 1992. - V. 54. - P. 17-61.
- Guo T., Geis S., Hedman C., Arndt M., Krick W., Sonzogni W. Characterization of ethyl chloroformate derivative of beta-methylamino-L-alanine // J. Am. Soc. Mass. Spectr. - 2007. - V. 18. - P. 817-825.
- Gupta A.M., Gopal K.V.B., Tilak R. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria // Ind. J. Exp. Biol. - 2000. - V. 38. - P. 856-862.
- Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T., Chater K.F. PCR targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. - V. 100. - P. 1541-1546.
- Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by *Xuorescent pseudomonads* // Nat. Rev. Microbiol. - 2005. - V. 10. - P. 1-13.
- Hadar Y., Harman G. E., Taylor A. G., Norton J. M. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. // Phytopathology. - 1983. - V. 73. - P. 1322-1325.
- Handelsman J., Stabb E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens // Plant Cell. 1996. - V. 8. - P. 1855-1869.
- Harada K., Ozaki K., Tsuzuki S., et al. Blue color formation of cyanobacteria with β -cyclocitral // J. Chem. Ecol. - 2009. - V. 35. - P. 1295-1301.
- Hebbar P.B., Curtis S.E. Characterization of *devH*, a gene encoding a putative DNA binding protein required for heterocyst function in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. 2000. - V. 182(12). - P. 3572-3581.
- Henson B.J., Hartman L., Watson L.E., Barnum S.R. Evolution and variation of the *nifD* and *hupL* elements in the heterocystous cyanobacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2011. - V.61(12). - P. 2938-2949.
- Hernández J.A., Bes M.T., Fillat M.F., Neira J.L., Peleato M.L. Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state // Biochem. J. - 2002. - V. 366(1). - P. 315-322.

- Hernández J.A., López-Gomollón S., Bes M.T., Fillat M.F., Peleato M.L. Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC 7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition // FEMS Microbiol. Lett. - 2004. - V. 236(2). - P. 275-282.
- Hernández J.A., Muro-Pastor A.M., Flores E., Bes M.T., Peleato M.L., Fillat M.F. Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // J. Mol. Biol. - 2006. - V. 355(3). - P. 325-334.
- Herrero A., Muro-Pastor A.M., Valladares A., Flores E. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria // FEMS Microbiol. Rev. - 2004. - V.28(4). - P. 469-487.
- Higa K.C., Callahan S.M. Ectopic expression of *hetP* can partially bypass the need for *hetR* in heterocyst differentiation by *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // Mol. Microbiol. - 2010. - V. 77(3). - P. 562-574.
- Higa K.C., Rajagopalan R., Risser D.D., et al. The RGSGR amino acid motif of the intercellular signalling protein, HetN, is required for patterning of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // Mol. Microbiol. - 2012. - V. 83(4). - P.682-693.
- Hirasawa M., Rubio L.M., Griffin J.L., et al. Complex formation between ferredoxin and *Synechococcus* ferredoxin: nitrate oxidoreductase // Biochim. Biophys. Acta. - 2004. - V. 1608(2-3). - P.155-162.
- Hu B., Yang G., Zhao W., Zhang Y., Zhao J. MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // Mol. Microbiol. - 2007. - V. 63(6). - P. 1640-1652.
- Huang X., Dong Y., Zhao J. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004. - V. 101(14). - P.4848-4853.
- Huang F., Miller J.R., Chen S.C., Vulule J.M., Walker E.D. *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) oviposition in response to agarose media and cultured bacterial volatiles // J. Med. Entomol. - 2006. - V.43 (3). - P. 498-504.
- Inamdar A. A., Masurekar P., Bennett J. W. Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster* // Toxicol. Sci. - 2010. - V. 117. - P. 418-426.
- Inamdar A. A., Zaman T., Morath S. U., et al. *Drosophila melanogaster* as a model to characterize fungal volatile organic compounds // Environ. Toxicol. - 2014. - V. 29(7). - P. 829-836.
- Jepson B.J., Anderson L.J., Rubio L.M., et al. Tuning a nitrate reductase for function. The first spectropotentiometric characterization of a bacterial assimilatory nitrate reductase reveals novel redox properties // J. Biol. Chem. - 2004. - V. 279(31). - P. 32212-32218.

- Jiang Q., Qin S., Wu Q. Analysis of metacaspases in unicellular and filamentous cyanobacteria // BMC Genomics. - 2010. - V. 11. - P. 1-11.
- Jiang L., Aigret B., De Borggraeve W.M., Spacil Z., Ilag L.L. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples // Anal. Bioanal. Chem. - 2012. - V. 403(6). - P. 1719-1730.
- Jiang L., Johnston E., Aberg K.M., Nilsson U., Ilag L.L. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS // Anal. Bioanal. Chem. - 2013. - V. 405. - P. 1283–1292.
- Jiang L., Eriksson J., Lage S., et al. Diatoms: a novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic environments // PLoS One. - 2014. - V. 9(1). - P. e84578.
- Johnson H.E., King S.R., Banack S.A., et al. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA // J. Ethnopharmacol. - 2008. - V. 118(1). - P. 159-165.
- Jonasson S., Eriksson J., Berntzon L., et al. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2010. - V. 107(20). - P. 9252-9257.
- Kai M., Effmert U., Berg G., Piechulla B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani* // Arch. Microbiol. - 2007. - V. 187. - P. 351-360.
- Kai M., Hausteiner M., Molina F., et al. Bacterial volatiles and their action potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2009. - V. 81. - P. 1001-1012.
- Kang J., Mehta S., Turano F.J. The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss // Plant Cell Physiol. - 2004. - V. 45(10). - P. 1380–1389.
- Karlsson O., Bergquist J., Andersson M. Quality measures of imaging mass spectrometry aids in revealing long-term striatal protein changes induced by neonatal exposure to the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) // Mol. Cell Proteom. - 2014. - V. 13. - P. 93-104.
- Karlsson O., Berg A.L., Lindström A.K., et al. Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces changes in protein expression and neurodegeneration in adult hippocampus // Toxicol. Sci. - 2012. - V. 130(2). - P. 391-404.
- Khan S. R., Herman J., Krank J., et al. *N*-(3-Hydroxyhexanoyl)-L-homoserine lactone is the biologically relevant quorumone that regulates the *phz* operon of *Pseudomonas chlororaphis* strain 30-84 // Appl. Environ. Microbiol. - 2007. - V. 73(22). - P. 7443-7455.

- Khmel I.A., Sorokina T.A., Lemanova N.B., et al. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity // *Biocontrol Science and Technology*. - 1998. - V. 8. - P. 45-57.
- Khudyakov I., Wolk C.P. *hetC*, a gene coding for a protein similar to bacterial ABC protein exporters, is involved in early regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 1997. - V. 179(22). - P. 6971-6978.
- Kloepper J. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2003. - V. 100. - P. 4927-4932.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M. N. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils // *Nature*. - 1980. - V. 286. - P. 885–886.
- Kloepper J.W., Rodriguez-Kabana R., Zehnder G.W., et al. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases // *Aust. J. Plant. Pathol.* - 1999. - V. 28. - P. 27–33.
- Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping E.M., Lifshitz R. *The Rhizosphere and Plant Growth* / edited by Keister K. L., Cregan, P. B. - Dordrecht, Netherlands: Kluwer, 1991. - P. 315-326.
- Kojic M., Degrassi G., Venturi V. Cloning and characterization of the *rpoS* gene from plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358: RpoS is not involved in siderophore and homoserine lactone production // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1999. - V. 1489. - P. 413-420.
- Koksharova O., Schubert M., Shestakov S., Cerff R. Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Plant Mol. Biol.* - 1998. - V. 36(1). - P. 183-194.
- Koksharova O.A., Klint J., Rasmussen U. Comparative proteomics of cell division mutants and wild-type of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 // *Microbiology*. - 2007. - V. 153(8). - P. 2505-2517.
- Koksharova O.A., Wolk C.P. A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division // *J. Bacteriol.* - 2002. - V. 184(19). - P. 5524-5524.
- Kosinski J., Feder M., Bujnicki J.M. The PD-(D/E)XK superfamily revisited: identification of new members among proteins involved in DNA metabolism and functional predictions for domains of (hitherto) unknown function // *BMC Bioinformatics*. - 2005. - V. 12(6). - P. 172.
- Kovach M. E., Elzer P. H., Hill D. S., et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes // *Gene*. - 1995. - V. 166. - P. 175-176.

- Kvenvolden K.A., Lawless J.G., Ponnamperna C. Nonprotein amino acids in the murchison meteorite // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1971. - V. 68(2). - P. 486-490.
- Kumar K., Mella-Herrera R. A., Golden J. W. Cyanobacterial heterocysts // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. - 2010. - V. 2 (4). - P. a000315
- Kurze S., Bahl H., Dahl R., Berg G. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48 // Plant. Dis. - 2001. - V. 85. - P. 529-534.
- Kurita-Ochiai T., Fukushima K., Ochiai K. Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production // J. Dent. Res. - 1995. - V. 74. - P. 1367-1373.
- Kyung K.H., Lee YC. Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica* // Food Rev. Int. - 2001. - V. 17. - P. 183-198.
- Lage S., Burian A., Rasmussen, U., et al. BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose? // Environ Sci. Pollut. Res. Int. - 2016. - V. 23. - P. 338–350.
- Lage S., Costa P.R., Moita T., et al. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source // Aquat. Toxicol. - 2014. - V. 152C. - P. 131–138.
- Lee H.M., Flores E., Herrero A, Houmard J., Tandeau de Marsac N. A role for the signal transduction protein PII in the control of nitrate/nitrite uptake in a cyanobacterium // FEBS Lett. - 1998. - V. 427(2). - P. 291-295.
- Leeman M., den Ouden F.M., van Pelt J.A., et al. Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens* // Phytopathology. - 1996. - V. 86. - P. 149-155.
- Li B., Huang X., Zhao J. Expression of *hetN* during heterocyst differentiation and its inhibition of *hetR* up-regulation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // FEBS Lett. - 2002. - V. 517(1-3). - P. 87-91.
- Liang J., Scappino L., Haselkorn R. The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120 // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1992. - V. 89(12). - P. 5655-5659.
- Lin W., Okon Y., Hardy, R. W. F. Enhanced Mineral Uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* Roots Inoculated with *Azospirillum brasilense* // Appl. Environ. Microbiol. -1983. - V. 45. - P. 1775-1779.
- Lipasova V.A., Atamova E.E., Veselova M. A. , Tarasova N. N., Khmel I. A. . Expression of gene for *N*-acyl-homoserine lactonase *AiiA* affects properties of rhizospheric strain *Pseudomonas chlororaphis* 449 // Russ. J. Genetics. - 2009. - V. 45(1). - P. 30-34.

- Liu Y., Golden S.S., Kondo T. Ishiura M., Johnson C.H. Bacterial luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria // *J. Bacteriol.* - 1995. - V. 177. - P. 2080–2086.
- Liu X., Rush T., Zapata J., Lobner D. β -N-methylamino-l-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc⁻ // *Exp. Neurol.* - 2009. - V. 217. - P. 429-433.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* - 2001. - V. 25(4). - P. 402-408.
- López-Gomollón S., Hernández J.A., Wolk C.P., Peleato M.L., Fillat M.F. Expression of *furA* is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Microbiology.* - 2007. - V. 153(1). - P. 42-50.
- López-Gomollón S., Sevilla E., Bes M.T., Peleato M.L., Fillat M.F. New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress // *Biochem. J.* - 2009. - V. 418(1). - P. 201-207.
- Loper J. E., Schroth, M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet // *Phytopathology.* - 1986. - V. 76. - P. 386-389.
- Lucchini J.J., Bonnavero N., Cremieux A., le GoYc F. Mechanism of bactericidal action of phenylethyl alcohol in *Escherichia coli* // *Curr. Microbiol.* - 1993. - V. 27. - P. 295–300.
- Luo C.S., Liang J.R., Lin Q., et al. Genome-wide comparative cellular responses associated with ROS production and cell fate decision in early stress response to iron limitation in the diatom *Thalassiosira pseudonana*, // *J. Proteome Res.* - 2014. - V. 13(12). - P. 5510-5523.
- Luque I., Flores E., Herrero A. Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases // *Plant Mol. Biol.* - 1993. - V. 21(6). - P. 1201-1205.
- Luque I., Flores E., Herrero A. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria // *EMBO J.* - 1994. - V. 13(12). - P. 2862-2869.
- Luque I., Vázquez-Bermúdez M.F., Paz-Yepes J., Flores E., Herrero A. *In vivo* activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2004. - V. 236(1). - P. 47-52.
- MacDonald E.M.S., Powell G.K., Regier D.A., Glass N.L., Roberto F., Kosuge T., Morris R.O. Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin, and Ribosyl-1"-Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*: Plasmid-Coded Cytokinin Biosynthesis. // *Plant Physiol.* - 1986. - V. 82. - P. 742-747.

- MacKay C., Déclais A.C., Lundin C., et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2 // *Cell*. - 2010. - V. 142(1). - P. 65-76.
- Mackie A.E., Wheatley R.E. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates // *Soil Biol. Biochem.* - 1999. - V. 31. - P. 375-385.
- Malinverni J.C., Silhavy T.J. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2009. - V. 106(19). - P. 8009-8014.
- Marler T.E., Snyder L.R., Shaw C.A. *Cycas micronesica* (Cycadales) plants devoid of endophytic cyanobacteria increase in β -methylamino-L-alanine // *Toxicon*. - 2010. - V. 56(4). - P. 563-568.
- Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Metraux J.P., Defago G. Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* CHA0: influence of the *gacA* gene of pyoverdine production // *Phytopathology*. - 1994. - V. 84. - P. 139-146.
- Mavrodi D.V., Ksenzenko V.N., Bonsall R.F., et al. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 // *J. Bacteriol.* - 1998. - V. 180. - P. 2541–2548.
- Mayrhofer S., Mikoviny T., Waldhuber S., et al. Microbial community related to volatile organic compound (VOC) emission in household biowaste // *Environ. Microbiol.* - 2006. - V. 8. - P. 1960-1974.
- McCain A.H. A volatile antibiotic by *Streptomyces griseus* // *Phytopathology*. - 1966. - V. 56. - P. 150.
- McClellan K., Winson M., Fish L., et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*, exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // *Microbiology*. - 1997. - V. 143. - P. 3703-3711.
- McNeal K.S., Herbert B.E. Volatile organic metabolites as indicators of soil microbial activity and community composition shifts // *Soil Sci. Soc. Am. J.* - 2009. - V. 73. - P. 579-588.
- Mengin-Lecreux D., van Heijenoort J., Park J.T. Identification of the *mpl* gene encoding UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan // *J. Bacteriol.* - 1996. - V. 178(18). - P. 5347-5352.

- Mérida A., Candau P., Florencio F.J. Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium // *J. Bacteriol.* - 1991. - V. 173(13). - P. 4095-4100.
- Metcalf J.S., Banack S.A., Lindsay J., et al. Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004 // *Environ. Microbiol.* - 2008. - V. 10(3). - P. 702-708.
- Miller M. B., Bassler B. L. Quorum sensing in bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* - 2001. - V. 55. - P. 165-199.
- Minerdi D., Bossi S., Gullino M.L., Garibalidi A. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35 // *Environ. Microbiol.* - 2008. - V. 11. - P. 844-854.
- Mondo K., Broc Glover W., Murch S.J., et al. Environmental neurotoxins beta-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements // *Food Chem. Toxicol.* - 2014. - V. 70. - P. 26-32.
- Montesinos M.L., Herrero A., Flores E. Amino acid transport systems required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 1995. - V. 177(11). - P. 3150-3157.
- Montesinos M.L., Muro-Pastor A.M., Herrero A., Flores E. Ammonium/methylammonium permeases of a Cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273(47). - P. 31463-31470.
- Moura S., de Almeida Ultramari M., Mendes Louzada de Paula D., Yonamine M., Pinto E. ¹H NMR determination of β-N-methylamino-l-alanine (l-BMAA) in environmental and biological samples // *Toxicon.* - 2009. - V. 53(5). - P. 578-583.
- Muller H., Westendorf C., Leitner E., et al. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48 // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2008. - V. 67(3). - P. 468-478.
- Mullineaux C.W., Allen J.F. The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool // *FEBS.* - 1986. - V. 205(1). - P. 155-160.
- Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2004. - V. 101(33). - P. 12228-12231.
- Muro-Pastor A.M., Hess W.R. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches // *Trends Microbiol.* - 2012. - V. 20(11). - P. 548-557.

- Muro-Pastor A.M., Olmedo-Verd E., Flores E. All4312, an NtcA-regulated two-component response regulator in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // FEMS Microbiol. Lett. - 2006. - V. 256(1). - P. 171-177.
- Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., Florencio F.J. Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276(41). - P. 38320-38328.
- Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., Florencio F.J. Ammonium assimilation in cyanobacteria // Photosynth. Res. - 2005. - V. 83(2). - P. 135-150.
- Myers T.G., Nelson S.D. Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by ¹³C NMR // J. Biol. Chem. - 1990. - V. 265(18). - P.10193-10195.
- Nakamura I., Nakai Y., Izumi H. Use of fura-2/AM to measure intracellular free calcium in *Selenomonas ruminantium* // Tohoku J. Exp. Med. - 1996. - V. 179(4). - P.291-294.
- Narayan O.P., Kumari N., Rai L.C. Iron starvation-induced proteomic changes in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: exploring survival strategy // J. Microbiol. Biotechnol. - 2011. - V. 21(2). - P. 136-146.
- Nelson E.B. Biological control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off of cotton with *Enterobacter cloacae* and *Erwinia herbicola* applied as seed treatments // Plant Dis. - 1988. - V. 72. - P. 140-142.
- Neunuebel M.R., Golden J.W. The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene all2874 encodes a diguanylate cyclase and is required for normal heterocyst development under high-light growth conditions // J. Bacteriol. - 2008. - V. 190(20). - P.6829-6836.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2003. - V. 67(4). - P. 593–656.
- Nikaido H. Restoring permeability barrier function to outer membrane // Chem. Biol. - 2005. - V. 12(5). - P. 507-509.
- Niu Q., Huang X., Zhang L., et al., A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2010. -V. 107. - P. 16631–16636.
- Nunn P.B. Three phases of research on beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA)-a neurotoxic amino acid // Amyotroph. Lateral. Scler. - 2009. - V. 10(2). - P. 26-33.
- Nunn P.B., O'Brien P. The interaction of beta-N-methylamino-L-alanine with bicarbonate: an ¹H-NMR study // FEBS Lett. - 1989. - V. 251(1-2). - P. 31-35.
- Nunn P.B., O'Brien P., Pettit L.D., Pyburn S.I. Complexes of zinc, copper, and nickel with the nonprotein amino acid L-alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid: a naturally occurring neurotoxin // J. Inorg. Biochem. - 1989. - V. 37(2). - P. 175-183.

- Nunn P.B., Ponnusamy M. Beta-N-methylaminoalanine (BMAA): metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat *in vitro* // *Toxicol.* 2009. - V. 54(2). - P. 85-94.
- Okamoto O. K., Hastings J.W. Genome-wide analysis of redox-regulated genes in a dinoflagellate // *Gene.* - 2003. - V. 321. - P. 73-81.
- Okle O., Stemmer K., Deschl U., Dietrich D.R. L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations // *Toxicol. Sci.* - 2013a. - V. 131(1). - P. 217-224.
- Okle O., Rath L., Galizia C.G., Dietrich D.R. The cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) induces neuronal and behavioral changes in honeybees // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2013b. - V. 270(1). - P. 9-15.
- Olmedo-Verd E., Muro-Pastor A.M., Flores E., Herrero A. Localized induction of the *ntcA* regulatory gene in developing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 2006. - V. 188(18). - P. 6694-6699.
- Omata T., Andriessse X., Hirano A. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 // *Mol. Gen. Genet.* - 1993. - V. 236(2-3). - P. 193-202.
- van Onselen R., Cook N.A., Phelan R.R., Downing T.G. Bacteria do not incorporate β -N-methylamino-l-alanine into their proteins // *Toxicol.* - 2015. - V. 102. - P. 55-61.
- Ovadis M., Liu X., Gavriel S., et al. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies // *J. Bacteriol.* - 2004. - V. 186. - P. 4986-4993.
- Ozaki K., Ohta A., Iwata C., et al. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds // *Chemosphere.* - 2008. - V. 71. - P.1531-1538.
- Pan M., Mabry T.J., Cao P., Moini M. Identification of nonprotein amino acids from cycad seeds as N-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives by positive chemical-ionization gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* - 1997. - V. 787(1-2). - P. 288-294.
- Pare P.W., Tumlinson J.H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores // *Plant Physiol.* - 1999. - V. 121. - P. 325-331.
- Paz-Yepes J., Flores E., Herrero A. Transcriptional effects of the signal transduction protein P(II) (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942 // *FEBS Lett.* - 2003. - V. 543(1-3). - P. 42-46.
- Percival F.W., Purves W.K. Multiple amine oxidases in cucumber seedlings // *Plant Physiol.* - 1974. - V. 54(4). - P. 601-607.

- Pernil R., Picossi S., Mariscal V., Herrero A., Flores E. ABC-type amino acid uptake transporters Bgt and N-II of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 share an ATPase subunit and are expressed in vegetative cells and heterocysts // *Mol. Microbiol.* - 2008. - V. 67(5). - P.1067-1080.
- Perry C., Sastry R., Nasrallah I.M., Stover P.J. Mimosine attenuates serine hydroxymethyltransferase transcription by chelating zinc. Implications for inhibition of DNA replication // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280(1). - P. 396-400.
- Pessi G., Haas D. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* - 2000. - V. 182. - P. 6940-6949.
- Peuthert A., Chakrabarti S., Pflugmacher S. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation) // *Environ. Toxicol.* - 2007. - V. 22(4). - P. 436-442.
- Pflugmacher S., Wiegand C., Oberem, A., et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1998. - V. 1425(3). - P. 527-533.
- Picossi S., Montesinos M.L., Pernil R., et al. ABC-type neutral amino acid permease N-I is required for optimal diazotrophic growth and is repressed in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* - 2005. - V. 57(6). - P. 1582-1592.
- Piechulla B., Pott M.B. Plant scents-mediator of inter- and intraorganismic communication // *Planta.* - 2003. - V. 217. - P. 687-689.
- Pierson L.S., Thomashow L.S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 // *Mol. Plant-Microbe Interact.* - 1992. - V. 5. - P. 330-339.
- Pierson III L.S., Wood D.W., Pierson E.A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.* - 1998. - V. 36. - P. 207-225.
- Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Ton J., Van Pelt J.A., Van Loon L.C. Signaling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Biol.* - 2002. - V. 4. - P. 535-544.
- Pinto F., Pacheco C.C., Ferreira D., Moradas-Ferreira P., Tamagnini P. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria // *PLoS One.* - 2012. - V. 7(4). - P.e34983.
- Plato C.C., Garruto R.M., Galasko D., et al. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years // *Am. J. Epidemiol.* - 2003. - V. 157(2). - P. 149-157.

- Ponnusamy L., Yxu N., Nojima S., Wesson D.M. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2008. - V. 105. - P. 9262-9267.
- Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., et al. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster* // Biomed. Res. Int. - 2014. - V. 2014. - P. 125704.
- Purdie E.L., Metcalf J.S., Kashmiri S., Codd G.A. Toxicity of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine to three aquatic animal species // Amyotroph. Lateral. Scler. - 2009. - V. 10 (2). - P. 67-70.
- Purdie E.L., Samsudin S., Eddy F.B., Codd G.A. Effects of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*) // Aquat. Toxicol. - 2009. - V. 95(4). - P. 279-284.
- Quintero M.J., Montesinos M.L., Herrero A., Flores E. Identification of genes encoding amino acid permeases by inactivation of selected ORFs from the *Synechocystis* genomic sequence // Genome Res. 2001. - V. 11(12). - P. 2034-40.
- Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2002. - V. 81. - P. 537-547.
- Rajagopalan R., Callahan S.M. Temporal and spatial regulation of the four transcription start sites of *hetR* from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. - 2010. - V. 192(4). - P. 1088-1096.
- Ramos J. L., Guerrero M. G. Involvement of ammonium metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain ATCC 33047 // Arch. Microbiol. - 1983. - V. 36. - P. 81- 83.
- Ramos H.C., Hoffmann T., Marino M., et al. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression // J. Bacteriol. - 2000. - V. 182. - P. 3072-3080.
- Rao S.D., Banack S.A., Cox P.A., Weiss J.H. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation // Exp. Neurol. - 2006. - V. 201(1). - P. 244-252.
- Rasmann S., Köllner T.G., Degenhardt J., et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots // Nature. - 2005. - V. 434(7034). - P. 732-737.
- Raupach G.S., Kloepper J.W. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation // Plant Dis. - 2000. - V. 84. - P. 1073-1075.

- Reimann C., Beyeler M., Latin A., et al. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homo-serine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase // *Mol. Microbiol.* - 1997. - V. 24. - P. 309-319.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria // *J. Gen. Microbiol.* - 1979. - V. 111. - P. 1-61.
- Risser D.D., Callahan S.M. HetF and PatA control levels of HetR in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* - 2008. - V. 190(23). - P. 7645-7654.
- Risser D.D., Callahan S.M. Genetic and cytological evidence that heterocyst patterning is regulated by inhibitor gradients that promote activator decay // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2009. - V. 106(47). - P. 19884-19888.
- Rodgers K.J. Non-protein amino acids and neurodegeneration: the enemy within // *Exp. Neurol.* - 2014. - V. 253. - P. 192-196.
- Rogerson A. C. Modifiers of heterocyst repression and spacing and formation of heterocysts without nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // *J. Bacteriol.* - 1979. - V. 140. - P. 213-219.
- Rosen J., Hellenäs K.E. Determination of the neurotoxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry) // *Analyst.* - 2008. - V. 133. - P. 1785-1789.
- Rubio L.M., Flores E., Herrero A. The *narA* locus of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 consists of a cluster of molybdopterin biosynthesis genes // *J. Bacteriol.* - 1998. - V. 180(5). - P. 1200-1206.
- Rubio L.M., Flores E., Herrero A. Molybdopterin guanine dinucleotide cofactor in *Synechococcus* sp. nitrate reductase: identification of *mobA* and isolation of a putative *moeB* gene // *FEBS Lett.* - 1999. - V. 462(3). - P.358-362.
- Rubio L.M., Flores E., Herrero A. Purification, cofactor analysis, and site-directed mutagenesis of *Synechococcus* ferredoxin-nitrate reductase // *Photosynth. Res.* - 2002. - V. 72(1). - P. 13-26.
- Rubio L.M., Herrero A., Flores E. A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase // *Plant. Mol. Biol.* - 1996. - V. 4. - P.845-850.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., et al. Systemic acquired resistance // *Plant Cell.* - 1996. - V. 8. - P. 1809-1819.
- Ryan R.P., Dow J.M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria // *Microbiology.* - 2008.V. - 154(7). - P. 1845-1858.

- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. - V. 100(8). - P. 4927-4932.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. - 2004. - V. 134. - P. 1017-1026.
- Sakamoto T., Inoue-Sakamoto K., Bryant D.A. A novel nitrate/nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 // J. Bacteriol. - 1999. - V. 181(23). - P. 7363-7372.
- Salomonsson M., Hansson A., Bondesson U. Development and in-house validation of a method for quantification of BMAA in mussels using dansyl chloride derivatization and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // Anal. Methods. - 2013. - V. 5. - P. 4865–4874.
- Santos J.M., Freire P., Vicente M., Arraiano C.M. The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth // Mol. Microbiol. - 1999. - V. 32(4). - P. 789-798.
- Saxena R.K., Raghuvanshi R., Singh S., Bisen P.S. Iron induced metabolic changes in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 // Indian J. Exp. Biol. - 2006. - V. 44 (10). - P. 849-851.
- Schöller C.E.G., Gürtler H., Pedersen R., Molin S., Wilkins K. Volatile metabolites from Actinomycetes // J. Agric. Food. Chem. - 2002. - V. 50. - P. 2615–2621.
- Schöller C., Molin S., Wilkins S. Volatile metabolites from some Gram-negative bacteria // Chemosphere. – 1997. - V. 35. - P. 1487–1495.
- Schulz S., Dickschat J. S. Bacterial volatiles: the smell of small organisms // Nat. Prod. Rep. - 2007. - V. 24. - P. 814-842.
- Sciaky D., Montoya A.L., Chilton M.D. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids // Plasmid. - 1978. - V. 1. - P. 238-253.
- Seawright A.A., Brown A.W., Nolan C.C., Cavanagh J.B. Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats // Neuropathol. Appl. Neurobiol. - 1990. - V. 16(2). - P.153-169.
- Sebastiani L., Lindberg S., Vitagliano C. Cytoplasmic free calcium dynamics in single tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) protoplasts subjected to chilling temperatures // Physiol. Plant. - 1999. - V.105. - P. 239-245.
- Seewald M.S.A., Bonfanti M., Singer W., et al. Substrate induced VOC emissions from compost amended soils under aerobic and anaerobic incubation // Biol. Fertil. Soils. - 2010. - V. 46. - P. 371.

- Sengupta P., Chou J.H., Bargmann C.I. *odr-10* encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl // *Cell*. - 1996. - V. 84. - P. 578-587.
- Shaw P., Ping G., Daly S., et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1997. - V. 94. - P. 6036-6041.
- Shenker M., Fa, T.W.M., Crowley D.E. Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants // *J. Environ. Qual.* - 2001. - V. 30. - P. 2091-2098.
- Siess M.-H., Le Bon A.-M., Canivenc-Lavier M.-C., Suschetet M. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides // *Cancer Lett.* - 1997. - V. 120(2). - P. 195-201.
- Singh S.P., Montgomery B.L. Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology // *Trends Microbiol.* - 2011. - V. 19. - P. 278-285.
- Smith R.J., Hobson S., Ellis I. R. The effect of abscisic acid on calcium-mediated regulation of heterocyst frequency and nitrogenase activity in *Nostoc* 6720 // *New Phytol.* - 1987. - V. 105. - P. 543-549.
- Smolander A., Ketola R.A., Kotiaho T., Kanerva S., Suominen K., Kitunen V Volatile monoterpenes in soil atmosphere under birch and conifers: effects on soil N transformations // *Soil Biol. Biochem.* - 2006. - V. 38. - P. 3436-3442.
- Sneh B., Dupler M., Elad Y., Baker R. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium*-suppressive soil // *Phytopathology*. - 1984. - V. 74. - P.1115-1124.
- Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S.M., Dijst G. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology; pathology and disease control // Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996.
- Spáčil Z., Eriksson J., Jonasson S., et al. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples // *Analyst*. - 2009. - V. 135. - P. 127–132.
- Spencer P.S., Nunn P.B., Hugon J., et al. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin // *Science*. - 1987. - V. 237(4814). - P. 517-522.
- Stahl P.D., Parkin T.B. Microbial production of volatile organic compounds in soil microcosms // *Soil Sci. Soc. Am. J.* - 1976. - V. 60. - P. 821-828.
- Stacey G., Van Baalen C., Tabita F.R. Isolation and characterization of a marine *Anabaena* sp. capable of rapid growth on molecular nitrogen // *Arch. Microbiol.* - 1977. - V. 114. - P. 197-201.

- Steeghs M., Bais H.P., de Gouw J., et al. Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* - 2004. - V. 135. - P. 47–58.
- Stiernagle T. Maintenance of *Caenorhabditis elegans* // *WormBook.* - 2006. - V. 11. - P. 1-11.
- Stotzky G., Schenck S. Volatile organic compounds and microorganisms // *CRC Crit. Rev. Microbiol.* - 1976. - V. 4. - P. 333–382.
- Svercel M., Duffy B., Défago G. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus hcnAB in *Pseudomonas* spp. // *J. Microbiol. Methods.* - 2007. - V. 70. - P. 209-213.
- Tanigawa R., Shirokane M., Maeda S., et al. Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* - 2002. - V. 99(7). - P. 4251-4255.
- Tapia M.I., Ochoa de Alda J.A.G., Llama M.J., Serra J.L. Changes in intracellular amino acids and organic acids induced by nitrogen starvation and nitrate or ammonium resupply in the cyanobacterium *Phormidium laminosum* // *Planta.* - 1996. - V. 198. - P. 526–531.
- Tegeder M., Rentsch D. Uptake and partitioning of amino acids and peptides // *Mol. Plant.* - 2010. - V. 3(6). - P. 997-1011.
- Tegeder M. Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns // *Curr. Opin. Plant. Biol.* - 2012. - V. 15(3). - P. 315-321.
- Thamatrakoln K., Korenovska O., Niheu A.K., Bidle K.D. Whole-genome expression analysis reveals a role for death-related genes in stress acclimation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* // *Environ. Microbiol.* - 2012. - V. 14(1). - P. 67-81.
- Thiel T. Nitrogen Fixation in Heterocyst-Forming Cyanobacteria // *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria* / edited by Klipp W., Masepohl B., Gallon J. R., Newton W. E. - Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2005. - V. 2. - P. 73-111.
- Thomas J., Meeks J.C., Wolk C. P., et al. Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrical* // *J. Bacteriol.* - 1977. - V. 129. - P. 1545-1555.
- Thomas P., Delaville F. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentrations in cell populations and single cells // *Cellular calcium—a practical approach* / edited by McCormack J.G., Cobbold P.H. - Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press., 1991. - P. 1-54.
- Timmusk S., Nicander B., Granhall U., Tillberg, E. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa* // *Soil Biol. Biochem.* - 1999. - V. 31. - P. 1847-1852.

- Tisa L.S., Adler J. Cytoplasmic free-Ca²⁺ level rises with repellents and falls with attractants in *Escherichia coli* chemotaxis // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1995. - V. 92(23). - P. 10777-10781.
- Torrecilla I., Leganés F., Bonilla I., Fernández-Piñas F. Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria // Plant Physiol. - 2000. - V. 123(1). - P. 161-176.
- Torrecilla I., Leganés F., Bonilla I., Fernández-Piñas F. A calcium signal is involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // Microbiology. - 2004. - V. 150(11). - P. 3731-3739.
- Tumer N. E., Robinson S. J., Haselkorn R. Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen // Nature (London). - 1983. - V. 306. - P. 337-342.
- Uehara T., Park J.T. Peptidoglycan Recycling // EcoSal. Plus. 2008. V. 3(1). doi: 10.1128/ecosalplus.4.7.1.5.
- Valladares A., Montesinos M.L., Herrero A., Flores E. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria // Mol. Microbiol. - 2002. - V. 43(3). - P. 703-715.
- Van Loon L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins // Eur. J. Plant Pathol. - 1997. - V. 103. - P. 753-765.
- Van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium wilt* of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r // Phytopathology. - 1991. - V. 91. - P. 728-734.
- Vardi A., Eisenstadt D., Murik O., et al. Synchronization of cell death in a dinoflagellate population is mediated by an excreted thiol protease // Environ. Microbiol. - 2007. - V. - 9(2). - P. 360-369.
- Vázquez-Bermúdez M.F., Herrero A., Flores E. Uptake of 2-oxoglutarate in *Synechococcus* strains transformed with the *Escherichia coli* *kgtP* gene // J. Bacteriol. - 2000. - V. 182(1). - P. 211-215.
- Vázquez-Bermúdez M.F., Herrero A., Flores E. 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus* *glnA* promoter. - FEBS Lett. - 2002a. - V. 512(1-3). - P. 71-74.
- Vázquez-Bermúdez M.F., Paz-Yepes J., Herrero A., Flores E. The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 // Microbiology. - 2002b. - V. 148(3). - P. 861-869.

- Vega-Palas M.A., Madueño F., Herrero A., Flores E. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 // J. Bacteriol. - 1990. - V. 172(2). - P. 643-647.
- Vega-Palas M.A., Flores E., Herrero A. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators // Mol. Microbiol. - 1992. - V. 6(13). - P.1853-1859.
- Vega A., Bell E.A. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis* // Phytochemistry. - 1967. - V. 6. - P. 759–762
- Veselova M., Kholmeckaya M., Klein S., et al. Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria // Folia Microbiol. - 2003. - V. 48. - P. 794-798.
- Veselova M.A., Lipasova V.A., Astaurova O.B., et al. Quorum-sensing regulation in soil *Pseudomonas* // Microbiology. - 2006. - V. 75(4). - P. 398-400.
- Veselova M., Lipasova V., M.A. et al. GacS-dependent regulation of enzymic and antifungal activities and synthesis of N-acylhomoserine lactones in rhizospheric strain *Pseudomonas chlororaphis* 449 // Folia Microbiologica. - 2009. - V. 54(5). - P. 401-408.
- Vespermann A., Kai M., Piechulla B. Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana* // Appl. Environ. Microbiol. - 2007. - V. 73(17). - P. 5639–5641.
- Vintila S., El-Shehawy R. Ammonium ions inhibit nitrogen fixation but do not affect heterocyst frequency in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain AV1 // Microbiology. - 2007. - V. 153(11). - P. 3704-3712.
- Voisard C., Keel C., Haas D., Défago G., Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions // EMBO J. - 1989. - V. 8. - P. 351-358.
- Vranova V., Rejsek K., Skene K.R., Formanek P. Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions // Plant and Soil. - 2011. - V. 342(1). - P. 31-48.
- Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco M.J. Update on root exudation and rhizosphere biology // Plant Physiol. - 2003. - V. 132. - P. 44-51.
- Walsby A.E. Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange // Trends Microbiol. - 2007. - V. 15. - P. 340-349.
- Wang X., Ahearn D.G. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii* // Curr. Microbiol. - 1997. - V. 34. - P. 212-215.
- Wasserkort R., Koller T. Screening toxic effects of volatile organic compounds using *Drosophila melanogaster* // J. Appl. Toxicol. - 1998. - V. 17. - P. 119-125.

- Wattenberg L.W. Chemoprevention of carcinogenesis by minor non-nutrient constituents of diet // Food, Nutrition and Chemical Toxicity / Edited by Parke D.V., Ioannides C., Walker R. - London, UK: Smith-Gordon, 1993. - P. 287-300.
- Webb D.J., Burnison B.K., Trimbee A.M., Prepas E. E. Comparison of chlorophyll a extractions with ethanol and dimethyl sulfoxide/acetone, and a concern about spectrophotometric phaeopigment correction // Can. J. Fish. Aquat. Sci. - 1992. - V. 49(11). - P. 2331-2336.
- Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S. Induction of Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by Select Strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria // Phytopathology. - 1991. - V. 81. - P. 1508-1512.
- Wei T.F., Ramasubramanian T.S., Golden J.W. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene required for growth on nitrate and heterocyst development // J. Bacteriol. - 1994. - V. 176(15). - P. 4473-4482.
- Weiss J.H., Choi D.W. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor // Science. - 1988. - V. 241(4868). - P. 973-975.
- Weiss J.H., Christine C.W., Choi D.W. Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by beta-N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds // Neuron. - 1989. - V. 3(3). - P. 321-326.
- Weiss J.H., Sensi S.L. Ca^{2+} - Zn^{2+} permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration // Trends Neurosci. - 2000. - V. 23(8). - P. 365-371.
- Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B., Tomashow L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. - 2002. - V. 40. - P. 309-348.
- Wheatley R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2002. - V. 81. - P. 357-364.
- Whipps J.M. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 487-511.
- Whiteley, M., Parsek M. R., Greenberg E. P. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. - 2000. - V. 182. - P. 4356-4360.
- Wolk C.P., Austin S.M., Bortins J., Galonsky A. Autoradiographic localization of ^{13}N after fixation of ^{13}N -labeled nitrogen gas by a heterocyst-forming blue-green alga // J. Cell Biol. - 1974. - V.61(2). - P. 440-453.
- Wolk C.P., Ernst A., Elhai J. Heterocyst Metabolism and Development // The Molecular Biology of Cyanobacteria / edited by Bryant, D.A. - Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. - P. 769-823.

- Wong F.C., Meeks J.C. The *hetF* gene product is essential to heterocyst differentiation and affects HetR function in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* // J. Bacteriol. - 2001. - V. 183(8). - P. 2654-2661.
- Wood N. B., Haselkorn R. Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena* // J. Bacteriol. - 1980. - V. 141(3). - P. 1375-1385.
- Wright S.J.L., Linton C.J., Edwards R.A. Isoamyl alcohol (3-methyl-1-butanol), a volatile anti-cyanobacterial and phytotoxic product of some *Bacillus* spp. // Lett. Appl. Microbiol. - 1991. - V. 13. - P. 130-132.
- Wright S.J.L., Thompson R.J. 1985. *Bacillus* volatiles antagonize cyanobacteria. FEMS Microbiol. Lett. - 1985. - V. 30(3). - P. 263-267.
- Xie X., Basile M., Mash D.C. Cerebral uptake and protein incorporation of cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine // Neuroreport. - 2013. - V. 24(14). - P. 779-784.
- Xu X., Wolk C.P. Role for *hetC* in the transition to a non dividing state during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp // J. Bacteriol. - 2001. - V. 183(1). - P. 393-396.
- Yemelyanov V.V., Shishova M.F., Chirkova T.V. et al. // Planta. 2011. V. 234(2). P. 271-280.
- Yoon H.S., Golden J.W. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide // Science. - 1998. - V. 282(5390). - P. 935-938.
- Yoon H.S., Golden J.W. PatS and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. J. Bacteriol. - 2001. - V. 183(8). - P. 2605-2613.
- Zhang H., Kim M.-S., Krishnamachari V., et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis* // Planta. - 2007. - V. 226. -nP. 839-851.
- Zhang C.C., Laurent S., Sakr S., Peng L., Bédu S. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals // Mol. Microbiol. - 2006. - V. 59(2). - P. 367-375.
- Zhang Z., Pierson III L.S. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - V. 67. - P. 4305-4315.
- Zhang F.S., Treeby M., Römheld V., Marschner H. Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients // Plant Soil. - 1991. - V. 130. - P. 173-178.
- Zhao M.X., Jiang Y.L., He Y.X., et al. Structural basis for the allosteric control of the global transcription factor NtcA by the nitrogen starvation signal 2-oxoglutarate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2010. - V. 107(28). - P. 12487-12492.
- Zhao Y., Shi Y., Zhao W., et al. CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2005. - V. 102(16). - P. 5744-5748.

- Zhao J., Wolk C.P. Developmental Biology of Heterocysts // Myxobacteria: Multicellularity and differentiation / edited by Whitworth D.E. - Washington, DC: ASM Press, 2008. - P. 397-418.
- Zhou T., Pauliz T.C. Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber // J. Phytopathol. - 1994. - V. 142. - P. 1-63.
- Zhou R., Wei X., Jiang N., et al. Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1998. - V. 95(9). - P. 4959-4963.
- Zou C.-S., Mo M.-H., Gu Y.-Q., et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis // Soil Biol. Biochem. - 2007. - V. 39. - P. 2371-2379.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую сердечную благодарность своему научному руководителю д.б.н. Кокшаровой О.А. за всестороннюю помощь, мудрое руководство, бесценные советы, понимание и колоссальную поддержку на протяжении всех этапов диссертационной работы. Автор от всего сердца благодарит руководителя лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН проф. д.б.н. Хмель И.А. за постоянную поддержку, неоценимую помощь и оптимизм, а также сотрудников лаборатории к.б.н. Зайцеву Ю. В., к.б.н. Плюту В.А., Липасову В.А, Норкину В.А., к.б.н. Веселову М.А. за помощь, внимание и творческую атмосферу в лаборатории. За плодотворную, интересную совместную работу в дружеской обстановке, доброе отношение и помощь автор искренне благодарит сотрудников института ГосНИИгенетика проф. д.б.н. Миронова А.С., к.б.н. Еремину С.Ю., Каткову-Жукоцкую О. А. и сотрудников кафедры биофизики МГУ проф. д.б.н. Погосяна С.И., к.б.н. Воронову Е.Н., к.б.н. Конюхова И.В., Волкову Э.В. Автор выражает благодарность проф. д.б.н. Чернину Л.С. (Еврейский университет в Иерусалиме, Израиль) за осуществление хромато-масс-спектрометрического анализа, к.б.н. Кравцовой Т.Р. (Биологический факультет МГУ) за поддержку и помощь, д.б.н. Шевалю Е. В. (НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского) за обучение и помощь с микроскопией, к.х.н. Семашко Т.А. (ФНКЦ физико-химической медицины) за обучение и помощь при осуществлении ПЦР в реальном времени, Берншон Л. (Стокгольмский университет, Швеция) и к.б.н. Костиной Н.В. за помощь при измерении нитрогеназной активности, Линдберг С. (Стокгольмский университет, Швеция) и Цитриной А.А. (ИБР им. Н.К. Кольцова РАН) за помощь в проведении экспериментов с кальцием, Столяренко А. Д. (ИМГ РАН) за помощь, интерес к теме диссертации и ценные советы. Отдельную благодарность автор выражает проф. Расмуссен У. (Стокгольмский университет, Швеция) за постоянную поддержку и помощь во время работы автора в Стокгольмском университете.

Автор выражает огромную благодарность своим родителям Поповой Н.Ю. и Попову А.Б. за любовь и неоценимую помощь, а также близким Гродзенскому Ю.С., Быковой Ю.Б. и Шабынину А.А за искреннюю поддержку.