

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2016

Работа выполнена в Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Кокшарова Ольга Алексеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Романова Юлия Михайловна,

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, ведущий научный сотрудник.

кандидат биологических наук,
доцент

Бабыкин Михаил Михайлович

Международный учебно-научный биотехнологический центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, доцент.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

Защита диссертации состоится «___»_____ 2017 г. в ___ часов при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1. Тел.:+7 (495) 315-37-47. Факс: +7 (495) 315-05-01, e-mail: genetika@genetika.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «ГосНИИГенетика» и на сайте <http://www.genetika.ru/>

Автореферат разослан «___»_____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Воюшина Татьяна Львовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 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 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, обуславливающие 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.

Личный вклад автора

Основная экспериментальная часть работы, обработка и анализ полученных результатов, а также оформление результатов для представления в виде материалов и

докладов на научных конференциях выполнены автором самостоятельно. Автор также являлся основным участником при написании статей по результатам работы.

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 плеiotропное 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 положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседании Ученого совета ФГБУН Института молекулярной генетики РАН 21 ноября 2016 года и на семинаре секции «Генетика микроорганизмов» Ученого Совета ФГБУ «ГосНИИГенетика» 28 ноября 2016 года, а также 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 «Х 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 школо-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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 174 страницах, содержит 35 рисунков, 24 таблицы и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение и список литературы, включающий 398 ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа состоит из двух разделов, посвященных изучению действия вторичных метаболитов бактерий – летучих органических соединений (ЛОС) различной природы и небелковой аминокислоты БМАА.

В первой части работы было исследовано действие летучих соединений, выделяемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia* на микроорганизмы и другие биологические объекты.

I. ДЕЙСТВИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (ЛОС) НА МИКРООРГАНИЗМЫ И ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

Все исследованные бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas* (*Pseudomonas chlororaphis*, *P. fluorescens*) и *Serratia plymuthica* IC1270 выделены из ризосферы растений или из почвы. *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. Бактерии *S. proteamaculans* 94 были выделены из испорченного мяса в холодильной установке. Однако, бактерии этого вида 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.

1. Определение действия летучих веществ бактерий на различные микроорганизмы

Чтобы исследовать влияние ЛОС бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* на рост микроорганизмов, мы применили систему совместного культивирования грибов и бактерий. Для этого использовали разделенные перегородкой чашки Петри. Питательные среды были разделены физическим барьером, поэтому антагонистическая активность бактерий могла быть обусловлена только действием их летучих веществ. Таким образом, исключалась возможность влияния бактерий на рост микроорганизмов за счет других механизмов антагонизма. Чашки плотно герметизировались парафильмом.

Мы исследовали действие летучих веществ штаммов *P. chlororaphis* 449, 64, ATCC 13985, 62 и 30-84, 66, 445 и 464, 205-с, *P. fluorescens* B-4117, *S. proteamaculans* 94 и *S. plymuthica* IC1270 на фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* 133, на цианобактерию *Synechococcus* sp. PCC 7942 и на различные виды грибов *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Helminthosporium sativum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia rolfsii*, *Colletotrichum* sp. Результаты действия летучих веществ, выделяемых штаммами *Pseudomonas* и *Serratia* на некоторые микроорганизмы представлены в Таблице 1.

Таблица 1. 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

*«-» нет видимого роста.

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

В ходе работы было установлено, что все исследуемые штаммы *P. chlororaphis* (Таблица 1) и *S. proteamaculans* способны синтезировать летучие вещества, подавляющие рост *A. tumefaciens* C58 при совместном культивировании (Рис. 1 А, В).

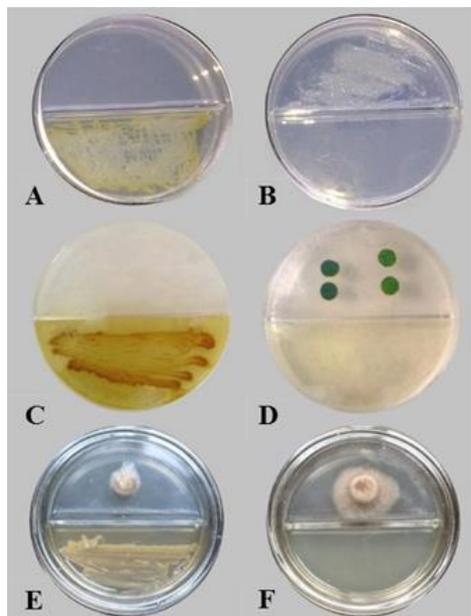


Рис. 1. Подавление летучими веществами штамма *P. chlororaphis* 449 роста бактерий *A. tumefaciens* C58 (А), цианобактерии *S. 7942* (С) и гриба *R. solani* (Е). Штамм 449 растет в нижней половине чашек. В контролях отсутствует штамм-продуцент ЛОС *P. chlororaphis* 449 (В, D, F). Фотографии сделаны на 2 сутки совместного культивирования *A. tumefaciens* C58 с *P. chlororaphis* 449 и на 7 сутки совместного культивирования с *S. 7942* и *R. solani*.

При исследовании действия продуцентов летучих веществ на другие бактерии было показано, что в течение первых трех суток летучие вещества бактерий всех исследуемых штаммов *P. chlororaphis* и *S. proteamaculans* активно подавляют рост *E. carotovora* 133, *A. tumefaciens* 636 и 388.

Полученные результаты показали, что наиболее сильное действие летучие вещества бактерий *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* В-4117, *S. proteamaculans* и *S. plymuthica* IC1270 оказывали на рост цианобактерий, *Synechococcus* (Рис. 1С, D) и *Anabaena*.

При воздействии на различные грибы в ходе эксперимента было установлено, что летучие вещества всех исследуемых штаммов *P. chlororaphis* и *S. proteamaculans* 94 подавляют рост фитопатогенного гриба *R. solani* (Рис.1. Е, F). Наибольший эффект на грибы оказывали летучие вещества штаммов 66 и 445 (100% подавление в течение 6 суток); меньший эффект продемонстрировали летучие вещества штаммов 62, 449, 30-84, ATCC 13985 (72,7-77,1%); промежуточное по силе действие было оказано летучими веществами штамма 205-с (66,2); наихудший эффект показали летучие вещества штаммов 64 и 464 (41,8% и 46,2%) (Таблица 1).

Результаты опытов выявили довольно сильную способность *P. chlororaphis* 449 к ингибированию роста *V. dahliae* за счет летучих соединений. За счет синтеза летучих веществ все штаммы *P. chlororaphis* и *S. proteamaculans* подавляют рост мицелия *S. sclerotiorum* приблизительно на 40-50%, ингибируют также рост мицелия *H. sativum*, образование спор и склеротий этого гриба. Было выяснено, что при воздействии летучих

веществ бактерий на *Colletotrichum* рост мицелия в опыте и в контроле был одинаков; однако, на 6 сутки роста в контроле появлялись споры, а в опыте их не было. На грибы *Fusarium solani*, *F. moniliforme* и *Pyricularia oryzae* летучие вещества бактерий *P. chlororaphis* и *S. proteamaculans* 94 не действовали.

Для определения механизмов регуляции продуцирования летучих веществ было исследовано влияние мутаций в ряде бактериальных генов, кодирующих глобальные регуляторы генной экспрессии, на синтез летучих веществ. Изучалось влияние мутаций на синтез/действие общего пула летучих веществ, выделяемых исследованными штаммами бактерий. Характеристики мутантов и плазмид указаны в Таблице 2.

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, 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, контролирующей функционирование QS систем, а также мутаций в генах *rpoS*, *vfr*, *phzA*, *phzB* *P. chlororaphis* не влияли на синтез летучих веществ. Продукты этих генов, по-видимому, не участвуют в регуляции антагонистической активности указанных бактерий, обусловленной синтезом летучих соединений.

Таблица 2. Характеристики мутантов *P. chlororaphis* 449, *S. proteamaculans* 94, *S. plymuthica* IC1270 и плазмид

<i>P. chlororaphis</i> 449 <i>gacS</i> ⁻	<i>gacA/gacS</i> система контролирует синтез вторичных метаболитов
<i>P. chlororaphis</i> 449 <i>rpoS</i> ⁻	ген <i>rpoS</i> кодирует σ^S -субъединицу РНК полимеразы
<i>P. chlororaphis</i> 449 <i>vfr</i> ⁻	ген <i>vfr</i> кодирует белок VFR, гомологичный белку CRP, глобальному регулятору экспрессии генов у <i>E. coli</i>
<i>P. chlororaphis</i> 449 <i>phzA</i> ⁻ , <i>P. chlororaphis</i> 449 <i>phzB</i> ⁻	гены <i>phzA</i> и <i>phzB</i> отвечают за синтез феназиновых антибиотиков
<i>P. chlororaphis</i> 449 рМЕ6863	плазида рМЕ6863 несет ген лактоназы AiiA, деградирующей ацилгомосеринлактоны (АГЛ)
<i>P. chlororaphis</i> 449 рМЕ6000	Векторная плазида рМЕ6000 в качестве контроля
<i>S. proteamaculans</i> 94 <i>sprI</i> ⁻	ген <i>sprI</i> Quorum Sensing системы (QS) отвечает за синтез АГЛ-синтазы
<i>S. proteamaculans</i> 94 <i>sprR</i> ⁻	ген <i>sprR</i> QS отвечает за синтез рецепторного белка
<i>S. plymuthica</i> IC1270 <i>grrA</i> ⁻ <i>S. plymuthica</i> IC1270 <i>grrS</i> ⁻	<i>grrA/grrS</i> система является гомологом <i>gacA/gacS</i> системы

Предполагалось, что в ингибирующем действии пула летучих веществ, выделяемых бактериями, значимую роль может играть присутствие неорганического соединения – цианида (HCN). Было показано, что штаммы *P. chlororaphis* 449, 62, 64, 66 и 464 синтезировали заметные количества HCN. При этом другие штаммы, обладающие

сильным ингибирующим эффектом за счет синтеза летучих веществ, *P. chlororaphis* (445 и 205), *P. fluorescens* B-4117, *S. proteamaculans* 94, *S. plymuthica* IC1270 и мутант штамма *P. chlororaphis* 449 по гену *rpoS* практически не синтезируют цианид. Это свидетельствует о том, что синтез цианида не обязателен для ингибиторного действия летучих соединений, продуцируемых исследованными бактериями.

2. Определение действия летучих веществ бактерий на жизнеспособность дрозофилы и нематоды

Мы исследовали действие летучих веществ штаммов *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* B-4117, *S. plymuthica* IC1270 и *S. proteamaculans* 94 на эукариот - дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) и нематоды (*Caenorhabditis elegans*).

Воздействие пула летучих веществ, выделяемых каждым из штаммов-продуцентов, приводило к необратимой гибели всех дрозофил на следующие сутки после начала эксперимента. В контролях при соблюдении тех же условий культивирования, но в отсутствие бактерий, синтезирующих летучие вещества, все мухи оставались живы по меньшей мере в течение 10 дней наблюдений и сохраняли способность к размножению.

Добавление активированного угля, абсорбирующего летучие вещества, на дно контейнера с мухами и *P. chlororaphis* 449 устраняло ингибиторный эффект действия летучих веществ на дрозофил, они сохраняли жизнеспособность.

Эксперименты с нематодами проводились совместно с сотрудниками лаборатории А.С. Миронова Государственного НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Определение влияния летучих веществ бактерий на жизнеспособность и развитие нематод *C. elegans* проводилось при их совместном культивировании с четырьмя штаммами, продуцирующими летучие вещества, – *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* B-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 ЛОС. Наиболее сильный эффект наблюдался при действии летучих веществ, выделяемых *S. plymuthica* IC1270. В вариантах совместного культивирования с этим штаммом наблюдалась неспособность к откладыванию 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.

3. Действие индивидуальных ЛОС на микроорганизмы

Для установления состава газовой фазы, содержащей летучие соединения бактерий, использовали газовую хромато-масс-спектрометрию.

В совместной работе с лабораторией д-ра Л. Чернина в Иерусалимском университете (Израиль) было определено, что в пулах летучих веществ, продуцируемых исследуемыми бактериями, в наибольшем количестве синтезируются ДМДС (диметилдисульфид), 1-ундецен, 2-нонанон, 2-ундеканон, 2-гептанон (Рис. 2).

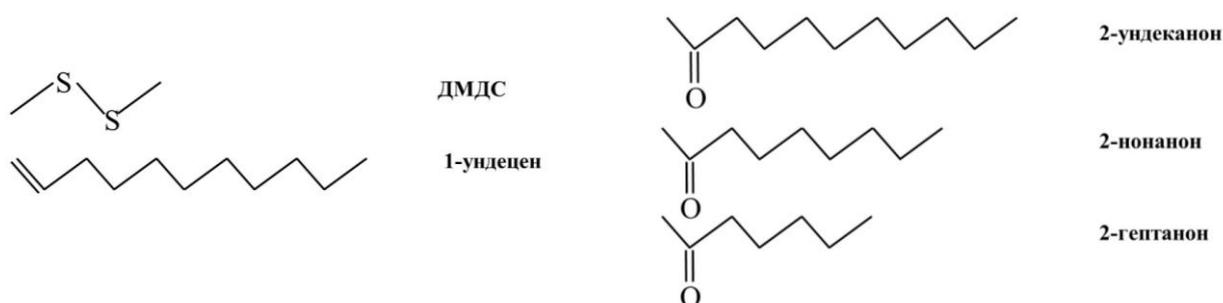


Рис. 2. Химические структуры индивидуальных ЛОС, действие которых изучалось в работе.

Ингибирующий эффект основных индивидуальных ЛОС (Рис. 2) исследовался при действии на *A. tumefaciens* штамм С58, цианобактерию *S. 7942* и гриб *R. solani*. Бактериостатический эффект ДМДС на *A. tumefaciens* С58 ранее был продемонстрирован на нескольких штаммах *Agrobacterium* [Dandurishvili et al., 2011] и подтвержден в данной работе. ДМДС в количестве 100 мкмоль полностью подавляет рост цианобактерии *S. 7942* (Таблица 3).

Таблица 3. Действие ЛОС на *A. tumefaciens* С58, *S. 7942* и *R. solani*.

ЛОС	<i>A. tumefaciens</i> С58 (КОЕ/мл)		<i>Synechococcus</i> sp. РСС 7942 (КОЕ/мл)	<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	

*«-» нет видимого роста.

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

Все эксперименты были проведены в 3-4 повторностях на двух или трех чашках для каждого варианта

Значительное ингибирование штаммов *A. tumefaciens* C58, *S. 7942* и *R. solani* наблюдалось при действии кетона – 2-нонанона. Другой кетон, 2-ундеканон, в количестве 100 мкмоль полностью ингибирует рост *S. 7942* и *R. solani*, но не оказывает значительного эффекта на штамм *A. tumefaciens* C58. 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. 7942*, в то время как эффект на *R. solani* был менее выраженным. 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 3).

4. Действие ЛОС на дрозофилу и нематод

Помимо сильной антибактериальной и противогрибковой активностей исследованные ЛОС оказывали сильный эффект на жизнеспособность и развитие нематоды *C. elegans*. ДМДС и кетоны 2-нонанон и 2-ундеканон в количестве 25 мкмоль убивали нематод после трех дней воздействия на них. 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. 1-ундецен (25 мкмоль) ингибировал развитие нематод. На 3 день инкубации с 1-ундеценом 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.

Таблица 4. 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

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.

Наиболее сильный эффект на жизнеспособность *D. melanogaster* 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. Наиболее слабый эффект на *Drosophila* оказал 2-ундеканон (Таблица 4).

5. Транспозонный мутагенез и анализ генов цианобактерии *S. 7942*, обуславливающих чувствительность к кетонам

С целью изучения генетического контроля чувствительности цианобактерии к действию кетонов, были получены транспозонные мутанты при использовании транспозона Tn5-692. При анализе более 2 500 транспозонных мутантов 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. 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; 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.

Локализация транспозонных мутаций в генах *Synpcc7942_1362* и *Synpcc7942_0726*, была успешно подтверждена инсерционной инактивацией. Показано, что мутанты *S. 7942* по генам *Synpcc7942_1362* и *Synpcc7942_0726* отличаются от штамма дикого типа длиной клеток (Рис. 3). Значительный фенотипический эффект наблюдается при мутации в гене *Synpcc7942_0726*, которая приводит к удлинению клеток и, по-видимому, препятствует их нормальному делению (Рис. 3С).

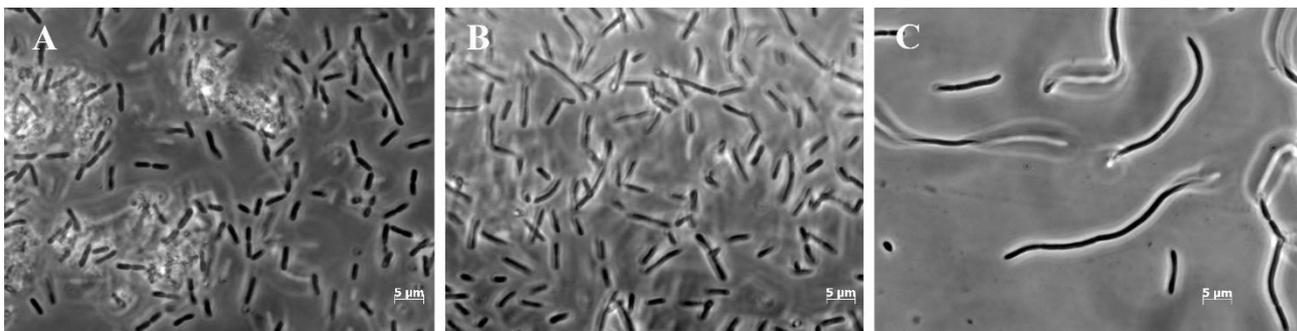


Рис. 3. Фенотипы дикого типа и мутантов *S. 7942*. А. Мутант *S. 7942* по гену *Synpcc7942_0726*. В. Дикий тип *S. 7942*. С. Мутант *S. 7942* по гену *Synpcc7942_1362*.

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

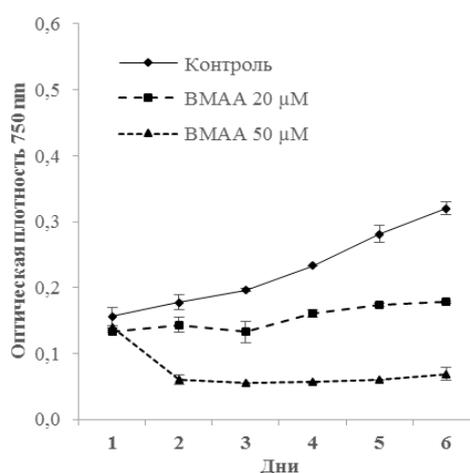
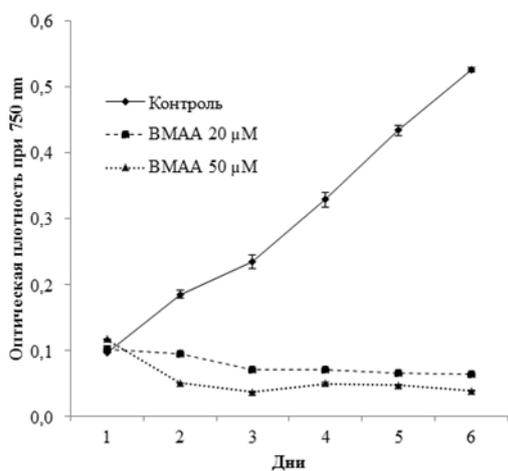
Вторая часть работы была посвящена изучению действия другого метаболита, небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-аланина (БМАА) на клетки цианобактерий. Физиологическая роль этого цианотоксина в клетках цианобактерий неизвестна.

II. ДЕЙСТВИЕ БМАА НА МОРФОЛОГИЮ И ФИЗИОЛОГИЮ КЛЕТОК АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *NOSTOC SP.* PCC 7120.

Для изучения действия БМАА в качестве модельного организма была выбрана азотфиксирующая нитчатая цианобактерия *Nostoc sp.* PCC 7120 (*N. 7120*). Эксперименты проводились при культивировании цианобактерии на среде без азота BG11₀ и на среде, содержащей связанный азот BG11_N.

1. Действие БМАА на рост *N. 7120*

На начальном этапе исследования было определено, что БМАА оказывает негативный, концентрационный эффект на рост культуры *N. 7120*. В присутствии БМАА на среде с нитратом рост цианобактерии (Рис. 4А) существенно подавлен и заметно отличается от контроля. В условиях diazотрофного роста (на среде без азота) штамм показал себя более устойчивым к БМАА в концентрации 20 мкМ (Рис. 4В). Тем не менее, более высокие концентрации БМАА от 50 до 200 мкМ значительно подавляли рост клеток *N. 7120*.



А

В

Рис. 4. Эффект БМАА на рост культуры *N. 7120*. А. Кривые роста *N. 7120* на среде BG11_N. В. Кривые роста *N. 7120* на среде BG11₀.

2. Действие БМАА на дифференцировку гетероцист дикого типа *N. 7120* при росте клеток на среде с разными источниками азота

Нитчатая цианобактерия *N. 7120* при истощении азота в среде образует специализированные клетки – гетероцисты, в которых происходит процесс азотфиксации. Гетероцисты усваивают молекулярный азот с помощью фермента нитрогеназы. Этот фермент очень чувствителен к присутствию кислорода, поэтому в ходе формирования гетероцисты образуется оболочка, которая состоит из полисахаридной капсулы и гликолипидного слоя и защищает нитрогеназу от инактивации кислородом.

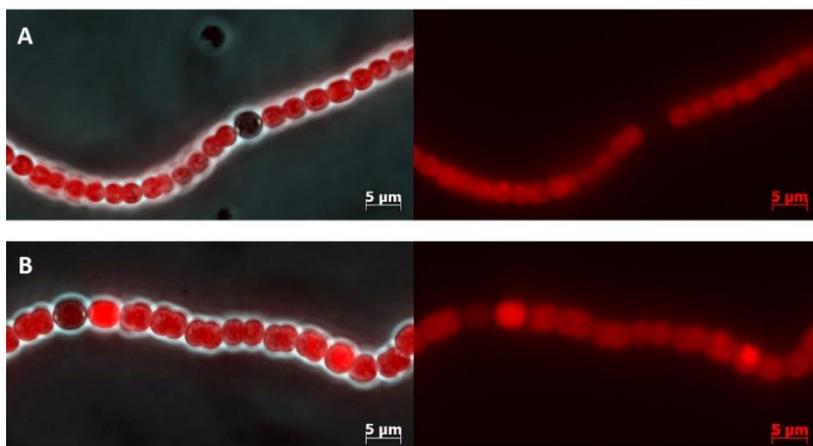


Рис. 5. Микрофотографии филаментов культуры *N. 7120* на 3 сутки культивирования на среде без азота. На левой панели филаменты в световом поле, совмещенном с флуоресцентным. На правой панели ауто-флуоресценция хлорофилла. Гетероцисты не флуоресцируют. А. *N. 7120* на среде BG11₀; В. *N. 7120* на среде BG11₀ + 20 мкМ БМАА.

В ходе работы изучался эффект БМАА на зрелые гетероцисты, уже сформированные в культуре цианобактерии до добавления аминокислоты, и на способность цианобактерии формировать гетероцисты в процессе голодания по азоту. При изучении действия БМАА на культуру *N. 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, выраженную в процентном содержании гетероцист относительно общего числа клеток (Таблица 5, Рис. 5 А, В). Частота гетероцист

Таблица 5. 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 ₀	5,4%	4,4%	-	-	-
BG11 ₀ (голодание)	6%	0%	-	-	-
BG11 _{NH₄}	0%	0%	0,72%	2,2%	6,8%
BG11 _{NO₃}	0%	3,7%	-	-	-

Цианобактерии способны формировать функциональные фиксирующие молекулярный азот гетероцисты через сутки после начала голодания по азоту. На третьи сутки роста цианобактерий частота гетероцист в контроле достигала 6%, а при действии 20 мкМ БМАА на голодающую культуру *N. 7120* через 48 и 72 часа наблюдалось полное ингибирование образования гетероцист (Рис. 7 А, В), при этом (Таблица 5).

При росте на среде, содержащей нитрат или аммоний, цианобактерия не образует гетероцисты. Однако, было обнаружено при использовании флуоресцентной микроскопии, что в присутствии нитрата или аммония добавление БМАА к клеткам цианобактерии *N. 7120*, вызывает образование гетероцистоподобных клеток (Рис. 7).

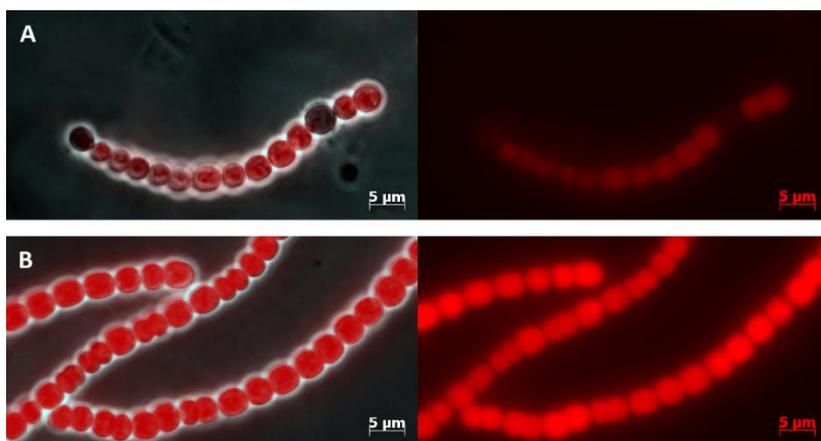


Рис. 6. Микрофотографии культуры *N. 7120* на 3 сутки роста в условиях голодания по азоту. На левой панели филаменты в световом поле, совмещенном с флуоресцентным. На правой панели аутофлуоресценция хлорофилла. Гетероцисты не флуоресцируют А. *N. 7120* на среде BG11₀; В. *N. 7120* на среде BG11₀, + 20 мкМ БМАА

В качестве таких клеток в составе филаментов рассматривались клетки, имеющие более округлую, чем вегетативные клетки, форму, в них отсутствовала аутофлуоресценция хлорофилла, как и в зрелых гетероцистах, а также в некоторых из них при 100-кратном увеличении можно было разглядеть зачатки полярных телец (Рис. 7А, В).

Гетероцистоподобные клетки при росте *N. 7120* на среде с аммонием или нитратом, обнаруживались через 72 часа инкубирования с БМАА, при этом в контрольных культурах эти клетки отсутствовали (Рис. 7 С, D).

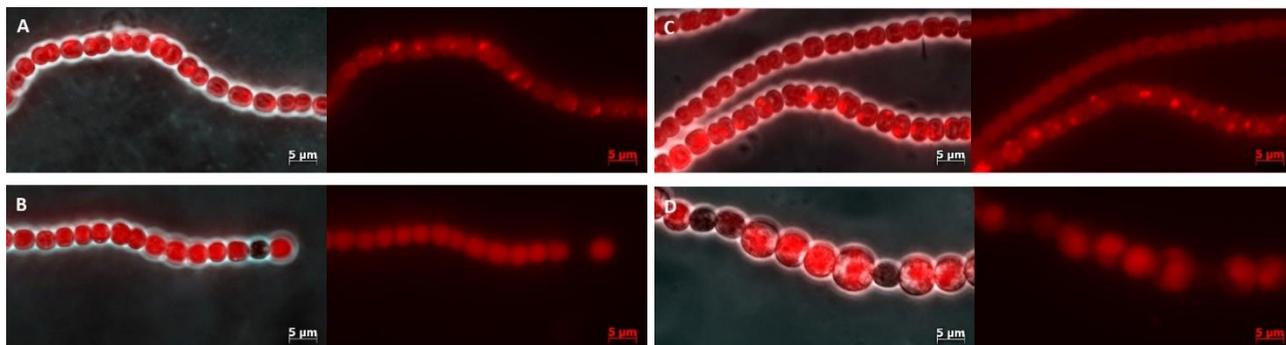


Рис. 7. Микрофотографии филаментов культуры *N. 7120* на 3 сутки культивирования на среде с азотом. На левой панели филаменты в световом поле, совмещенном с флуоресцентным. На правой панели аутофлуоресценция хлорофилла. Гетероцистоподобные клетки не флуоресцируют. А. *N. 7120* на среде BG11_{NO₃}; В. *N. 7120* на среде BG11_{NO₃} + 20 мкМ БМАА; С. *N. 7120* на среде BG11_{NH₄}; D. *N. 7120* на среде BG11_{NH₄} + 100 мкМ БМАА

Филаменты в культуре цианобактерии при росте на средах BG11₀ и BG11_{NO₃} не подвергались значительной деградации при 20 мкМ БМАА. На среде с аммонием в качестве источника азота культура *N. 7120* росла в присутствии БМАА в концентрациях от 20 до 200 мкМ, это дало возможность определить, что частота гетероцистоподобных клеток прямо пропорциональна количеству БМАА в среде (Таблица 5).

Таким образом, при изучении действия БМАА на дифференцировку гетероцист цианобактерии *N. 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. 7120*

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

При инкубировании клеток *N. 7120* с 20 мкМ и 50 мкМ БМАА наблюдалось значительное ингибирование нитрогеназной активности культуры. 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. 7120* (Рис. 8).

На четвертые сутки (через 96 часов) действия 20 мкМ БМАА нитрогеназная активность *N. 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.

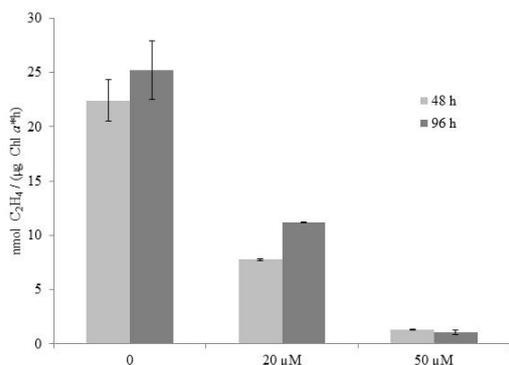


Рис. 8. Действие БМАА на азотфиксацию *N. 7120*. Клетки *N. 7120* растили на BG11₀ в присутствии 20 и 50 мкМ БМАА. Нитрогеназная активность представлена в сравнении с контролем без БМАА на 2 и 4 сутки роста.

Таблица 6. Нитрогеназная активность гетероцист и гетероцистоподобных клеток на 3 сутки инкубирования с 20 мкМ БМАА

Условия (среда, присутствие БМАА)	Частота гетероцист и гетероцистоподобных клеток, %	Нитрогеназная активность, нМ[C ₂ H ₄]/мкг[Хлорофилла]*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

Для определения функциональности гетероцистоподобных клеток, образующихся в культуре *N. 7120*, на среде со связанным азотом в присутствии БМАА, измеряли нитрогеназную активность и сравнивали ее с активностью нитрогеназы в культуре *N. 7120*, выращенной на среде BG11₀ и содержащей зрелые функциональные гетероцисты (Таблица 6). Нитрогеназная активность не проявлялась в культуре, содержащей гетероцистоподобные клетки. Таким образом, было показано, что гетероцистоподобные клетки не являются функциональными и не способны фиксировать молекулярный азот.

Ген *nifH*, кодирующий компонент фермента нитрогеназы - динитрогеназу-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 (qRT-PCR) было обнаружено подавление экспрессии гена *nifH* (Рис. 9) при неизменной частоте гетероцист.

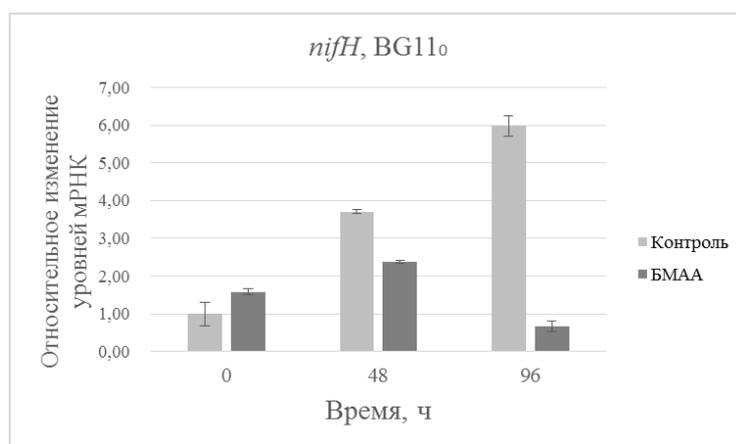


Рис. 9. Относительные уровни мРНК гена *nifH* в контроле (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при росте культуры *N. 7120* со зрелыми гетероцистами на среде без азота.

4. Действие БМАА на экспрессию генов, связанных с дифференцировкой клеток и азотным метаболизмом

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 7, 8). Экспрессия генов нормировалась относительно транскрипта гена домашнего хозяйства *trpB*. Расчет относительных уровней экспрессии проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации $\Delta\Delta C_t$.

Таблица 7. Относительное изменение уровней мРНК генов *N. 7120* в условиях азотного голодания в контроле и в присутствии 20 мкМ БМАА.

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

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 АВС-типа и необходим для синтеза полисахаридной капсулы гетероцисты. Обнаружено, что гены *hetR* и *hepA*, ответственные за формирование гетероцист, репрессированы в присутствии БМАА (Рис. 10 А, В), что, вероятно, может объяснять отсутствие гетероцист в условиях голодания культуры *N. 7120* по азоту (Рис. 6).

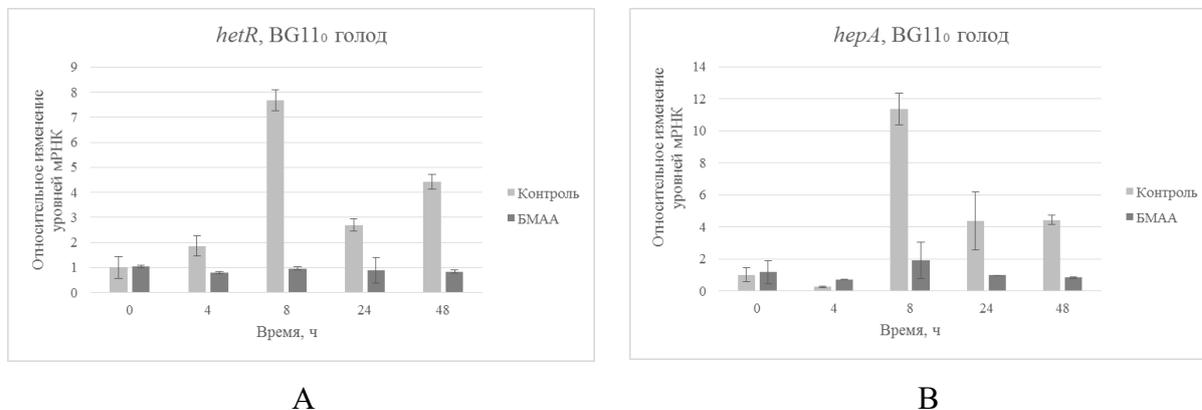


Рис. 10. Относительные уровни мРНК генов *hetR* (А) и *hepA* (В) без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при голодании культуры *N. 7120* по азоту.

По сравнению с контролем при добавлении БМАА к клеткам не наблюдается значительного снижения экспрессии гена *ntcA*, кодирующего глобальный регулятор транскрипции NtcA, и гена *gltS*, кодирующего глутаминоксиглутарат аминотрансферазу (ГОГАТ), в течение первых 24 ч голодания, а также снижения экспрессии гена *glnA*, кодирующего глутаминсинтетазу (ГС), в течение первых 8 ч (Таблица 7).

Если в среде есть источник азота, экспрессия генов *hetR* и *hepA* отсутствует или снижена до минорного уровня, однако, в присутствии БМАА экспрессия этих генов возрастает (Таблица 8, Рис. 11) и запускаются начальные стадии формирования гетероцист, что, по-видимому, приводит к образованию гетероцистоподобных клеток и соответствует фенотипу, который мы наблюдаем при микроскопии (Рис. 5).

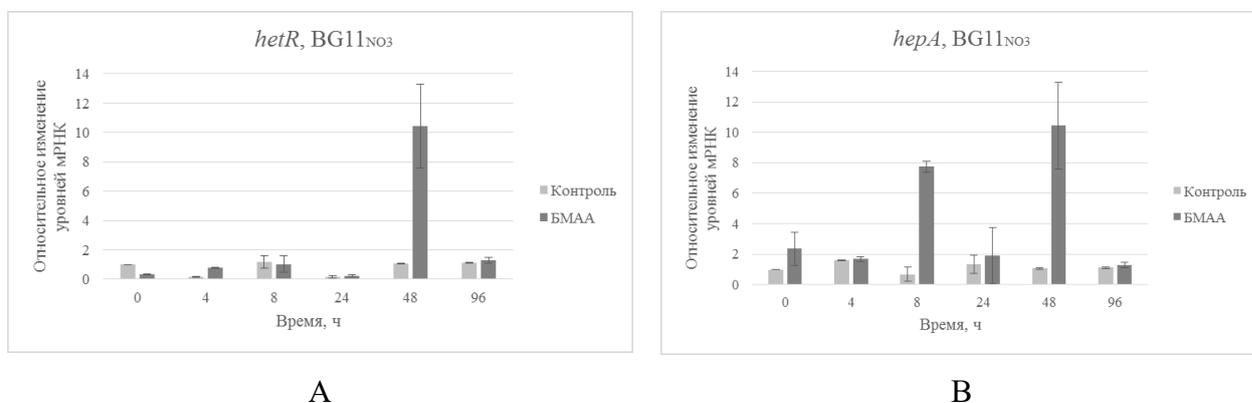


Рис. 11. Относительные уровни мРНК генов *hetR* (А) и *hepA* (В) без БМАА (синие столбцы) и в присутствии 20 мкМ БМАА (красные столбцы) при культивировании *N. 7120* на среде с нитратом.

Таблица 8. Относительное изменение уровней мРНК генов *N. 7120* в условиях роста культуры на нитрате в контроле и в присутствии 20 мкМ БМАА.

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

Результаты ПЦР в реальном времени показали, что БМАА влияет на экспрессию генов *ntcA*, *glnA*, *gltS* и *nirA*, кодирующего нитритредуктазу, в течение первых 24 часов после добавления БМАА к клеткам *N. sp.* PCC 7120, растущим на среде с азотом, не так значительно, как на экспрессию генов *hetR*, *hepA* и *nifH* (Таблица 8).

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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Попова 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., **Попова 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). Сборник «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. Материалы 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. Материалы 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. Х 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. Сборник материалов 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. **Ропова 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. **Ропова 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. Материалы 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. Материалы 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. Материалы 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. Материалы XXIV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 7-9 февраля 2012 г., с. 78.
16. **Ропова А.А.**, 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.