

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCOCCUS* SP. PCC 7942 К ДЕЙСТВИЮ 2-НОНАНОНА

А.А. Попова¹, О.А. Кокшарова^{1,2}, И.А. Хмель¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия, alexandra.a.porova@gmail.com

²Подразделение Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова» Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия, oa-koksharova@rambler.ru

Аннотация. Летучие органические соединения (ЛОС), выделяемые ризосферными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, способны ингибировать рост цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942. С целью изучения генетического контроля чувствительности *S. sp.* PCC 7942 к действию индивидуальных ЛОС была получена коллекция транспозонных цианобактериальных мутантов, устойчивых к трем разным кетонам. Были идентифицированы четыре гена, определяющие чувствительность клеток *S. sp.* PCC 7942 к действию кетона 2-нонанона.

Ключевые слова: цианобактерии, *Synechococcus*, летучие органические соединения, транспозонный мутагенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-975-977

Некоторые бактерии, ассоциированные с растениями, могут синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), подавляющие рост фитопатогенных микроорганизмов [Kai et al., 2009; Insam, Seewald, 2010; Effmert et al., 2012; Audrain et al., 2015]. Кроме того, ризосферные бактерии выделяют ЛОС, которые могут стимулировать рост растений и вызывать системную резистентность растений к патогенам [Ryu et al., 2003, 2004]. Бактериальные ЛОС относятся к различным химическим классам органических соединений, таким как алкены, спирты, кетоны, терпены, серосодержащие соединения и др. [Blom et al., 2011; Dandurishvili et al., 2011; Chernin et al., 2011; Garbeva et al., 2014; Popova et al., 2014; Tyc et al., 2015]. Интерес к ЛОС, синтезируемым почвенными бактериями, связан с их возможными сигнальными функциями [Kai et al., 2009; Chernin et al., 2011; Effmert et al., 2012; Kim et al., 2013].

Мы показали, что ЛОС ризосферных и почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* значительно ингибируют рост цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 (далее *S. sp.* PCC 7942) [Popova et al., 2014]. Чтобы исследовать влияние ЛОС бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* на рост микроорганизмов, мы применили систему совместного культивирования бактерий-продуцентов ЛОС и цианобактерий. Для этого использовали разделенные перегородкой чашки Петри. Чашки плотно герметизировали парафильмом. Питательные среды были разделены физическим барьером, поэтому антагонистическая активность почвенных бактерий могла быть обусловлена только действием их летучих веществ. Таким образом, исключалась возможность влияния бактерий на рост *S. sp.* PCC 7942 за счет других механизмов антагонизма [Popova et al., 2014].

По нашим данным, среди ЛОС, продуцируемых изучаемыми ризосферными и почвенными бактериями, значительную часть занимают кетоны [Popova et al., 2014]. Нами исследовано ингибирующее действие бактериальных кетонов на клетки

цианобактерии *S. sp.* PCC 7942. Кетоны 2-нонанон, 2-ундеканон и 2-гептанон полностью ингибировали рост *S. sp.* PCC 7942 [Popova et al., 2014].

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 [Koksharova, Wolk, 2002]. Более 2500 транспозонных мутантов высевали на чашки и инкубировали с каждым из трех кетонов. 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. Идентифицированы четыре гена, мутации в которых приводят к устойчивости цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 к 2-нонанону. Локализация транспозонных мутаций успешно подтверждена инсерционной инактивацией соответствующих генов в штамме дикого типа *S. sp.* PCC 7942.

Идентифицированные гены кодируют следующие белки: (1) муреин-пептид-лигазу, которая участвует в рециклизации муреина в процессе биогенеза клеточной стенки цианобактерий; (2) ABC транспортер, имеющий сходство с белками ABC транспортерами, определяющими устойчивость к органическим растворителям; (3) белок, содержащий VRR-NUC домен, который присутствует в ферментах рестрикции-модификации третьей группы; (4) маленький гипотетический белок с неизвестной функцией.

В настоящее время проводится локализация мутаций в трех штаммах, устойчивых к 2-гептанону. Будущие эксперименты с применением методов биофизики и протеомики при изучении мутантов *S. sp.* PCC 7942 будут способствовать пониманию молекулярных механизмов, определяющих чувствительность цианобактерий к действию природных кетонов.

Работа поддержана грантами РФФИ №18-34-00396 и №18-04-00375.

Литература

Audrain B., Farag M.A., Ryu C.M., Ghigo J.M. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology // *FEMS Microbiology reviews*. – 2015. – V. 39. – P. 222–233.

Blom D., Fabbri C., Connor E.C., Schiestl F.P., Klauser D.R., Boller T. et al. Production of plant growth modulating volatiles is wide spread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions // *Environmental microbiology*. – 2011. – V. 13. – P. 3047–3058.

Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Kim S., Ben-Ari J., Khmel I. et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles // *Environmental microbiology reports*. – 2011. – V. 3. – P. 698–704.

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 // *Journal of Applied Microbiology*. – 2011. – V. 110. – P. 341–352.

Effmert U., Kalderas J., Warnke R., Piechulla B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil // *Journal of chemical ecology*. – 2012. – V. 38. – P. 665–703.

Garbeva P., Hordijk C., Gerards S., de Boer W. Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – V. 5. – P. 289.

Insam H., Seewald M.A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils // *Biology and fertility of soils*. – 2010. – V. 46. – P. 199–213.

Kai M., Hausteil M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B. Bacterial volatiles and their action potential // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2009. – V. 81. – P. 1001–1012.

Kim K.S., Lee S., Ryu C.M. Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance // *Nature communications*. – 2013. – V. 4. – P. 1809.

Koksharova O.A., Wolk C.P. A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – P. 5524–5524.

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 research international*. – 2014. – doi: 10.1155/2014/125704.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* // *Plant physiology*. – 2004. – V. 134. – P. 1017–1026.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W. et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proceedings of the national academy of sciences USA*. – 2003. – V. 100. – P. 4927–4932.

Tyc O., Zweers H., de Boer W., Garbeva P. Volatiles in inter-specific bacterial interactions // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 1412.

THE STUDY OF MECHANISMS OF *SYNECHOCOCCUS* SP. PCC 7942 SENSITIVITY TO 2-NONANONE ACTION

A.A. Popova¹, O.A. Koksharova^{1,2}, I.A. Khmel¹

¹Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, alexandra.a.popova@gmail.com

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University subdepartment «A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology», Moscow, Russia, oa-koksharova@rambler.ru

Abstract. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by rhizosphere bacteria of *Pseudomonas* and *Serratia* species, are capable of inhibiting the growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. In order to study the genetic control of the *S. sp.* PCC 7942 sensitivity to the action of individual VOCs, a collection of transposon cyanobacterial mutants resistant to three different ketones was obtained. We identified four genes that determined the sensitivity of *S. sp.* PCC 7942 to the action of the ketone 2-nonanone.

Keywords: cyanobacteria, *Synechococcus*, volatile organic compounds, transposon mutagenesis