

## СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОТВЕТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ $\beta$ -ИОНОНА

© 2024 г. Д. Е. Сидорова<sup>а</sup>, О. Е. Мелькина<sup>а</sup>, О. А. Кокшарова<sup>а, б</sup>, Е. Н. Вагнер<sup>а, с</sup>,  
И. А. Хмель<sup>а</sup>, В. А. Плюта<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>ФГБУ КК НБИКС-ПТ НИЦ “Курчатовский институт”, 123182 Москва

<sup>б</sup>НИИФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва

<sup>с</sup>ФГБУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева, 125047 Москва

\*e-mail: plyutaba@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 11.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

Исследована биологическая активность и механизмы действия ненасыщенного кетона  $\beta$ -ионона – летучего соединения, представляющего серьезный интерес для биотехнологии, медицины и сельского хозяйства. С использованием специфических *lux*-биосенсоров на основе *Escherichia coli* MG1655 установлено, что  $\beta$ -ионон вызывает окислительный стресс в клетках *E. coli*, индуцируя экспрессию с промоторов *PkatG* и *Pdps*, но не с промотора *PsoxS*. Эффекты  $\beta$ -ионона на индукцию теплового шока (экспрессия с *PibpA* и *PgrpE* промоторов) и на повреждение ДНК (экспрессия с *PcolD* и *PdinI* промоторов, SOS-ответ) в клетках *E. coli* были значительно слабее.  $\beta$ -ионон не вызывал окислительный стресс в клетках грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*.

**Ключевые слова:** летучие органические соединения,  $\beta$ -ионон, *lux*-биосенсоры, промоторы, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026365624020186

Микроорганизмы синтезируют огромное количество летучих соединений различной природы, большинство из которых относится к летучим органическим соединениям (ЛОС). ЛОС характеризуются, в основном, как липофильные соединения с низкой молекулярной массой (~300 Да), низкой температурой кипения; они могут легко распространяться в воздухе и жидкостях, передаваться в почве и действовать на коротких и длинных расстояниях. В настоящее время опубликована база данных идентифицированных ЛОС (mVOC3.0 database; <http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>), которая включает в себя около 2000 соединений, выделяемых почти 1000 видами микроорганизмов. Это, конечно, лишь малая часть ЛОС, которые могут быть продуцированы микроорганизмами. Совокупность всех летучих веществ, синтезируемых организмом или экосистемой, получила название “волатилома” (от англ. “volatile” — летучий).

ЛОС обладают различной биологической активностью. Они могут подавлять или стимулировать рост бактерий, грибов и растений, вызывать системную резистентность растений, оказывать влияние на насекомых, действуя как аттрактанты или репелленты, подавлять развитие нематод и т.д. Продукция ЛОС может играть существенную роль

в конкурентных отношениях микроорганизмов, в антагонизме ассоциированных с растениями бактерий и фитопатогенов, а также микроорганизмов микрофлоры человека и животных. Большой интерес представляет изучение способности синтезировать ЛОС почвенными и ассоциированными с растениями бактериями, перспективными для биологического контроля заболеваний растений. Исследуется возможность использования ЛОС как фумигантов, например, запатентован препарат на основе диметилдисульфида (ДМДС) для предпосевной обработки почв. На основе ЛОС разрабатываются пестициды нового типа; они экологически безопасны, т.к. улетучиваются после воздействия на фитопатогенные микроорганизмы (Kai et al., 2009; Effmert et al., 2012; Audrain et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Тус et al., 2017; Fincheira, Quiroz, 2018; Веселова и соавт., 2019; Weisskopf et al., 2021).

Еще одним важнейшим аспектом функционирования ЛОС является их способность участвовать в новом типе коммуникации микроорганизмов – передавать информацию дистанционно, регулируя экспрессию генов, контролирующих жизненно важные клеточные процессы, за что они получили название “infochemicals” (Chernin et al., 2011, 2013;

Ahmad et al., 2014; Schmidt et al., 2015; Helman, Chernin, 2015).

Летучие вещества, синтезируемые бактериями, представляют ценный арсенал химических соединений для биотехнологии, сельского хозяйства, медицины, пищевой промышленности и др. Возможности их использования в прикладных целях исследованы недостаточно. Вопросы о механизмах действия ЛОС, путях их биосинтеза, экологической и функциональной значимости заслуживают глубокого и детального изучения.

В наших предыдущих работах мы исследовали биологическую активность ЛОС, образуемых бактериями, и механизмы их действия на клетки различных организмов. Нами исследовались ЛОС различной химической структуры: кетоны с различной длиной углеводородной цепи, спирты, терпены, серосодержащее соединение — диметилдисульфид (ДМДС). Было показано, что ЛОС могут подавлять рост бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*), образование биопленок и выживаемость бактерий в зрелых биопленках, а также миграцию бактерий по поверхности питательной среды. ЛОС подавляли и/или стимулировали рост растений (*Arabidopsis thaliana*); ингибировали прорастание семян этого растения, оказывали убивающее действие на плодовую мушку *Drosophila melanogaster* и на нематод, а при малых количествах тормозили развитие исследуемых насекомых и их личинок (Popova et al., 2014; Plyuta et al., 2016, 2021; Sidorova et al., 2022, 2023). Проведены работы по изучению механизмов действия некоторых ЛОС на бактериальные клетки (Melkina et al., 2017, 2021; Voronova et al., 2019; Koksharova et al., 2020; Плута и соавт., 2020).

В этой работе продолжилось исследование биологической активности ненасыщенного кетона  $\beta$ -иона (рис. 1).

Это летучее соединение вызывает большой интерес исследователей, работающих как в фундаментальном, так и в прикладном направлении.  $\beta$ -ион синтезируется цианобактериями, водорослями и растениями (является существенным компонентом эфирных масел различных растений, обнаруживается в плодах, овощах и др.).  $\beta$ -ион — важное ароматическое вещество, он широко используется в парфюмерной промышленности,

в косметике; проявляет фармакологические активности, например, оказывает противовоспалительное, противогрибковое, антилейшманиозное, противораковое действие (Ansari et al., 2016; Paparella et al., 2021). Поскольку  $\beta$ -ион обладает ограниченной растворимостью в воде (169 мг/л при 25°C) и обычно образуется в растениях в относительно низких концентрациях, в настоящее время ведутся активные генно-инженерные работы по созданию и улучшению уже существующих штаммов-продуцентов на основе бактерий и дрожжей для получения высоких концентраций этого соединения (Czajka et al., 2018; Shi et al., 2020).

Ранее мы показали, что  $\beta$ -ион в больших дозах (400–800 мкмоль) уменьшает количество выросших колоний фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в 1.5–5 раз, подавляет рост растений *A. thaliana*, ингибирует прорастание семян этого растения, ингибирует развитие и убивает дрозид (Sidorova et al., 2022). Однако механизмы действия  $\beta$ -иона на бактерии изучены недостаточно.

С целью изучения механизмов действия  $\beta$ -иона на бактерии мы использовали специфические люминесцентные *lux*-биосенсоры на основе штаммов *Escherichia coli*, которые содержат индуцируемые промоторы, реагирующие на окислительный стресс, повреждение ДНК и белков, транскрипционно слитые с репортерными генами *luxCDABE* бактерии *Photobacterium luminescens* (Kotova et al., 2010).

Ночные культуры биосенсоров разводили до концентрации  $10^7$  кл./мл и растили при 30°C 2–3 ч с аэрацией. Затем пробы по 200 мкл переносили в специальные кюветы, одна из которых служила контролем (в нее добавляли 4 мкл ДМСО), а в другие вносили по 4 мкл  $\beta$ -иона в различной концентрации (необходимая концентрация раствора была получена разведением 96%  $\beta$ -иона в ДМСО). Кюветы располагали перед фотоумножителем в люминиметре LMA01 (“Beckman”, США) при комнатной температуре и через определенные интервалы времени измеряли интенсивность биолюминесценции.

В клетках *E. coli* на окислительный стресс отвечают OxyR/OxyS и SoxR/SoxS регулоны, которые специфически активируются при появлении пероксида водорода и супероксидного анион-радикала, соответственно. Для определения действия  $\beta$ -иона на окислительный стресс бактерий использовали биосенсоры *E. coli* MG1655 (pKatG::lux) и *E. coli* MG1655 (pSoxS::lux). Степень экспрессии с соответствующих промоторов определялась по интенсивности биолюминесценции. Перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и паракват (стимулирует образование супероксид-анион-радикала) были использованы в качестве положительного контроля. Полученные нами результаты показали, что  $\beta$ -ион индуцирует окислительный стресс (увеличивает экспрессию

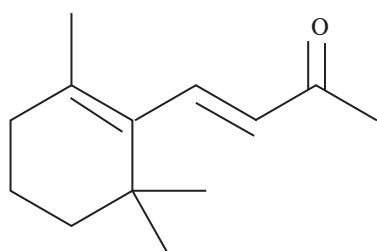
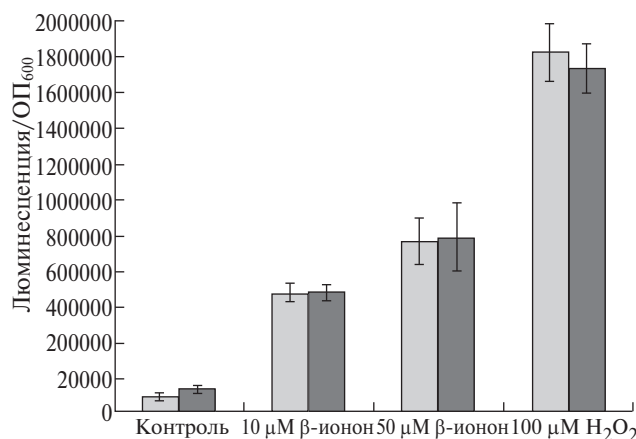


Рис. 1. Химическая структура  $\beta$ -иона.



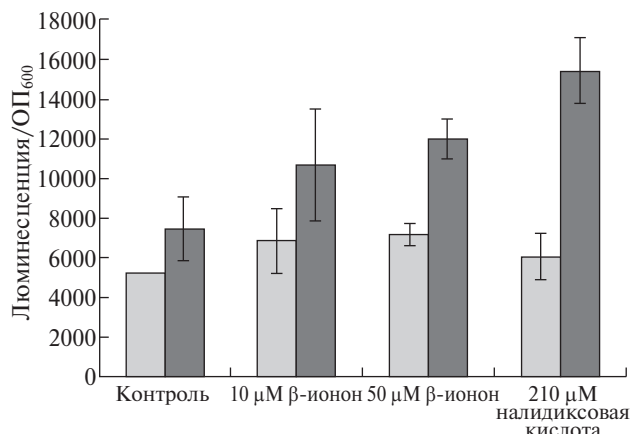
**Рис. 2.** Индукция биолуминесценции *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG::lux) при действии β-ионона. По оси ординат показано отношение значения люминесценции к величине оптической плотности культуры *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG::lux) через 60 мин (светлые столбцы) и 120 мин (темные столбцы) роста в контроле (без добавления ЛОС) и при действии 10 и 50 мкмоль β-ионона, соответственно. В качестве положительного контроля использовали перекись водорода (100 мкмоль). Все величины представляют средние значения ± стандартные отклонения.

с *PkatG* и *Pdps* промоторов) (рис. 2) через специфический ответ, контролируемый OxyR/OxyS регулоном, но не SoxR/SoxS регулоном; β-ионон не индуцирует экспрессию с *PsoxS* промотора.

Таким образом, впервые было показано, что β-ионон вызывает специфичный ответ в бактериальных клетках, а именно, окислительный стресс с образованием активных форм кислорода — перекиси водорода, но не супероксид-анион-радикала.

Для оценки способности β-ионона индуцировать повреждения ДНК, приводящие к SOS-ответу бактериальной клетки, использовались *lux*-биосенсоры *E. coli* (pColD::lux) и *E. coli* MG1655 (pDinI::lux). Положительным контролем была налидиксовая кислота, которая существенно индуцировала экспрессию с промотора *PcolD*. β-ионон слабо повышал экспрессию с *PcolD* промотора при концентрациях 10 и 50 μM (рис. 3) и незначительно снижал ее при 100 мкмоль. Такая же закономерность наблюдалась и при действии β-ионона на штамм *E. coli* MG1655 (pDinI::lux).

Для изучения действия β-ионона на тепловой шок и повреждение белков были использованы биосенсоры *E. coli* MG1655 (pIbpA::lux) и *E. coli* MG1655 (PGrpE::lux). В качестве положительного контроля использовался 96% этанол. Действие β-ионона на штамм *E. coli* MG1655 (pIbpA::lux) вызывало индукцию экспрессии генов теплового шока при его концентрациях 50 и 100 μM. Концентрации β-ионона 10, 50 и 100 мкмоль не вызывали индукции экспрессии с *PgrpE* промотора.



**Рис. 3.** Индукция биолуминесценции *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD::lux) при действии β-ионона. По оси ординат показано отношение значения люминесценции к величине оптической плотности культуры *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD::lux) через 60 мин (светлые столбцы) и 120 мин (темные столбцы) роста в контроле (без добавления ЛОС) и при действии 10 и 50 мкмоль β-ионона, соответственно. В качестве положительного контроля использовали налидиксовую кислоту (210 мкмоль). Все величины представляют средние значения ± стандартные отклонения.

Для оценки способности β-ионона вызывать окислительный стресс у грамположительных бактерий мы использовали биосенсор на основе *Bacillus subtilis*. Было показано, что действие β-ионона не вызывает окислительный стресс в клетках *B. subtilis* 168 pNK-MrgA даже при длительном времени инкубации.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично финансировалась в рамках Тематического плана Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и соглашения с Минобрнауки № 075-15-2019-1659.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Веселова М.А., Плута В.А., Хмель И.А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 272–287.

- Veselova M.A., Plyuta V.A., Khmel I.A. Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, and biological activity // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 261–274.
- Плюта В.А., Сидорова Д.Е., Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Хмель И.А. Влияние летучих органических соединений, синтезируемых бактериями, на экспрессию с промоторов генов *zntA*, *copA* и *arsR*, индуцируемых в ответ на действие меди, цинка и мышьяка // *Мол. генетика, микробиол. вирусол.* 2020. Т. 3. С. 128–135.
- Plyuta V.A., Sidorova D.E., Zavigelsky G.B., Kotova V. Yu., Khmel I.A. Effects of volatile organic compounds synthesized by bacteria on the expression from promoters of the *zntA*, *copA*, and *arsR* genes induced in response to copper, zinc, and arsenic // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2020. V. 35. P. 152–158.
- Ahmad A., Viljoen A.M., Chenia H.Y. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing // *Lett. Appl. Microbiol.* 2014. V. 60. P. 8–19.
- Ansari M., Emami S.  $\beta$ -Ionone and its analogs as promising anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 123. P. 141–154.
- Audrain B., Farag M.A., Ryu C.-M., Ghigo J.-M. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. P. 222–233.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Kim S., Ben-Ari J., Khmel I., Vainstein A. Quorum sensing quenching by rhizobacterial volatiles // *Environ. Microbiol. Rep.* 2011. V. 3. P. 698–704.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Khmel I. Quorum-sensing quenching by volatile organic compounds emitted by rhizosphere bacteria // *Molecular Microbiol. Ecology of the Rhizosphere*. V. 2. / Ed. Frans J. de Bruijn. John Wiley & Sons. Inc., 2013. P. 791–800.
- Czajka J.J., Nathenson J.A., Benites V.T., Baidoo E.E.K., Cheng Q., Wang Y., Tang Y.J. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce the aroma compound  $\beta$ -ionone // *Microb. Cell Fact.* 2018. V 17. P. 1–13.
- Effmert U., Kalderas J., Warnke R., Piechulla B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil // *J. Chem. Ecol.* 2012. V. 38. P. 665–703.
- Fincheira P., Quiroz A. Microbial volatiles as plant growth inducers // *Microbiol. Res.* 2018. V. 208. P. 63–75.
- Helman Y., Chernin L. Silencing the mob: Disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease // *Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 16. P. 316–329.
- Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B. Bacterial volatiles and their action potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 81. P. 1001–1012.
- Koksharova O.A., Popova A.A., Plyuta V.A., Khmel I.A. Four new genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 are responsible for sensitivity to 2-nonanone // *Microorganisms*. 2020. V. 8. Art. 1234.
- Kotova V.Y., Manukhov I.V., Zavigelskii G.B. Lux-bio-sensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 781–788.
- Melkina O.E., Khmel I.A., Plyuta V.A., Koksharova O.A., Zavigelsky G.B. Ketones 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-undecanone inhibit DnaK-dependent refolding of heat-inactivated bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells lacking small chaperon IbpB // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 5765–5771.
- Melkina O.E., Plyuta V.A., Khmel I.A., Zavigelsky G.B. The mode of action of cyclic monoterpenes (–)-limonene and (+)- $\alpha$ -pinene on bacterial cells // *Bio-molecules*. 2021. V. 11. P. 806.
- Paparella A., Shaltiel-Harpaza L., Ibdah M.  $\beta$ -Ionone: its occurrence and biological function and metabolic engineering // *Plants (Basel)*. 2021. V. 10. P. 754.
- Plyuta V., Lipasova V., Popova A., Koksharova O., Kuznetsov A., Szegedi E., Chernin L., Khmel I. Influence of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains on *Agrobacterium tumefaciens* biofilms // *APMIS*. 2016. V. 124. P. 586–594.
- Plyuta V.A., Chernikova A.S., Sidorova D.E., Kupriyanova E.V., Koksharova O.A., Chernin L.S., Khmel I.A. Modulation of *Arabidopsis thaliana* growth by volatile substances emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. P. 82.
- Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., Zaitseva Ju.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. Article ID125704. 11 p.
- Schmidt R., Cordovez V., de Boer W., Raaijmakers J., Garbeva P. Volatile affairs in microbial interactions // *ISME J.* 2015. V. 9. P. 2329–2335.
- Shi J., Cao C., Xu J., Zhou C. Research advances on biosynthesis, regulation, and biological activities of apocarotenoid aroma in horticultural plants // *J. Chem.* 2020. V. 2020. P. 1–11.
- Sidorova D.E., Plyuta V.A., Padiy D.A., Kupriyanova E.V., Roshina N.V., Koksharova O.A., Khmel I.A. The effect of volatile organic compounds on different organisms: agrobacteria, plants and insects // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 69.
- Sidorova D.E., Skripka M.I., Khmel I.A., Koksharova O.A., Plyuta V.A. Effects of volatile organic compounds on biofilms and swimming motility of *Agrobacterium tumefaciens* // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 1512.
- Sidorova D.E., Khmel I.A., Chernikova A.S., Chupriyanova T.A., Plyuta V.A. Biological activity of volatiles produced by the strains of two *Pseudomonas* and two *Serratia* species // *Folia Microbiol.* 2023. V. 68. P. 617–626.
- Tyc O., Song C.X., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria // *Trends Microbiol.* 2017. V. 25. P. 280–292.

Voronova E.N., Konyukhov I.V., Koksharova O.A., Popova A.A., Pogosyan S.I., Khmel I.A., Rubin A.B. Inhibition of cyanobacterial photosynthetic activity by natural ketones // J Phycol. 2019. V. 55. P. 840–857.

Weisskopf L., Schulz S., Garbeva P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions // Nat. Rev. Microbiol. 2021. V. 19. P. 391–404.

---

---

## SHORT COMMUNICATIONS

---

---

### Specific Response of Bacterial Cells to $\beta$ -Ionone

D. E. Sidorova<sup>1</sup>, O. E. Melkina<sup>1</sup>, O. A. Koksharova<sup>1, 2</sup>, E. N. Vagner<sup>1, 3</sup>, I. A. Khmel<sup>1</sup>,  
and V. A. Plyuta<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Complex of NBICS Technologies of the NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

<sup>2</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Mendelev University of Chemical Technology of Russia, Moscow 125047 Russia

\*e-mail: plyutaba@gmail.com

Received October 13, 2023; revised November 11, 2023; accepted November 11, 2023

**Abstract**—The biological activity and mechanisms of action of the unsaturated ketone  $\beta$ -ionone, a volatile compound of significant interest for biotechnology, medicine, and agriculture, were studied. Using specific *lux* biosensors based on *Escherichia coli* MG1655, we found that  $\beta$ -ionone causes oxidative stress in *E. coli* cells by inducing expression from the *PkatG* and *Pdps* promoters, but not from the *PsoxS* promoter. The effects of  $\beta$ -ionone on the heat shock induction (expression from the *PibpA* and *PgrpE* promoters) and on DNA damage (expression from the *PcolD* and *PdinI* promoters, SOS response) in *E. coli* cells were significantly weaker.  $\beta$ -Ionone did not cause oxidative stress in the cells of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** volatile organic compounds,  $\beta$ -ionone, *lux* biosensors, promoters, oxidative stress