

УДК 579.841.11:597.2

Е.Г. ВЕРЕМЕЕНКО, В.В. ЛЫСАК, Н.П. МАКСИМОВА

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТОВ *PSEUDOMONAS AURANTIACA*, СПОСОБНЫХ К СВЕРХСИНТЕЗУ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В МИНИМАЛЬНОЙ СРЕДЕ

It was obtained *P. aurantiaca* B-162/17 strain – a producer of phenazine antibiotics (level of production of 210 mg/l) on minimal medium M9 containing glucose (0,8 %). Optimum conditions of cultivation a producer, raising an yield of phenazines 1,5÷1,7 folds are selected. It was shown, that acquisition by bacteria B-162/17 of ability to synthesize phenazines on minimal medium was not connected with changes of work of their QS-system.

It is shown, that synthesis of phenazines at bacteria B-162/17 on the minimal medium is attended by activation of their antioxidant complex – the induction of the synthesis of catalase and superoxidismutase (SOD) in 6 and 8 times, accordingly, and glutathione (in 4,5 times) is observed. Synthesis levels of glutathione-reductase and NADH-oxidase at bacteria B-162/17 practically do not change, and activity acyl-CoA-synthetase decreases.

Большинство ризосферных бактерий *Pseudomonas*, относящихся к PGPR-группе (plant growth-promoting rhizospheric bacteria), включающей таких известных представителей, как *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* и *P. putida*, синтезируют биологически активные соединения (антибиотики, ауксины и гиббереллины, витамины, пиовердины, органические кислоты и др.), которые стимулируют рост и развитие растений, а также обеспечивают им защиту от патогенов. К числу наиболее активных антибиотиков бактерий *Pseudomonas*, характеризующихся широким спектром антимикробного действия и играющих главную роль в обеспечении биологического контроля фитопатогенов в ризосфере растений, относятся соединения феназинового ряда [1]. Известно, что в основе механизма их действия лежит способность генерировать активные формы кислорода ( $O_2^-$ , OH· и  $H_2O_2$ ), обладающие чрезвычайно высокой реакционной способностью, что вызывает гибель чувствительных к ним микроорганизмов.

Несмотря на перспективность использования синтезирующих феназиновые антибиотики штаммов *Pseudomonas* в практических целях, число работ по созданию продуцентов данных соединений в настоящее время пока еще невелико. Основная причина этого заключается в сложности механизмов регуляции синтеза феназинов и, как следствие, – в отсутствии адекватных подходов конструирования штаммов-продуцентов. Не менее существенным для получения продуцентов является правильный выбор штаммов, клетки которых должны обладать эффективной системой защиты от избыточных количеств собственных феназинов, что обеспечивает им нормальную жизнеспособность в экстремальных условиях и соответственно высокий биосинтетический потенциал. Известно, что резистентность бактерий к феназинам связана с активацией ряда ферментов антиоксидантного комплекса (в частности, каталазы и супероксиддисмутазы), а также наличием у них устойчивой к феназинам формы ключевого фермента клеточного метаболизма – ацил-CoA-синтетазы [2, 3]. В этом отношении ризосферные бактерии *Pseudomonas* PGPR-группы изучены еще недостаточно.

На основе штамма *Pseudomonas sp.* M18 путем направленной инактивации гена *gacA* (система позитивной регуляции синтеза вторичных метаболитов) был получен штамм-продуцент M18G, уровень синтеза феназин-1-карбоксилата у которого был повышен в 30 раз и достигал 300 мг/л при культивировании на полноценной среде Кинг В [4]. С целью получения более высокого выхода феназинов ав-

торами данной работы была проведена оптимизация состава питательных сред, что позволило увеличить выход названных соединений до 2 г/л на среде, содержащей ферментативный соевый пептон (10,9 г/л), соевую муку (33,4 г/л), этанол (13,8 мл/л) и глюкозу (12,7 г/л), при непрерывном культивировании [5]. При этом концентрация клеток в культуре к концу ферментации достигала  $1,3 \cdot 10^{11}$  кл./мл [5].

Общеизвестен факт, что для синтеза феназинов бактерии нуждаются в полноценных питательных средах сложного состава (например, ПСА, Кинг В и др.), тогда как на минимальных средах, включающих минеральные соли и необходимый источник углерода, они, как правило, практически не способны к синтезу данных соединений. Вместе с тем это свойство бактерий является важным биотехнологическим преимуществом в случае их практического использования, в частности, при получении препаратов феназиновых антибиотиков в промышленных условиях, а также при применении в качестве биоконтролирующих агентов в естественных условиях.

Авторами работы [6] путем направленной инактивации *rpeA*-гена впервые был получен штамм *P. aureofaciens* 30-84 RpeA, клетки которого приобрели способность синтезировать феназины при культивировании в минимальной среде M9. Было показано, что в этих условиях инактивация *rpeA* приводит к увеличению уровня синтеза феназиновых антибиотиков в 2,5 раза по сравнению с бактериями дикого типа. Авторами работы сделано предположение, что ген *rpeA* кодирует сенсорную гистидиновую киназу (элемент двухкомпонентной регуляторной системы клетки), одна из функций которой – восприятие и передача информации о состоянии внешней среды. Интересно отметить, что сверхэкспрессия генов феназинового оперона у мутантных бактерий *P. aureofaciens* 30-84 RpeA не связана с накоплением N-гексаноил-гомосерин лактонов и соответственно с QS-системой, осуществляющей, как известно, позитивную регуляцию синтеза вторичных метаболитов, в том числе феназиновых антибиотиков [6].

Ранее на основе ризосферных бактерий *P. aurantiaca* с помощью НГ-мутагена нами был получен продуцент (штамм В-162/255) феназиновых антибиотиков, уровень синтеза которых на среде ПСА достигал 410 мг/л, что примерно в 6 раз выше, чем у бактерий дикого типа [7]. Оптимизация состава питательных сред для повышения продуктивности полученного мутантного штамма в данной работе не проводилась.

Целью настоящей работы являлось получение на основе штамма *P. aurantiaca* В-162/255 нового продуцента, способного к синтезу феназиновых антибиотиков при культивировании в минимальной среде, а также изучение механизмов его устойчивости к собственным феназинам в этих условиях.

#### Материал и методика

В работе использовали штамм *P. aurantiaca* В-162/255 – продуцент феназиновых антибиотиков [7], а также В-162phz<sup>-</sup>-вариант, не способный к их синтезу, полученный ранее с помощью Tn5-мутагена [8].

Культивирование бактерий осуществляли в жидкой и агаризованной питательной среде M9 [9], содержащей 0,8 % глюкозы, а также среде ПСА [10]. Химический мутагенез проводили с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ) по методике, описанной ранее [11]. Отбор мутантов осуществляли по их способности к синтезу феназиновых антибиотиков на минимальной среде M9. Феназины выявляли по известной методике [10], их концентрацию в КЖ измеряли спектрофотометрически при длине волны 369 нм с последующим определением концентрации феназинов по калибровочной кривой. Внутриклеточное содержание феназинов определяли в клеточном экстракте по той же методике.

Клеточный экстракт получали путем обработки суспензии клеток ультразвуком (30 кГц, 3 раза по 15 сек) при 4 °С в 15 мМ фосфатном буфере, pH 7,0.

Определение активности СОД осуществляли по методу [12], каталазы – согласно известной методике, предложенной Aebi [13], активность NADH-оксидазы – по уменьшению концентрации NADH [14], содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона – по методу, разработанному Senft и др. [15], активность глутатион-редуктазы – по методу, предложенному в работе [16]. Активность СОД выражали в у. е./мг белка (1 у. е. соответствует 50 % ингибированию реакции разрушения кверцетина на 1 мг белка), каталазы – ммоль/мин·мг белка, а NADH-оксидазы и глутатион-редуктазы – в мкмоль/мин·мг белка. Белок определяли по методу, предложенному Bradford [17].

Активность ацил-СоА-синтетазы определяли по изменению концентрации олеил-СоА в реакционной смеси с помощью жидкостного хроматографа с масс-спектроскопическим детектором LCMS-QP8000α, элюцию осуществляли на обратнофазной колонке Restec Allure C18 (150×4,6 мм, 60 Å), спектры поглощения регистрировали в потоке с помощью детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M10Avp при длине волны 254 нм (спектрофотометр Cary 50 Scan, Varian, Австралия) [18]. Активность фермента выражали в мкг<sub>олеилСоА</sub>/мин·мг<sub>белка</sub>.

Измерение концентрации N-гексаноил-гомосерин лактонов проводили по известной методике [19].

### Результаты и их обсуждение

**Получение и характеристика штамма *P. aurantiaca* В-162/17 – продуцента феназиновых антибиотиков на минимальной среде М9.** В результате НГ-мутагенеза бактерий *P. aurantiaca* В-162/255 и последующего отбора мутантов, способных к продукции феназинов на среде М9, был получен новый штамм В-162/17, уровень синтеза феназинов у которого в этих условиях соответствовал 210 мг/л. Следует отметить, что клетки исходного штамма В-162/255 в условиях минимальной среды феназины вообще не синтезируют, а на полноценной среде ПСА их продукция, как уже указывалось, была равна 410 мг/л. Вместе с тем у мутанта В-162/17 способность к синтезу феназинов на среде ПСА сохранилась, однако ее уровень оказался таким же, как и на минимальной среде ( $\approx 210$  мг/л). При этом уменьшение количества синтезируемых феназинов у полученного штамма не было связано с более низкой жизнеспособностью клеток – их концентрация при культивировании на среде ПСА на момент учета продуктивности (на 4-е сут) равнялась  $5,37 \cdot 10^8$  кл./мл и была практически такой же, как для бактерий исходного штамма В-162/255 на среде ПСА ( $6,56 \cdot 10^8$  кл./мл) за аналогичный период культивирования.

Далее, для мутанта В-162/17 была осуществлена оптимизация условий, обеспечивающих максимальный выход феназинов – продолжительность культивирования, аэрация, подбор источников углерода, в том числе этанола, и иных питательных субстратов (дрожжевого экстракта, соевого экстракта), оказывающих, как известно, положительный эффект на синтез данного антибиотика [5].

Было установлено, что при культивировании клеток штамма В-162/17 на среде М9, штамма В-162/255 – на среде ПСА при 28 °С без аэрации и начальном уровне ОП при 600 нм 0,0336 наиболее высокий уровень продукции феназинов регистрировался для В-162/17 уже на 4 сут, тогда как для В-162/255 – лишь на 5 сут (рис. 1). Вместе с тем исследование динамики синтеза феназинов клетками обоих штаммов В-162/17 и В-162/255 показало, что синтез антибиотиков у них начинается раньше, чем у дикого типа *P. aurantiaca* В-62, и регистрируется уже на 2-е сут, тогда как у последних, как было установлено ранее [20], только на 3-е сут.

В отличие от бактерий исходного штамма В-162/255, у которых синтез феназинов протекает одинаково в условиях аэрации и без нее, для мутантных бактерий В-162/17 этот параметр оказался важным, особенно на начальных этапах культивирования. В условиях аэрации уровень синтеза феназинов был выше в течение первых 3 сут (рис. 2 а), что коррелировало с более высокой скоростью роста культуры (рис. 2 б). На 4-е сут количество накапливаемых в среде феназинов выравнивалось, несмотря на то, что рост культуры продолжался.

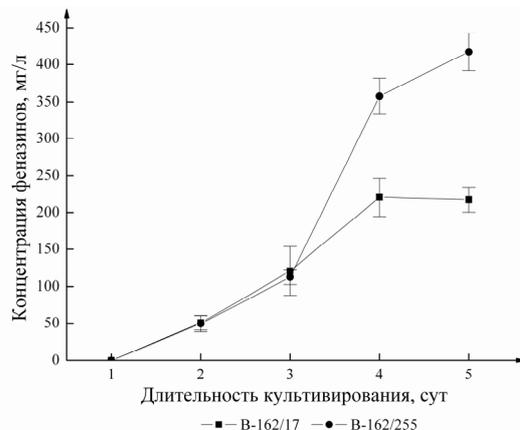


Рис. 1. Зависимость уровня продукции феназиновых антибиотиков от длительности культивирования

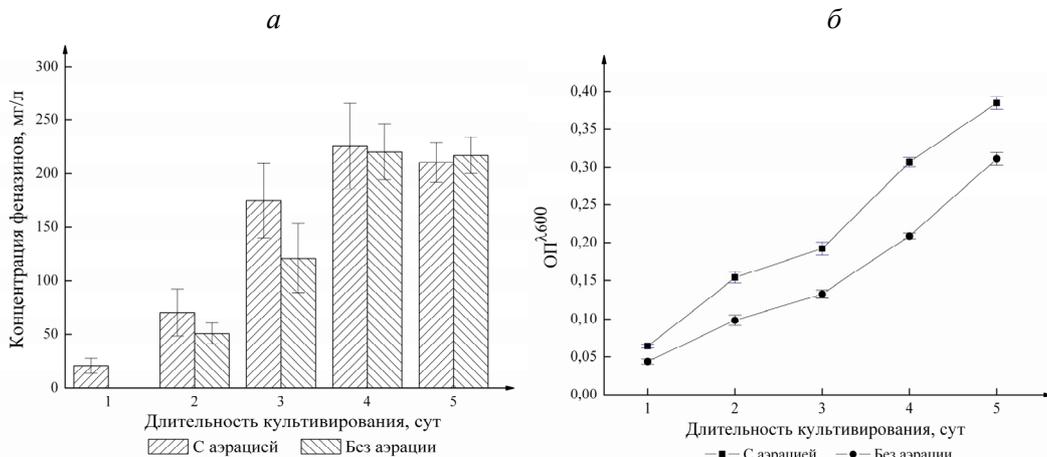


Рис. 2. Влияние аэрации на синтез феназинов бактериями штамма В-162/17: а – динамика синтеза феназинов, б – динамика роста культуры (начальный уровень ОП при 600 нм 0,0336, культивирование осуществляли на среде М9)

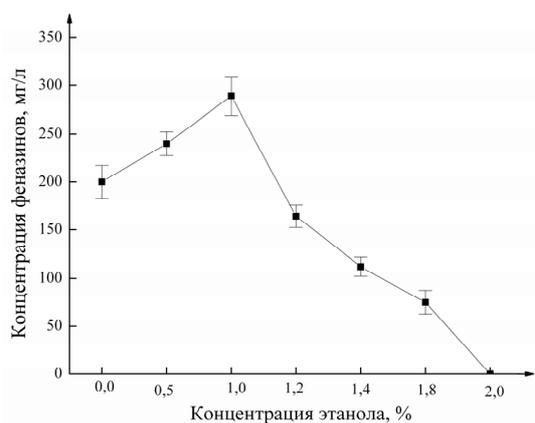


Рис. 3. Влияние различных концентраций этанола на синтез феназинов у бактерий штамма B-162/17 (культивирование осуществляли на среде M9 при 28 °С в течение 4 сут в отсутствие аэрации)

Проверка способности бактерий B-162/17 синтезировать феназины при культивировании на других источниках углерода, взятых в той же концентрации, что и глюкоза (0,8 %) – на фруктозе, манните, маннозе, сахарозе, сукцинате, лактозе, мальтозе, глицерине, арабинозе, цитрате, *n*-аминобензоате, *n*-оксибензоате, антранилате или малонате, показала, что наиболее высокий их выход наблюдался лишь на средах, содержащих арабинозу, маннит или глицерин (уровни продукции 306 мг/л, 334 мг/л, 350 мг/л соответственно), что в 1,5÷1,7 раза выше, чем на глюкозе. На остальных источниках углерода продукция феназинов была ниже либо вообще отсутствовала (например, при использовании антранилата, *n*-аминобензоата, *n*-оксибензоата и малоната). Добавление в среду культивирования дрожжевого экстракта (в концентрации 1,5 %) либо соевого экстракта (3,3 %) также способствовало увеличению продукции феназинов в 1,2 и 1,5 раза соответственно.

**Роль QS-системы в продукции феназинов у мутанта B-162/17.** Как уже указывалось, мутация *rpeA*-гена, вызывающая у бактерий *P. aureofaciens* 30-84 RpeA способность синтезировать феназины на минимальной среде, не оказывала влияния на QS-систему (quorum sensing-system) [6]. Представлялось интересным изучение этого вопроса для бактерий полученного нами штамма B-162/17. Анализ уровня синтеза *N*-гексаноил-гомосерин лактона (ранее было показано, что бактерии *P. aurantiaca* B-162 синтезируют именно этот тип гомосерин лактонов [20]) показал, что у мутанта B-162/17 он не изменился и был практически одинаковым с таковым для исходного штамма B-162/255. Следовательно, мутация, вызвавшая у бактерий B-162/17 способность к синтезу феназинов на минимальной среде, так же как и в случае *rpeA* мутации у *P. aureofaciens*, не влияет на работу их QS-системы. Скорее всего, у мутантных бактерий B-162/17 имеет место нарушение иного регуляторного механизма, в норме определяющего рецепцию сигналов о состоянии внешней среды (наличие в ней тех или иных питательных веществ) и направляющего клеточный метаболизм на синтез феназинов на полноценных средах и одновременно блокирующего этот процесс на минимальных средах. Отсутствие этого сигнала ведет к запуску синтеза феназинов как на минеральной, так и богатой питательными веществами среде. Наиболее вероятным геном-кандидатом, мутация в котором может обеспечить подобные эффекты у бактерий изучаемого штамма, может быть *rpeA*-ген. Однако попытки обнаружить его наличие в геноме бактерий B-162/17 с помощью ПЦР-анализа с использованием известных праймеров [6, а также данные NCBI Blast] оказались безуспешными (данные не приводятся).

**Механизмы устойчивости бактерий B-162/17 к собственным феназинам.** Следующий этап работы заключался в изучении механизмов устойчивости клеток полученного штамма B-162/17 к собственным феназинам. Исходя из известного механизма действия данных соединений, у бактерий B-162/17 были исследованы уровни синтеза наиболее известных компонентов антиоксидантного комплекса – каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), *NADH*-оксидазы, глутатиона, а также фермента, отвечающего за его превращение из окисленной формы в восстановленную. Кроме того, изучали активность одного из ключевых ферментов клеточного метаболизма – ацил-*CoA*-синтетазы.

Исследование удельной активности каталазы показало, что ее синтез у мутантных бактерий B-162/17 возрастает в 6 раз по сравнению с таковым для штамма B-162phz<sup>-</sup>, дефектного по синтезу

Известно, что добавление в среду для культивирования бактерий этанола в качестве дополнительного источника углерода способствует увеличению продукции феназиновых соединений [5]. Природа этого явления в настоящее время еще не изучена. Из результатов, представленных на рис. 3, видно, что в присутствии этанола у мутанта B-162/17 также регистрируется повышение уровня синтеза феназинов. Например, при 1 % его концентрации продукция антибиотиков увеличивается в 1,5 раза и достигает 300 мг/л. Однако более высокие концентрации этанола (до 2 %) приводят к резкому снижению синтеза феназинов. На средах, содержащих этанол в качестве единственного источника углерода, продукция феназинов у бактерий B-162/17 вообще не регистрировалась, несмотря на то, что для них он является утилизируемым субстратом.

феназинов (рис. 4 а). В то же время для бактерий В-162/255 показатели удельной активности данного фермента оказались сниженными в 2,8 раза. Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения современных представлений о механизме действия феназинов [21], в соответствии с которым эти вещества легко покидают бактериальные клетки и генерируют образование  $O_2^-$  в окружающей среде, ввиду высокой реакционной способности мгновенно вступать в реакции спонтанного превращения с образованием пероксида водорода – индуктора синтеза каталазы. Поскольку бактерии штамма В-162/17 характеризуются более низким уровнем продукции феназинов по сравнению с В-162/255 (210 и 410 мг/л соответственно), уровень синтеза каталазы у них не достигает значений, характерных для бактерий с более высоким уровнем выхода антибиотиков.

Неожиданным явился факт, что удельная активность другого фермента антиоксидантного комплекса – СОД у бактерий В-162/17, наоборот, оказалась повышенной в 2,2 раза по сравнению с В-162/255 (и в 8 раз по сравнению с 162phz<sup>-</sup>) (рис. 4 б). Первоначально предполагалось, что уровень активности данного фермента, так же как и в случае каталазы, будет возрастать по мере увеличения продукции феназинов, и для бактерий штамма В-162/17 он будет ниже, чем для В-162/255. Возможной причиной наблюдаемого явления могли быть различные условия выращивания бактерий обоих штаммов для получения клеточных экстрактов (клетки В-162/17 культивировали на минимальной среде М9, а В-162/255 – на полноценной среде ПСА). Определение активности каталазы и СОД у мутантных бактерий В-162/17, выращенных на среде ПСА, показало, что их активность оказалась практически такой же, как и при выращивании бактерий на минимальной среде ( $8,7 \pm 2,1$  ммоль/мин × мг белка для каталазы и  $56,2 \pm 9,1$  у. е. × мг белка – для СОД, а также см. рис. 4 а, б).

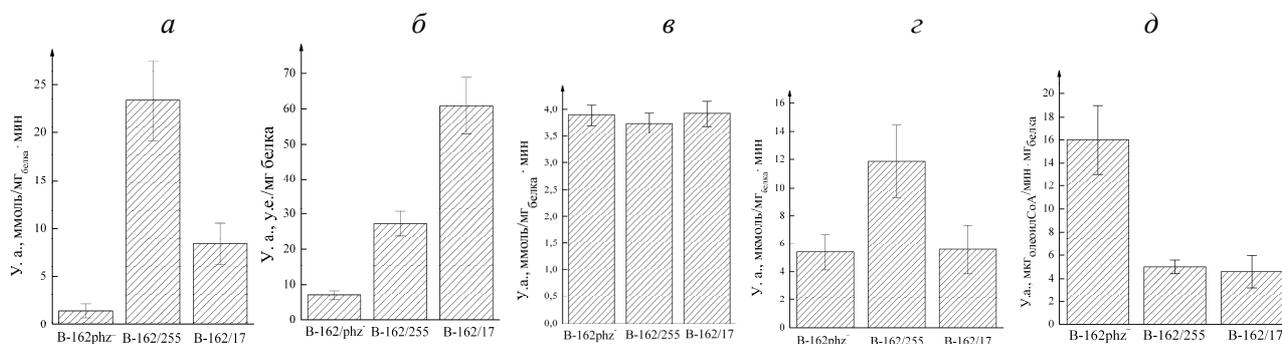


Рис. 4. Активность ферментов антиоксидантного комплекса у бактерий штаммов В-162/17 и В-162/255. Удельная активность 9 (у. а.): а – каталазы, б – СОД, в – NADH-оксидазы, г – глутатион-редуктазы, д – ацил-СоА-синтетазы

Известно, что у микроорганизмов одна из наиболее распространенных изоформ СОД, а именно Fe-СОД [22], чувствительна к высоким концентрациям пероксида водорода и подвержена ингибированию в его присутствии при достижении определенного порогового уровня [23]. Можно предположить, что у бактерий В-162/17 уровень образования активных форм кислорода (или  $H_2O_2$ ) под действием феназинов еще не достиг порогового уровня и недостаточен для подавления активности (или синтеза) СОД, что и обеспечивает им более высокие показатели удельной активности фермента.

Ранее было установлено, что концентрация глутатиона в клетках некоторых бактерий (*Haemophilus influenzae*, *Rhizobium tropici*) может повышаться в присутствии пероксида водорода, причем действие последнего дозозависимо [24]. Особенностью бактерий рода *Pseudomonas* является то, что у них уровень глутатиона в клетках изначально достаточно высокий [25].

Представлялось интересным провести сравнительный анализ содержания глутатиона у бактерий В-162/17 и В-162/255, а также определить соотношение у них его окисленной и восстановленной форм. Как видно из данных таблицы, в клетках изучаемых штаммов действительно имеется относительно высокий исходный уровень глутатиона. Например, даже не синтезирующие феназины бактерии В-162phz<sup>-</sup> накапливают до 17 нМ глутатиона, при этом его концентрация у бактерий В-162/17 и В-162/255 коррелирует с уровнем синтеза феназиновых антибиотиков. В частности, для бактерий В-162/17 зарегистрировано увеличение суммарной концентрации глутатиона в 4,5 раза, а для бактерий штамма 162/255 – в 8,4 раза.

Следует отметить, что соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона у мутанта В-162/17 оказалось ниже, чем у бактерий В-162/255 phz<sup>-</sup>, что согласуется с показателями активности глутатион-редуктазы – фермента, переводящего окисленный глутатион в восстановленную форму

(рис. 4 з). Более низкое содержание глутатиона в восстановленной форме в клетках мутанта В-162/17 может быть связано с избыточным уровнем синтеза СОД, который начинает играть основную роль в защите клеток от окислительного стресса, тогда как роль глутатион-редуктазы снижается. Наоборот, у бактерий В-162/255 уровень синтеза этого фермента повышается на фоне более низкого уровня синтеза СОД. Ранее подобный компенсаторный эффект для СОД и глутатион-редуктазы наблюдался нами и у других штаммов *P. aurantiaca*, отличающихся уровнями синтеза феназинов [26].

Таким образом, установлено, что у бактерий В-162/17 сверхпродукция феназинов при культивировании на минимальной среде приводит к индукции синтеза ферментов СОД, каталазы, а также глутатиона. По-видимому, для бактерий со средним уровнем синтеза феназинов (например, 210 мг/л) глутатион-редуктаза не играет существенной роли в защите собственных клеток от окислительного стресса, вызванного феназинами.

Активность NADH-оксидазы, роль которой в защите от окислительного стресса, особенно у факультативно анаэробных микроорганизмов (в частности, *Lactococcus lactis*), хорошо известна [27], у всех изучаемых штаммов оказалась одинаковой и не зависела от характерных для них уровней продукции феназинов (рис. 4 в). Данный механизм защиты от окислительного стресса вообще не участвует в формировании ответа клеток на повышение уровня синтеза феназинов у бактерий *P. aurantiaca* в целом.

Известно, что феназиновые антибиотики являются специфическими ингибиторами активности ацил-СоА-синтетазы, а снижение ее чувствительности к этим соединениям рассматривается как один из возможных механизмов формирования устойчивости к феназинам [28]. Анализ активности ацил-СоА-синтетазы у продуцирующих феназины мутантов В-162/17 и В-162/255 выявил значительное снижение этого показателя (рис. 4 д), причем в равной степени для обоих штаммов, несмотря на то, что уровень синтеза данных соединений у последнего был в два раза выше. Очевидно лишь то, что у исследуемых бактерий В-162/17 ацил-СоА-синтетаза является одной из чувствительных мишеней действия феназиновых антибиотиков. Однако снижение активности фермента, по-видимому, не критично для бактерий *P. aurantiaca* и даже низкие его значения ( $4,6 \text{ мкг}_{\text{олеоилСоА}}/\text{мин} \times \text{мг}_{\text{белка}}$ ) позволяют обеспечивать нормальную жизнедеятельность клеток и синтез феназинов в достаточно высоких концентрациях.

Таким образом, в данной работе получен новый штамм *P. aurantiaca* В-162/17, который, в отличие от большинства известных продуцентов феназиновых антибиотиков, синтезирует их на минимальной среде. Продукционная способность клеток этого штамма на среде М9, содержащей глюкозу (0,8 %), соответствует 210 мг/л. Оптимизация условий синтеза феназинов позволила установить, что положительный эффект оказывает этанол в концентрации 1 %, который повышает выход антибиотиков на минимальной среде в 1,5 раза, углеводы – арабиноза, маннит и глицерин (0,8 %) – в 1,5÷1,7 раза, дрожжевой экстракт (1,5 %) и соевый экстракт (3,3 %) – 1,2 и 1,5 раза соответственно. Оптимальным для выхода феназинов у бактерий В-162/17 является культивирование их в течение 4 сут с аэрацией.

Установлено, что приобретение бактериями штамма В-162/17 способности синтезировать феназины на минимальной среде не связано с изменением работы их QS-системы. Сделано предположение, что в основе этого явления лежит мутация *rpeA*-гена.

Показано, что бактерии штамма В-162/17 при культивировании на минимальной среде, формируют ответ на окислительный стресс, вызванный избыточными количествами данных антибиотиков – происходит индукция синтеза каталазы и СОД, удельная активность которых возрастает в 6 и 8 раз соответственно, а также глутатиона (его концентрация повышается в 4,5 раза). Для СОД и глутатион-редуктазы зарегистрирован взаимный компенсаторный эффект – у бактерий В-162/17 при увеличении уровня синтеза СОД синтез глутатион-редуктазы снижается, а у В-162/255, наоборот, при снижении уровня синтеза СОД синтез глутатион-редуктазы повышается. NADH-оксидаза у бактерий В-162/17 не участвует в обеспечении устойчивости к феназинам, а активность ацил-СоА-синтетазы снижается.

1. Dwivedi D., Johri B.N. // Current science. 2003. Vol. 85. № 12. P. 1693.

2. Black P.N., Faergeman J.N., DiRusso C.C. // J. Nutr. 2000. Vol. 130. P. 305.

3. Kyoung-Ja K. // J. Biochem Mol. Biol. 2000. Vol. 33. № 4. P. 332.

4. Ge Y., Huang X., Wang S. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 237. № 1. P. 41.

5. Li Y., Jiang H., Xu Y., Zhang X. // Appl Microbiol Biotechnol. 2008. Vol. 77. P. 1207.

6. Whistler C.A., Pierson III. L.S. // J. of Bacteriol. 2003. Vol. 185. № 13. P. 3718.

7. Веремеенко Е.Г., Федорович М.Н., Феклистова И.Н., Максимова Н.П. // Вестн. БГУ. 2009. Сер. 2. № 2. С. 44.

8. V. de Lorenzo, Herrero M., Timmis K. // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172. № 11. P. 6557.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984.
10. Levitch M.E., Stadtman E.R. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. Vol. 106. P. 194.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
12. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. // Вопр. мед. химии. 1990. Т. 36. № 2. С. 88.
13. Aebi H. // Methods in Enzymol. 1984. Vol. 105. P. 121.
14. Lopez F., Kleerebezem M., Hugenholtz J. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. № 15. P. 3804.
15. Senft A., Dalton T., Shertzer H. // Analyt. Biochem. 2000. Vol. 280. P. 80.
16. Li Y., Hugenholtz J., Abee T., Molenaar D. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. № 10. P. 5739.
17. Bradford J.K. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248.
18. Hiroshi T., Kazuaki I., Satoshi O. // Biochim Biophys Acta. 1987. Vol. 921. P. 595.
19. Blosser R.S., Gray K.M. // J. Microbiol Methods. 2000. Vol. 40. P. 47.
20. Феклистов И.Н. Синтез антибиотиков ароматической природы у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* B-162: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Мн., 2006.
21. Moustafa Hassan H., Fridovich I. // J. Bacteriol. 1980. Vol. 141. № 1. P. 156.
22. Vance C.K., Miller A. // Biochem. 2001. № 40. P. 13079.
23. Miller A. Handbook of Metalloproteins: Fe superoxide dismutase. Chichester, 2001. P. 668.
24. Vergauwen B., Pauwels F., Van Beeumen J. // J. Bacteriol. 2003. Vol. 185. № 18. P. 5555.
25. Hultberg M. // Current Microbiol. 1998. Vol. 37. P. 301.
26. Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П. // Труды Белорусского государственного университета. 2009. Т. 4. Ч. 1. С. 161.
27. Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J. et al. // Gen. Mol. Res. 2003. Vol. 2. № 4. P. 348.
28. Kyoung-Ja K. // J. Biochem Mol. Biol. 2000. Vol. 33. № 4. P. 332.

Поступила в редакцию 02.03.10.

**Екатерина Геннадьевна Веремеенко** – аспирант кафедры генетики. Научный руководитель – Н.П. Максимова.  
**Владимир Васильевич Лысак** – кандидат биологических наук, доцент, декан биологического факультета.  
**Наталья Павловна Максимова** – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой генетики.