



УДК 579.222+57.033+57.037

СУЛЬФУРРЕДУКТАЗНА АКТИВНІСТЬ *DESULFUROMONAS* SP. YSD S-3 ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

О. М. Чайка, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: O-Chajka@i.ua

Дослідили сульфурредуктазну активність сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 за впливу аерації, рН і температури. Найвища сульфурредуктазна активність виявлена в культуральній рідині (48,4 мкМ H_2S / (хв×мг білка), в осадовій фракції – у 40 разів нижча, а в розчинній фракції активність ензиму не виявлено. Сульфурредуктаза бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 чутлива до кисню і є індукцибельним ензимом. Максимальну сульфурредуктазну активність виявлено на 5–7-му доби культивування бактерій і становить 47,4 мкМ H_2S / (хв×мг білка). Оптимальною для сульфурредуктазної активності бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 є температура 30 °С і рН 7,5. Константа Міхаеліса (K_m) ензиму становить $0,22 \pm 0,01$ мкМ, максимальна швидкість реакції (V_{max}) – $18,2 \pm 0,8$ мкМ H_2S / (хв×мг білка).

Ключові слова: сірковідновлювальні бактерії, сульфурредуктаза, гідрогеназа, гідроген сульфід, сірка.

ВСТУП

Здатність відновлювати сірку, використовуючи молекулярний водень або органічні субстрати як донори електронів, широко розповсюджена серед еубактерій і археїв [7].

Більшість описаних видів мезофільних і термофільних сірковідновлювальних бактерій належить до домену *Bacteria* і одержує енергію у процесі дисиміляційного відновлення елементної сірки з утворенням гідроген сульфиду [19].

Відомо, що у відновленні сірки у клітинах бактерій беруть участь ензиму сульфурредуктаза (КФ 1.97.1.3) і гідрогеназа (КФ 1.12.7.2) [7]. Досліджено механізм відновлення сірки у мезофільних бактерій *Wolinella succinogenes*, які використовують молекулярний гідроген або форміат як донор електронів [7, 11, 15, 19].

У відновленні полісульфідної форми сірки бактерій *W. succinogenes* беруть участь два ензими: полісульфідредуктаза (КФ 1.12.98.4) (Psr) і гідрогеназа (КФ 1.12.7.2) (Hud). Встановлено, що Psr складається з трьох субодиниць: Psr A, Psr B, Psr C. Субодиниці Psr A і Psr B – це гідрофільні білки, тоді як Psr C має гідрофобну природу і виконує функцію мембранного якоря [7, 19]. Під час окиснення водню чи форміату електрони переносяться від гідрогенази через цитохром *b*

і хінон до полісульфідредуктази, створюючи електрохімічний градієнт. Однак механізм дії протонного насоса і синтезу АТФ у бактерій *W. succinogenes* до кінця не з'ясований [7]. Аналогічний механізм відновлення сірки було виявлено і в інших автотрофних мікроорганізмів, зокрема, у гіпертермофільних бактерій *Aquifex aelicus* і гіпертермофільних архей *Acidianus ambivalens* [5, 9, 10].

Із клітин хемолітотрофних і гіпертермофільних архей *Pyrodictium abyssii* виділено мембранозв'язуючий електронтранспортний H_2 : сульфурооксидоредуктазний комплекс, який каталізує H_2 -залежне відновлення сірки до гідроген сульфіді [2, 7]. Цей комплекс складається з дев'яти субодиниць, у тому числі NiFe – гідрогенази, сульфурредуктази і цитохромів типу *b* і *c*. На відміну від *P. abyssii*, у *W. succinogenes* обидва ензими розміщені з внутрішнього боку мембрани і не утворюють мультиензимного комплексу. Функціонально подібний електронтранспортний комплекс виявлено у близькоспорідненого виду *Pyrodictium brocii*, що містить два окремих ензими, як у *W. succinogenes* [7].

У клітинах гіпертермофільних архей *Pyrococcus furiosus*, які отримують енергію шляхом зброджування пептидів, виявлено сульфгідрогеназу і сульфіддегідрогеназу, котрі відновлюють елементну сірку до гідроген сульфіді [13, 16]. Сульфгідрогеназа каталізує відновлення сірки чи полісульфіді, використовуючи ферредоксин як донор електронів, а також функціонує як гідрогеназа. Інший ензим – сульфіддегідрогеназа – каталізує відновлення полісульфіді до гідроген сульфіді, використовуючи НАДФН⁺ і відновлений ферредоксин як донор електронів. На відміну від сульфгідрогенази, сульфіддегідрогеназа не окиснює H_2 і є флавопротеїном, який містить ферум [7, 13, 16].

Сірковідновлювальні бактерії широко розповсюджені у природі. Особливо важлива їхня роль у перетворенні сірки в місцях сірковидобувних регіонів. Разом зі сульфатвідновлювальними бактеріями вони є основними продуцентами гідроген сульфіді у природі [1]. Відновлення елементної сірки мезофільними сірковідновлювальними бактеріями, виділеними із ґрунтів Язівського родовища сірки, практично не досліджено, тому метою нашої роботи було дослідити сульфурредуктазну активність *Desulfuromonas* sp. YSD S-3, виділених із природних середовищ, збагачених елементною сіркою.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas* sp. YSD S-3, виділені з ґрунтів Язівського родовища сірки (Прикарпаття, Яворівський район, Львівська область, Україна) [3].

Для порівняння сульфурредуктазної активності використали сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384 [2], виділені з води озера Яворівське, що лежить на території Язівського родовища сірки. Штами зберігаються в колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка. Бактерії вирощували у середовищі Постгейта С без сульфатів такого складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,5; NH_4Cl – 1,0; $CaCl_2 \times 6H_2O$ – 0,06; $MgCl_2 \times 6H_2O$ – 0,05; натрій лактат (40%) – 12 мл; дріжджовий екстракт – 1,0; натрій лимоннокислий – 0,3; аскорбінова кислота – 1,0; елементна сірка – 1,0; вода дистильована до 1 л; рН 7,5 [14]. Середовище стерилізували за 1 атм упродовж 30 хв і розливали у пробірки (25 мл), закривали стерильними гумовими корками, так щоб у них не залишилося повітря. Середовище засівали суспензією клітин (0,2 г/л)

і культивували за 30 °С упродовж 5–14 діб. Під час дослідження активності ензиму за різних умов культивування у середовище замість натрій лактату вносили натрій ацетат (53 мМ) і фумарову кислоту (53 мМ).

Сульфурредуктазну активність бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 визначали у культуральній рідині, від якої клітини відділяли центрифугуванням за 4000 г (центрифуга ОС – 6 М) упродовж 30 хв. Клітини двічі промивали 10 мМ калій фосфатним буфером, рН 7,5, руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т частотою 22 кГц упродовж 5 хв. Супернатант (розчинну фракцію) відділяли центрифугуванням клітинного екстракту за 9 000 г (центрифуга К 24) упродовж 30 хв, клітинний екстракт (осадову фракцію) ресуспендували в екстрагуючому буфері (50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,5; 10⁻⁵ М ЕДТА; 10⁻⁵ М ФМСФ). Сульфурредуктазну активність (А) визначали за кількістю гідроген сульфіді, що утворювався у процесі реакції [17]. Реакційна суміш для визначення сульфурредуктазної активності мала такий склад: калій фосфатний буфер (рН 7,5) – 440 мкл; елементна сірка – 0,04 г; 10 мМ НАДН⁺ – 120 мкл; 10 мМ ЕДТА – 120 мкл; гліцерин – 120 мкл; культуральна рідина – 400 мкл [17]. Досліджуючи активність сульфурредуктази в осадовій і розчинній фракції, в реакційну суміш додавали калій фосфатний буфер (рН 7,5 720 мкл), осадову або розчину фракції (120 мкл). Сульфурредуктазну активність визначали за анаеробних умов. З цією метою реакційну суміш переносили у пробірки, наповнені аргоном. Для підтвердження умов анаеробіозу використовували індикатор анаеробних умов – Anaer Indicator (bioMerieux, France). Час інкубації 10 хв. Реакцію починали додаванням НАДН⁺ і зупиняли 2 М NaOH (0,4 мл). Вміст гідроген сульфіді визначали за методом утворення метиленової сині [18]. За одиницю активності ензиму приймали 1 мкМ H₂S / (хв мг×білка). Для дослідження впливу рН на активність ензиму використовували такі буфери: 0,1 М гліцин-HCl буфер, рН 2,2–3; 0,1 М натрій ацетатний буфер, рН 4–5; 0,1 М калій фосфатний буфер, рН 6–8; 0,1 М гліцин-NaOH буфер, рН 9 [8]. Для дослідження основних кінетичних параметрів ензиму в реакційну суміш додавали елементну сірку в кількості 5, 10, 15, 20, 40 мг. Константу Міхаеліса (K_m) і максимальну швидкість (V_{max}) розраховували, використовуючи графік Лайнуївера–Берка (метод подвійних зворотних величин). Сульфурредуктазну активність визначали за температури 30 °С після інкубування культуральної рідини в буфері протягом 20 хв. Для дослідження впливу температури на активність ензиму сульфурредуктазну активність визначали за температури 15, 20, 30, 40 і 50 °С. Клітини бактерій і культуральну рідину відбирали з кінця логарифмічної фази росту.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [11].

Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта. Достовірність змін визначали за *t*-критерієм Стьюдента, константу Міхаеліса (K_m) та максимальну швидкість (V_{max}) розраховували застосовуючи регресійний аналіз [6]. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму “Microsoft Excel 2010”, “Origin 6.1”.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідили сульфідогенну активність бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 у середовищі з елементною сіркою і натрій лактатом. Найвищу сірковідновлювальну активність бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3

виявлено на 7–8-му доби культивування (рис. 1). Максимальна концентрація гідроген сульфід становила 3,2 мМ, що у 1,5 разу вища ніж у контрольному штамі. Тому бактерії *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 можуть бути ефективними агентами у детоксикації середовища від йонів важких металів.

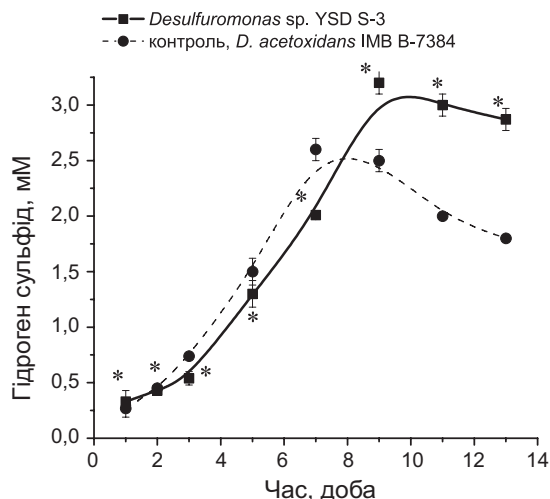


Рис. 1. Нагромадження гідроген сульфід у бактеріями *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 у середовищі з елементною сіркою і натрій лактатом ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни концентрації гідроген сульфід порівняно з контролем

Fig. 1. The accumulation of hydrogen sulfide by bacteria *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 and *D. acetoxidans* IMV B-7384 in the presence of elemental sulfur and sodium lactate ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * – $P < 0.05$ – significant changes of hydrogen sulfide compared to control

Відомо, що у бактерій *W. succinogenes* відновлення полісульфідів відбувається у периплазмі [7, 19], а у гіпертермофільних хемолітоавтотрофних бактерій *A. aeolicus* – у цитоплазмі [5]. Для визначення імовірної локалізації ензиму в *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 було визначено сульфурредуктазну активність у культуральній рідині, розчинній і осадовій фракціях (рис. 2). Найвища сульфурредуктазна активність виявлена в культуральній рідині, в осадовій фракції вона була у 40 разів менша, а в розчинній фракції сульфурредуктазної активності не виявлено, як і у контрольного штаму. Отже, можна припустити, що сульфурредуктаза бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 локалізована в цитоплазматичній мембрані та що відновлення елементної сірки відбувається поза клітиною.

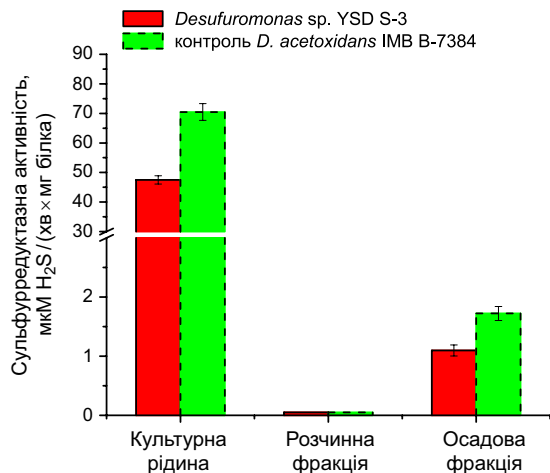


Рис. 2. Сульфурредуктазна активність *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 у різних фракціях ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни сульфурредуктазної активності порівняно з контролем

Fig. 2. Sulfur reducing activity of *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 and *D. acetoxidans* IMV B-7384 in various fractions ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * – $P < 0.05$ – significant changes of sulfur reducing activity compared to control

У результаті дослідження динаміки сульфурредуктазної активності *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 протягом 14-ти діб культивування з'ясовано, що максимальну сульфурредуктазну активність виявлено на 5–7-му доби культивування бактерій, як і у контрольного штаму, і вона становить 47,4 мкМ H_2S / (хв × мг білка) (рис. 3).

- сульфурредуктазна активність бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3
- ○ - контроль, сульфурредуктазна активність бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384
- нагромадження біомаси бактеріями *Desulfuromonas* sp. YSD S-3
- □ - контроль, нагромадження біомаси бактеріями *D. acetoxidans* IMB B-7384

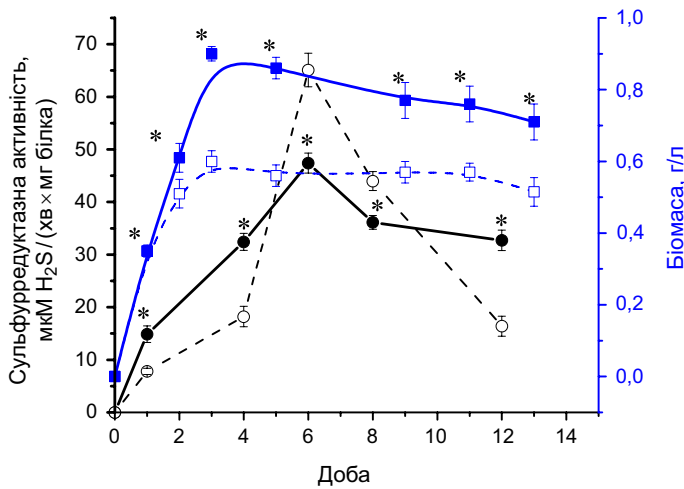


Рис. 3. Нагромадження біомаси та сульфурредуктазна активність бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 у культуральній рідині ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни сульфурредуктазної активності й біомаси порівняно з контролем

Fig. 3. The accumulation of biomass and sulfur reducing activity in the culture liquid of bacteria *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 and *D. acetoxidans* IMB B-7384 ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * – $P < 0.05$ – significant changes of biomass and sulfur reducing activity compared to control

Активність ензиму залежить від низки факторів, таких як, концентрація субстрату, температура і рН середовища, тому дослідили вплив температури і рН середовища на сульфурредуктазну активність *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 у культуральній рідині. Максимальну активність ензиму виявлено за температури 30 °C і рН 7,5 (рис. 4), як і у контрольного штаму.

Для з'ясування властивостей сульфурредуктази *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 дослідили вплив аерації і температури. Встановили, що за анаеробних умов активність сульфурредуктази становить 47,2 мкМ H_2S / (хв×мг білка) (табл. 1). Після експозиції культуральної рідини з повітрям на круговій качалці протягом однієї години активність знизилась у 5 разів. У разі нагрівання культуральної рідини до 80 °C протягом 10 хв в атмосфері аргону сульфурредуктазної активності не виявлено (табл. 1).

Щоб встановити, чи сульфурредуктаза є індукцибельним ензимом, бактерії вирощували у середовищах з ацетатом, лактатом, фумаратом і елементною сіркою. У середовищах з ацетатом і фумаратом і тільки з фумаратом, без елементної сірки,

сульфурредуктазної активності не виявлено (табл. 2). Активність ензиму виявлено за культивування бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 у середовищах із лактатом і елементною сіркою та ацетатом і елементною сіркою. Отже, одержані дані вказують на те, що сульфурредуктаза синтезується за наявності у середовищі лише елементної сірки, тобто є індуцибельним ензимом.

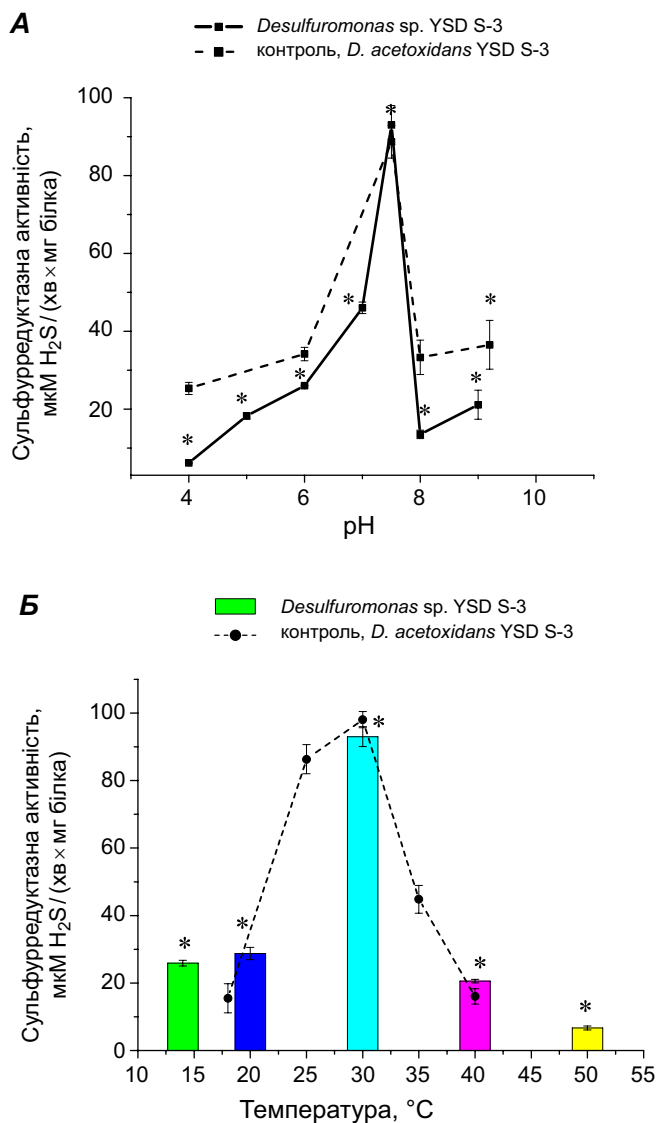


Рис. 4. Вплив pH (А) і температури (Б) на сульфурредуктазну активність бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 і *D. acetoxidans* IMB B-7384 ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * - $P < 0,05$ – вірогідні зміни сульфурредуктазної активності порівняно з контролем

Fig. 4. The effect of pH (A) and temperature (Б) on sulfur reducing activity of bacteria *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 and *D. acetoxidans* IMV B-7384 ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * - $P < 0.05$ – significant changes of sulfur reducing activity compared to control

Таблиця 1. Сульфурредуктазна активність сірковідновлювальних бактерій за різних умов інкубування ($M \pm m$, $n = 3$)**Table 1. Sulfur reducing activity of sulfur reducing bacteria under different conditions of incubation ($M \pm m$, $n = 3$)**

Умови інкубування	Сульфурредуктазна активність, мкМ H_2S / (хв × мг білка)	
	<i>Desulfuromonas</i> sp. YSD S-3	<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384
Контроль (анаеробні)	47,4±2,4*	65,36±0,89
Аерація протягом однієї години	8,2±1,2*	6,36±1,04
Нагрівання до 80 °C за анаеробних умов	–	–

Примітки: “–” сульфурредуктазної активності не виявлено; * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни сульфурредуктазної активності порівняно з контролем

Comments: “–” no enzymatic activity; * – $P < 0.05$ – significant changes of sulfur reducing activity compared to control

Таблиця 2. Сульфурредуктазна активність сірковідновлювальних бактерій за наявності у середовищі різних донорів і акцепторів електронів ($M \pm m$, $n = 3$)**Table 2. Sulfur reducing activity of sulfur reducing bacteria at the presence of different electron donors and acceptors in the medium**

Донор електронів	Акцептор електронів	Сульфурредуктазна активність, мкМ H_2S / (хв × мг білка)	
		<i>Desulfuromonas</i> sp. YSD S-3	<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384
Лактат	S^0	47,4±2,4*	61,76±1,4
Ацетат	S^0	15,6±0,86*	64,74±0,86
Ацетат	Фумарат	–	–
Фумарат	Фумарат	–	–

Примітки: “–” сульфурредуктазної активності не виявлено; * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни сульфурредуктазної активності порівняно з контролем

Comments: “–” No enzymatic activity; * – $P < 0.05$ – significant changes of sulfur reducing activity compared to control

Дослідженням основних кінетичних параметрів сульфурредуктази *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 в осадовій фракції встановлено, що за температури 30 °C і pH 7,5 K_m становить 0,22±0,01 мкМ, V_{max} – 18,2±0,8 мкМ H_2S / (хв×мг білка) (табл. 3).

Таблиця 3. Основні кінетичні параметри сульфурредуктази сірковідновлювальних бактерій ($M \pm m$, $n = 3$)**Table 3. The major kinetic parameters of sulfur reductase of sulfur reducing bacteria ($M \pm m$, $n = 3$)**

Вид	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ H_2S / (хв × мг білка)	pH	t , °C
<i>Desulfuromonas</i> sp. YSD S-3	0,22±0,01*	18,2±0,8*	7,5	30
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	0,65±0,078*	3,48±0,12	7,5	30

Примітка: * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни сульфурредуктазної активності порівняно з контролем

Comment: * – $P < 0.05$ – significant changes of sulfur reducing activity compared to control

K_m сульфурредуктази *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 удвічі нижча за K_m ензиму *D. acetoxidans* IMB B-7384, що вказує на більш високу спорідненість сульфурредуктази *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 до субстрату.

Одержані результати свідчать про поширення у ґрунтах Язівського родовища сірководновловлювальних бактерій, що проявляють високу сірководновловлювальну активність. Сульфурредуктаза *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 чутлива до кисню і проявляє вищу спорідненість до субстрату, порівняно з ензимами інших мікроорганізмів [5, 10, 12].

Одержані дані можуть бути використані для створення технологій проведення рекультивациі земель Язівського родовища сірки. Більш глибоке вивчення сірководновловлювальних бактерій допоможе покращити екологічну ситуацію в сірководобувних регіонах.

ВИСНОВКИ

У результаті дослідження сульфурредуктазної активності бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 встановлено, що найвища активність ензиму спостерігається в культуральній рідині. В осадовій фракції вона була у 40 разів нижча, а в розчинній фракції після руйнування клітин сульфурредуктазної активності не виявлено. Отже, можна припустити, що сульфурредуктаза бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 локалізована в цитоплазматичній мембрані, а відновлення елементної сірки відбувається поза клітиною.

Сульфурредуктаза бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 чутлива до кисню і є індукцибельним ензимом. Оптимальною для сульфурредуктазної активності бактерій *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 є температура 30 °C і pH 7,5. K_m ензиму становить $0,22 \pm 0,01$ мкМ, V_{max} – $18,2 \pm 0,8$ мкМ H_2S / (хв × мг білка).

1. Barton L.L., Fardeau M.L., Fauque G.D. Hydrogen sulfide: a toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. **Met. Ions Life Sci**, 2014; 14: 237–77.
2. Dirmeire R., Keller M., Frey G. et al. Purification and properties of an extremely thermostable membrane-bound sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic *Pyrodictium abyssi*. **Eur. J. Biochem**, 1998; 252: 486–491.
3. Чайка О., Перетятко Т., Гудзь С. Сульфурредукуючі бактерії Язівського родовища сірки. **Sci. Bull. Uzhgorod Univ.** (Ser. Biol), 2010; 28: 52–55. (In Ukrainian).
4. Гудзь С., Хнатущ С., Мороз О. et al. **Certificate of deposit strain of bacteria *Desulfuromonas acetoxidans* Ya-2006**. In the Depository Institute of Microbiology and Virology Danylo Zabolotny of NAS of Ukraine with the provision of registration number IM B-7384 of 10 April 2013 (In Ukrainian).
5. Guiral M., Tron T., Aubert C. et al. Membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. **J. Biol. Chem**, 2005; 280 (51): 42004–42015.
6. Gumeczkyj R.Ya., Palyanycya B.M., Chaban M.E. **Mathematical methods in biology: theoretical knowledge, practical programmable, computer tests**. Lviv, 2004. 111 p. (In Ukrainian).
7. Hedderich R., Klimmek O., Kroger A. et al. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. **FEMS Microbiol. Reviews**, 1999; 22: 353–381.

8. Kalinin F.L., Popov V.P., Zhidkov V.A. **Handbook of biochemistry**. Kyiv: Naukova Dumka, 1971. 1012 p. (In Russian).
9. Kletzin A., Ulrich T., Muller F. et al. Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic Archaea. **J. Bioenerg. and Biomem.** 2004; 36(1): 77–91.
10. Laska S., Lottspeich F., Kletzin A. Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. **Microbiology**, 2003; 149: 2357–2371.
11. Lin Y.J., Dancea F., Löhr F., Klimmek O. et al. Solution structure of the 30 kDa polysulfide-sulfur transferase homodimer from *Wolinella succinogenes*. **Biochemistry**, 2004; 43(6): 1418–24.
12. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et al. Protein determination with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 1951; 193: 265–275.
13. Ma K., Adams W. Sulfide dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new multifunctional enzyme involved in the reduction of elemental sulfur. **J. Bacteriol.** 1994; 176 (21): 6509–6517.
14. Postgate J. **The sulfate-reducing bacteria**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University, 1984. 199 p.
15. Rabus R., Hansen T., Widdel F. **Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community**. 3rd ed. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. New York: Springer-Verlag, 2000. Online.
16. Schut G., Bridger S., Adams W. Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. **J. Bacteriol.** 2007; 189(12): 4431–4441.
17. Sugio D., Oda C., Matsumoto K. et al. Purification and characterization of sulfur reductase from a moderately thermophilic bacterial strain, TI-1, that oxidizes iron. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 1998; 62(4): 705–709.
18. Sugiyama M. **Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide**. United States Patent N 6340596, 2002.
19. Widdel F., Hansen T. **The Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. The prokaryotes**. 2nd ed. In: Balows A. New York: Springer-Verlag, 1992: 583–624.

SULFUR REDUCING ACTIVITY OF *DESULFUROMONAS* SP. YSD S-3 BACTERIA UNDER CULTIVATION AT DIFFERENT CONDITIONS

O. Chayka, T. Peretjatko, S. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: O-Chajka@i.ua

The sulfur reducing activity of sulfur-reducing bacteria *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 for the influence of aeration, pH and temperature was studied. The highest sulfur reducing activity was found in culture fluid (48.4 $\mu\text{MH}_2\text{S}$ / (min \times mg of protein), in sedimentary fraction it was 40 times lower, and in the soluble fraction after destruction of cells sulfur reducing activity it was not detected. Probably, the sulfur reductase of *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 is localized in the cytoplasmic membrane and the reduction of sulfur is performed outside the cell. The sulfur reductase of *Desulfuromonas* sp. YSD S-3 is sensitive to oxygen and is an inducible enzyme. Maximal sulfur reducing activity occurs on the 5–7 day during the stationary phase of growth and reaches 47.4 $\mu\text{MH}_2\text{S}$ / (min \times mg of protein). 30 °C and pH 7.5 are optimal conditions for sulfur reducing activity

of *Desulfuromonas* sp. YSD S-3. Michaelis constant (K_m) of sulfur reductase is 0.22 ± 0.01 mM, maximal velocity (V_{max}) – 18.2 ± 0.8 μM of H_2S / (min \times mg).

Keywords: sulfur-reducing bacteria, sulfur reducing activity, sulfur reductase, hydrogenase, hydrogen sulfide.

Одержано: 30.11.2016