

ВПЛИВ СПОЛУК ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

Супероксиддисмутаза як один із ензимів антиоксидантної системи захисту клітин каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикалу (O_2^-) з утворенням O_2 та H_2O_2 . Досліджено вплив сполук перехідних металів, зокрема $FeSO_4$, $FeCl_3$, $MnCl_2$, $NiCl_2$ та $CoCl_2$ на активність супероксиддисмутази сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans*. Максимальну активність досліджуваного ензиму спостерігали за впливу 1,0 мМ $NiCl_2$, 2,0 мМ $CoCl_2$ і $MnCl_2$ відповідно на другу добу, та за впливу 1,0 мМ $FeCl_3$ і $FeSO_4$ на третю добу культивування, порівняно з контролем. Збільшення часу культивування та концентрації сполуки металу в середовищі зумовлювали пригнічення активності супероксиддисмутази.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, сіркобактерії, *Desulfuromonas acetoxidans*, перехідні метали, Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} .

Перехідні метали, зокрема іони Кобальту, Нікелю, Феруму та Мангану, у низьких концентраціях необхідні для нормального функціонування клітин мікроорганізмів. Вони є кофакторами багатьох ензимів. Зокрема нікельвмісними ензимами є уреаза, ацетил-КоА-декарбоксилаза, Ni/Fe-гідрогеназа, деякі супероксиддисмутази тощо [12]. Кобальтвмісні ензими головно залучені у регуляцію процесів трансамінування амінокислот, а також Кобальт входить до складу багатьох біологічно активних сполук, зокрема вітаміну B_{12} [14]. Окиснені Ферум та Манган є джерелом енергії для мікроорганізмів, здатних до процесів Fe^{3+} - чи Mn^{4+} – дисиміляційної редукції [9]. Ці елементи мають важливе значення у забезпеченні функціонування мембранних транспортних систем та підтриманні клітинного циклу. Проте за високих концентрацій, перехідні метали зумовлюють токсичний вплив на клітини живих організмів, у результаті чого порушуються їхня структура та біохімічні властивості. Одним із наслідків негативного впливу високих концентрацій металів є утворення активних метаболітів кисню (АМК) [1].

Утворення високотоксичних радикалів кисню, таких як супероксид аніон, пероксид водню та гідроксильний радикал у клітинах зумовлює окисний стрес, що спричиняє загибель мікроорганізмів. Супероксидний радикал кисню – один із найосновніших АМК, що володіє як відновлюючими, так і окиснюючими властивостями. Головно він взаємодіє з іонами металів та FeS-кластерами [5]. Супероксидний аніон утворюється внаслідок одноелектронного відновлення молекулярного кисню, або шляхом одноелектронного окиснення гідроген пероксиду [8].

Супероксиддисмутаза як один із ензимів антиоксидантної системи захисту клітин каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикалу (O_2^-) з утворенням O_2 та H_2O_2 . Більшість штамів мікроорганізмів, що володіють супероксиддисмутазою (СОД) активністю, також мають каталазну активність, у результаті чого утворений пероксид гідрогену розщеплюється з утворенням води та кисню [1, 15].

Desulfuromonas acetoxidans – безбарвні грамнегативні облигатно анаеробні сіркобактерії класу δ - *Proteobacteria* [10], що населяють збагачені сполуками Сульфуру водні середовища. Вони забезпечують відновну ланку метаболізму сірки внаслідок утворення гідроген сульфід у процесі дисиміляційної сульфурредукції. Сірко- та сульфатвідновлювальні бактерії відіграють важливу роль у збереженні екологічної сталості навколишнього середовища. Вони здатні контролювати переміщення металів у водних осадах шляхом утворення важкорозчинних сульфідів металів. Надмірні концентрації токсичних іонів металів у середовищі загрожують нормальному

існуванню живих організмів. Процес, що здійснюється за участю бактерій відновної ланки циклу Сульфуру відображає ефективний механізм біологічної ремедіації довкілля від надмірного забруднення солями важких металів та гідроген сульфідом як кінцевого токсичного продукту їхньої життєдіяльності. Він полягає у спонтанному вилученні цими бактеріями металів і H_2S з навколишнього середовища шляхом біосадження метал сульфідів [4].

Вважають, що лише у несприятливих умовах, зокрема за впливу токсичних сполук, якими можуть бути високі концентрації іонів перехідних металів, у облигатно анаеробних мікроорганізмів синтез ензимів антиоксидантного захисту індукується киснем чи його похідними. На даний час активність супероксиддисмутази у строго анаеробних сірковідновлювальних бактерій вивчена недостатньо.

Метою нашої роботи було дослідити вплив сполук перехідних металів, зокрема $FeSO_4$, $FeCl_3$, $MnCl_2$, $NiCl_2$ та $CoCl_2$, на активність супероксиддисмутази сірковідновлювальних бактерій *Desulphuromonas acetoxidans*.

Матеріали і методи. Досліджували бактерії *Desulphuromonas acetoxidans*, виділені з водоєм Яворівського сіркового родовища, одержані в чистій культурі та ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [3].

Активність супероксиддисмутази у клітинах бактерій визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм за рівнем інгібування відновлення 2,3,5-трифенілтетразолію хлористого (2,3,5-ТТХ) до формазану червоного кольору.

У ряд проб вносили різні концентрації рибофлавіну та піддавали впливу УФ-випромінювання ближнього спектру. В результаті цього відбувалось фотовідновлення рибофлавіну, що одразу окиснювався під впливом кисню з одночасним утворенням супероксид-аніону. Подальша взаємодія утвореного активного метаболіту кисню з 2,3,5-ТТХ супроводжувалась відновленням даної сполуки з утворенням формазану червоного кольору [6]. Даний процес пригнічувався у результаті супероксиддисмутазної активності.

Активність супероксиддисмутази у клітинах сірковідновлювальних бактерій визначали в умовних одиницях активності на 1 мг клітинного протеїну. За 1 умовну одиницю приймали таку концентрацію протеїну, що забезпечувала 50 % інгібування утворення формазану [13]. З метою визначення даної концентрації протеїну, його очищували в безклітинних екстрактах шляхом діалізу в 20 мМ калій-фосфатному буфері, рН=7,5 та вносили в стоковий розчин у концентрації 10, 50, 100 та 200 мкг/мл (у перерахунку на його сумарну концентрацію в клітинах). До складу стокового розчину входили (у перерахунку на 10 мл): 0,5 М калій-фосфатний буфер – 1 мл; 0,028 мг рибофлавіну/мл – 6,5 мл; 3 мг/мл 2,3,5-ТТХ – 1 мл; H_2O – 1,5 мл, ТЕМЕД – 32 мкл.

Концентрацію протеїну в клітинах визначали за методом Лоурі [11].

З метою визначення активності досліджуваного ензиму в клітинах *D. acetoxidans* за впливу різних концентрацій солей Феруму, Мангану, Нікелю та Кобальту, бактерії вирощували протягом чотирьох днів у модифікованому середовищі Постгейта С [2, 7] із внесенням від 0,5 до 2,5 мМ $FeSO_4$, $FeCl_3 \times 6H_2O$, $MnCl_2 \times 4H_2O$, $NiCl_2 \times 6H_2O$ та $CoCl_2 \times 6H_2O$. У контроль сполук металів не вносили. Після другої, третьої та четвертої діб вирощування відбирали клітини, вирощені за різних концентрацій досліджуваних сполук металів, та одержували безклітинні екстракти. Для цього клітини відмивали 0,9 % розчином NaCl, руйнували на ультразвуковому гомогенізаторі УЗДН-2Т при 22 кГц протягом 5 хв при 0°C. Уламки клітин відокремлювали центрифугуванням при 7000g за температури +4°C протягом 30 хв. Отриманий діалізований безклітинний екстракт у концентрації 10, 50, 100 та 200 мкг бактерійного протеїну/мл вносили в стоковий розчин та отримували калібрувальні криві зміни різниці світлопоглинання проб із різною концентрацією клітинного протеїну до і після опромінення їх УФ протягом 14 хв для кожної досліджуваної концентрації металу. На основі отриманих результатів визначали концентрацію протеїну, при якій

відновлення 2,3,5-ТТХ інгібується на 50 % (1 умовну одиницю активності супероксиддисмутази) та перераховували активність досліджуваного ензиму на 1 мг клітинного протеїну. Далі визначали активність супероксиддисмутази у клітинах бактерій *D. acetoxidans* (ум. од. акт. / мг протеїну) за впливу від 0,5 до 2,5 мМ досліджуваних сполук металів протягом чотирьох днів культивування.

Статистичну достовірність отриманих результатів визначали на основі коефіцієнта детермінації R^2 експоненціальної кривої другого роду типу:

$$y = ax \times \exp(-x/t) + y_0$$

де: y - маса клітинного протеїну в мг, що відповідає 1 ум. од. активності супероксиддисмутази;

x - світлопоглинання проби, що відповідає такій концентрації протеїну при якій 2,3,5-ТТХ відновлюється на 50 % (1 ум. од. активності);

a, t, y_0 – параметри рівняння.

Дану залежність розв'язували для кожної отриманої калібрувальної кривої. Коефіцієнт детермінації набував значень $0,95 < R^2 < 0,99$, що дозволяє стверджувати точність підбору рівняння регресії та достовірність отриманих даних.

Результати та їх обговорення. З метою визначення мінімальної концентрації рибофлавіну, що за впливу УФ здатна забезпечити утворення достатньої кількості супероксид-аніону для запуску відновлення 2,3,5-ТТХ з утворенням формагану червоного кольору, було використано 5 проб із різною концентрацією рибофлавіну в кожній (табл. 1).

Таблиця 1

Розчини	1 проба	2 проба	3 проба	4 проба	5 проба
розчин I	1,4 мл	1,4 мл	1,4 мл	1,4 мл	1,4 мл
розчин II	2,6 мл	2,0 мл	1,5 мл	1,0 мл	0,5 мл
розчин III	-	0,6 мл	1,1 мл	1,6 мл	2,1 мл
розчин IV	13 мкл	13 мкл	13 мкл	13 мкл	13 мкл

Примітка: «-» – розчин III не вносили у пробу

де:

Розчин I: 2 мл 0,5 М К-Ф буферу, рН=7,5-7,8; 2 мл 2,3,5-ТТХ (3мг/мл); 3 мл H_2O .

Розчин II: 0,15 мг рибофлавіну/мл.

Розчин III: H_2O .

Розчин IV: ТЕМЕД (N,N,N,N-тетраметилетилендіамін).

Проби опромінювали ультрафіолетом із використанням УФ-лампи ОБН-150 до появи червоного забарвлення та отримували залежність між концентрацією рибофлавіну в пробах та змінами різниці їх світлопоглинання, виміряних на спектрофотометрі СФ-46 при 405 нм до і після дії на них УФ-випромінювання (рис. 1).

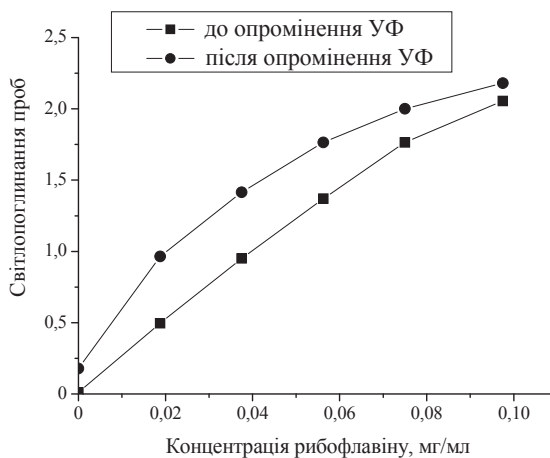


Рис. 1. Зміни різниці світлопоглинання проб до і після дії на них УФ залежно від внесеної концентрації рибофлавіну

Було встановлено, що мінімальна концентрація рибофлавіну, при опроміненні якої УФ спостерігається відновлення 2,3,5-ТТХ, становить 0,028 мг/мл. Для дослідження лінійності окиснення рибофлавіну за дії УФ, зразок у співвідношенні розчин I: розчин II: розчин III: розчин IV = 1,4 мл: 0,75 мл: 1,85 мл: 14 мкл опромінювали УФ протягом 2, 5, 10 та 15 хв. Отримали часову залежність змін різниці світлопоглинання проб, виміряних при $\lambda = 405$ нм, до і після опромінення їх УФ (рис. 2).

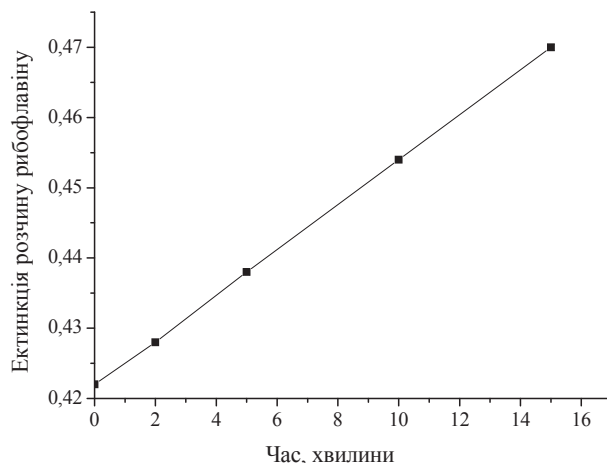


Рис. 2. Часова залежність зміни різниці світлопоглинання проб зі сталою концентрацією (0,028 мг/мл) рибофлавіну до і після дії на них УФ

Досліджено активність супероксиддисмутази у безклітинних екстрактах сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* за впливу різних концентрацій кобальт (II) хлориду, нікель (II) хлориду, ферум (II) сульфату, ферум (III) хлориду та манган (II) хлориду протягом чотирьох діб культивування.

Встановлено, що за внесення $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в концентрації 1,0 мМ у культуральне середовище активність супероксиддисмутази в безклітинних екстрактах сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* була максимальною на другу добу вирощування та становила 34 ум. од. акт./мг протеїну (рис. 3, а). За даного впливу вона збільшилась у 3,3 рази порівняно з контролем. Зростання концентрації Ni^{2+} у середовищі від 1,5 до 2,5 мМ зумовлювало підвищення активності досліджуваного ензиму на 51 та 30 % відповідно на другу добу, порівняно з контрольними зразками. На третю та четверту доби культивування максимальна активність супероксиддисмутази даних бактерій була виявлена за внесення 0,5 мМ нікель (II) хлорид гексагідрату. Отримані результати, ймовірно, можна пояснити тим, що на початкових етапах впливу за низьких концентрацій Ni^{2+} відбувається підвищення активності супероксиддисмутази для видалення супероксидного радикалу як побічного продукту фізіологічної та біохімічної активності клітин досліджуваних бактерій, оскільки Нікель може бути кофактором супероксиддисмутази [12]. Зі збільшенням тривалості впливу та концентрації солі металу, активність ензиму інгібується, що, ймовірно, пов'язано з пригніченням антиоксидантної системи клітин як захисного механізму проти негативного впливу ксенобіотиків.

За впливу CoCl_2 активність супероксиддисмутази безклітинних екстрактів *D. acetoxidans* була максимальною на другу добу культивування за концентрації 2,0 мМ досліджуваної солі металу і становила 44,37 ум. од. акт./мг протеїну (рис. 3, б).

При підвищенні концентрації кобальт (II) хлориду від 0,5 до 2,0 мМ активність досліджуваного ензиму збільшилась у 2,1-4,1 рази відповідно протягом другої доби культивування, порівняно з контрольними зразками. Протягом третьої та четвертої діб за даного впливу солі металу активність супероксиддисмутази пригнічувалась, порівняно з другою добою культивування, проте була вищою порівняно з контрольними зразками.

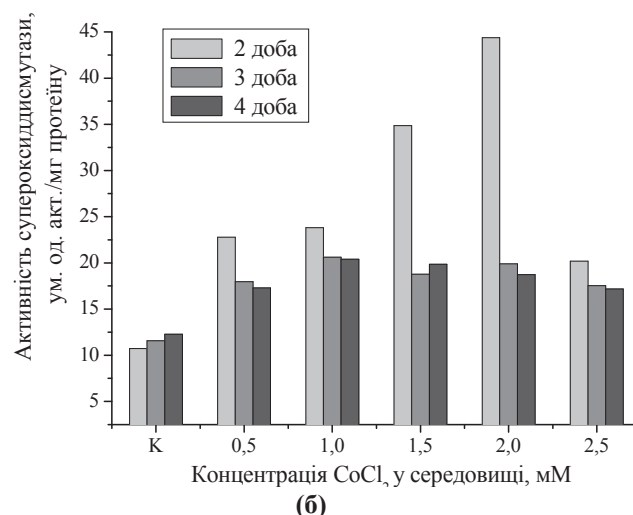
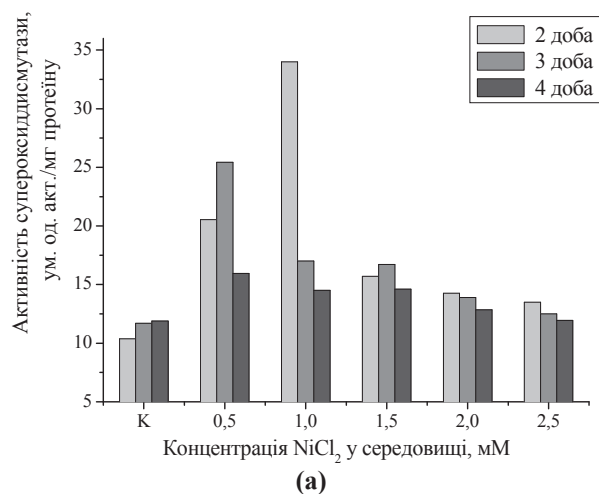
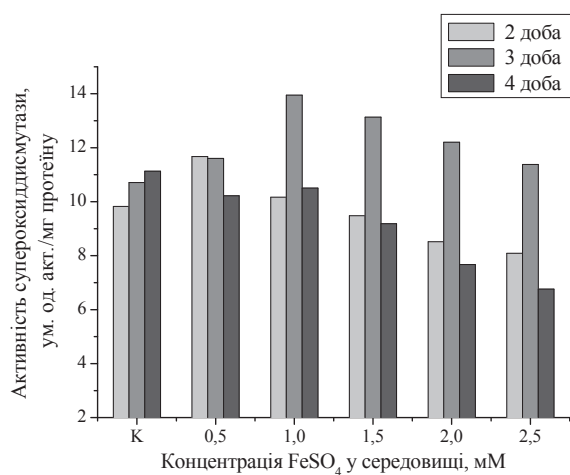


Рис. 3. Вплив нікель (II) хлориду (а) та кобальт (II) хлориду (б) на активність супероксиддисмутази в безклітинних екстрактах *D. acetoxidans* протягом чотирьох днів вирощування ($0,95 < R^2 < 0,99$)

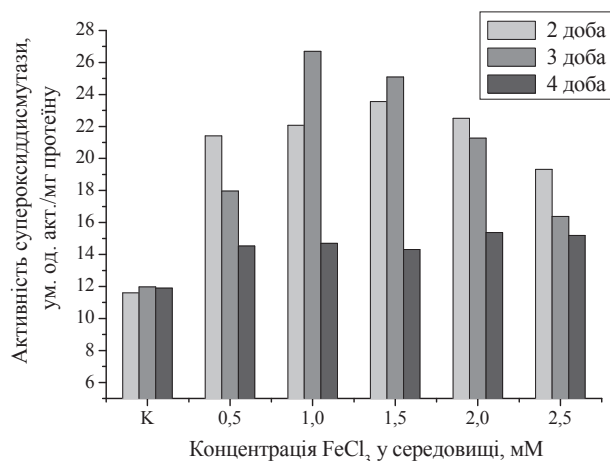
Отже, на початкових етапах впливу Кобальт стимулює активність досліджуваного ензиму. Тривалий вплив даної солі металу, ймовірно, призводить до інтенсивного пригнічення активності антиоксидантної системи захисту досліджуваних бактерій.

При внесенні різних концентрацій FeSO₄ максимальна активність супероксиддисмутази безклітинних екстрактів бактерій *D. acetoxidans* була зафіксована на третю добу культивування за концентрації 1,0 мМ досліджуваної солі металу та становила 13,95 ум. од. акт./мг протеїну (рис. 4). Зі збільшенням часу культивування та підвищенням концентрації ферум (II) сульфату в середовищі активність досліджуваного ензиму знижувалась. Очевидно, тривалий вплив високих концентрацій FeSO₄ зумовлює пригнічення активності антиоксидантної системи захисту даних бактерій. Проте, порівняно з впливом інших досліджуваних сполук перехідних металів, активність супероксиддисмутази була невисокою за даних умов. Це, ймовірно, обумовлено низькою токсичністю досліджуваної солі металу щодо сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans*.

Встановлено, що за внесення FeCl₃×6H₂O в ростове середовище активність супероксиддисмутази у безклітинних екстрактах досліджуваних бактерій була максимальною за концентрації 1,0 мМ солі металу на третю добу культивування і становила 26,69 ум. од. акт./мг протеїну (рис. 4).



(а)



(б)

Рис. 4. Вплив ферум (II) сульфату (а) та ферум (III) хлориду (б) на активність супероксиддисмутази в безклітинних екстрактах *D. acetoxidans* протягом чотирьох діб вирощування ($0,95 < R^2 < 0,99$)

Збільшення концентрації ферум (III) хлориду від 1,5 до 2,5 мМ у культуральному середовищі призвело до збільшення активності супероксиддисмутази у 2 та 1,7 разів відповідно, порівняно з контролем на другу добу культивування. Протягом третьої доби активність досліджуваного ензиму суттєво знижувалась, що, ймовірно, є результатом пригнічення функціонування захисних систем клітини зі збільшенням тривалості впливу даної солі металу, що є сильним прооксидантом, на досліджувані бактерії.

За внесення $MnCl_2 \times 4H_2O$ максимальну активність супероксиддисмутази (38,74 ум. од. акт./мг протеїну) безклітинних екстрактів досліджуваних бактерій було зафіксовано на другу добу культивування за концентрації 2,0 мМ солі Мангану (II) у середовищі (рис. 5).

За даного впливу активність досліджуваного ензиму зросла у 3,6 разів, порівняно з контролем. На третю добу культивування максимальну активність СОД спостерігали за внесення 1,5 мМ манган (II) хлориду в культуральне середовище, а на четверту добу – за впливу 1,0 мМ цієї сполуки. За даних умов активність ферменту підвищилась відповідно у 2,8 та 2,7 разів порівняно з контролем. Збільшення концентрації $MnCl_2$ в середовищі зумовлювало зниження активності досліджуваного ензиму протягом третьої та четвертої діб. Високі концентрації Мангану, зокрема 2,0

та 2,5 мМ при тривалому впливі пригнічували активність СОД у безклітинних екстрактах сірководновловальних бактерій *D. acetoxidans*.

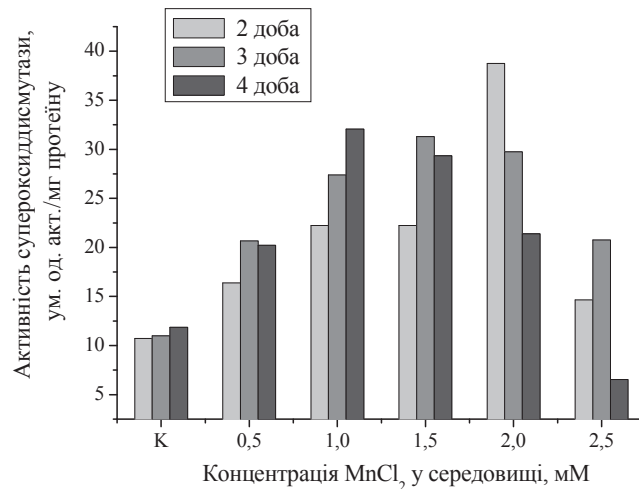


Рис. 5. Вплив манган (II) хлориду на активність супероксиддисмутази в безклітинних екстрактах *D. acetoxidans* протягом чотирьох днів вирощування ($0,95 < R^2 < 0,99$)

Висновок. Отже, дослідження впливу сполук перехідних металів, зокрема FeSO_4 , FeCl_3 , MnCl_2 , NiCl_2 та CoCl_2 на активність супероксиддисмутази сірководновловальних бактерій *D. acetoxidans* протягом чотирьох днів культивування показало, що максимальна активність ензиму спостерігається за внесення в середовище 1,0 мМ NiCl_2 , 2,0 мМ CoCl_2 та MnCl_2 відповідно на другу добу, та за впливу 1,0 мМ FeSO_4 і FeCl_3 на третю добу культивування, порівняно з контролем. Встановлено, що активність супероксиддисмутази безклітинних екстрактів досліджуваних бактерій змінюється залежно від концентрації сполуки перехідного металу в середовищі та тривалості її дії. Збільшення часу культивування та концентрації сполук даних металів в середовищі зумовлювали пригнічення активності досліджуваного ензиму.

Висловлюємо щире подяку доктору біологічних наук, старшому науковому співробітнику лабораторії молекулярної генетики прокаріотів Інституту біології клітини НАН України Борецькому Юрію Романовичу за допомогу в проведенні даних досліджень.

О.М. Василюв, С.А. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ СЕРОВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

Резюме

Супероксиддисмутаза как один из ферментов антиоксидантной системы защиты клеток катализирует дисмутацию супероксидного анион-радикала (O_2^-) с образованием O_2 та H_2O_2 . Исследовано влияние соединений переходных металлов, в частности FeSO_4 , FeCl_3 , MnCl_2 , NiCl_2 и CoCl_2 на активность супероксиддисмутазы серовосстанавливающих бактерий *Desulfuromonas acetoxidans*. Максимальную активность исследуемого фермента наблюдали под влиянием 1,0 мМ NiCl_2 , 2,0 мМ CoCl_2 и MnCl_2 на вторые сутки и под влиянием 1,0 мМ FeCl_3 и FeSO_4 на третьи сутки культивирования, сравнительно с контролем. Увеличение времени культивирования и концентрации соединения металла в среде вызывало подавление активности супероксиддисмутазы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: серобактерии, *Desulfuromonas acetoxidans*, переходные металлы, Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} .

O. M. Vasylyv, S.O. Hnatysh

Ivan Franko Lviv National University, Lviv

**INFLUENCE OF TRANSITION METAL COMPOUNDS ON SUPEROXIDE
DISMUTASE ACTIVITY OF SULFUR REDUCING *DESULFUROMONAS*
ACETOXIDANS BACTERIA**

S u m m a r y

Superoxide dismutase, as one of the enzymes of cells' antioxidant defensive system, catalyzes superoxide anion-radical (O_2^-) dismutation with O_2 and H_2O_2 forming. The influence of such transition metal compounds, as $FeSO_4$, $FeCl_3$, $MnCl_2$, $NiCl_2$ and $CoCl_2$ on superoxide dismutase activity of sulfur-reducing *Desulfuromonas acetoxidans* bacteria has been investigated. Maximal activity of the investigated enzyme has been observed accordingly under the influence of 1.0 mM of $NiCl_2$, 2.0 mM of $CoCl_2$ and $MnCl_2$ on the second day and under the influence of 1.0 mM of $FeCl_3$ and $FeSO_4$ respectively, on the third day of growth in comparison with control samples. An increase of incubation time and concentration of metal compound in the medium caused the inhibition of superoxide dismutase activity.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: sulfur bacteria, *Desulfuromonas acetoxidans*, transition metals, Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} .

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Vasylyv O.M., Ivan Franko Lviv National University; 4 Hrushevsky St., Lviv, 79005, Ukraine.

1. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Кругових Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
2. Розанова Е.П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения. – М.: Институт микробиологии АН СССР, 1979. – С. 123–136.
3. Чайка О., Перетятко Т., Гудзь С. Сірковідновлювальні бактерії водоєм Язівського сіркового родовища // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологічна. – 2010. – **28**. – С. 1–4.
4. Barton L., Hamilton W. Sulfate-Reducing Bacteria. Environmental and Engineered Systems. – Cambridge University Press, 2007. – 558 p.
5. Bartosz G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? // Biochemical Pharmacology. – 2009. – **77**. – P. 1303–1315.
6. Bernas T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2000. – **380**, N 1. – P. 108–116.
7. Biebl H., Pfennig N. Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor // Arch. Microbiol. – 1977. – **112**. – P. 115–117.
8. Djordjevic V. B. Free radicals in cell biology // International Review of Cytology. – 2004. – **237**. – P. 57–89.
9. Eric E., Derek R. Dissimilatory Fe (III)-reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans* // Applied and Environmental Microbiology. – 1993. – **59**, N 3. – P. 734–742.
10. Garity G., Winters M., Searles D. Taxonomic Outline of the Procariotic Genera Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Second edition. – Springer-Verlag, 2001. – 41 p.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein determination with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chemistry. – 1951. – **193**. – P. 265–275.
12. Murloney S.B., Hausinger R.P. Nickel uptake and utilization by microorganisms // FEMS Microbiology Reviews. – 2003. – **27**. – P. 239–261.
13. Pynyaha Yu.V., Boretsky Yu.R., Fedorovych D.V., Fayura L.R., Levkiv A.I. et al. Deficiency in frataxin homologue YFH1 in the yeast *Pichia guilliermondii* leads to misregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation // Biometals. – 2009. – **22**. – P. 1051–1061.
14. Schmidt T., Schlegel H. Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes // FEMS Microbiology Ecology. – 1989. – **62**. – P. 315–328.
15. Vasylyv O., Hnatysh S. Effect of transition metal compounds on catalase activity of sulfur-reducing bacterial *Desulfuromonas acetoxidans* cells // Visnyk of Lviv National University. Series Biology. – 2011. – **57**. – P. 207–215.

Отримано 16.10.2012