

**С. В. Дяків, С. О. Гнатуш, А. А. Галушка**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

## **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *DESULFUROMUSA* SP. СВ30, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ПОРОДНИХ ВІДВАЛІВ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ**

Проведено дослідження фізіолого-біохімічних властивостей сірководновловальних бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30, виділених із породних відвалів вугільних шахт Червоноградського гірничопромислового району. Встановлено, що внесення фумарату до середовища Постгейта С для культивування досліджених бактерій спричиняє інтенсифікацію накопичення ними біомаси (у 1,56 рази) і гідроген сульфідру (у 1,23 рази) у порівнянні з контролем. Бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30 використовують фумарат одночасно як донор електронів, нагромаджуючи у культуральній рідині ацетат (до 3,47 г/л), та акцептор, відновлюючи його до сукцинату (4,05 г/л). За внесення натрію лактату і фумарату відбувається відновлення фумарату та його використання як додаткового джерела карбону, а натрій лактат використовується після вичерпання фумарату. Бактерії мають високу активність ензиму сульфурредуктази ( $55,6 \pm 9,67$  мкМ  $H_2S$ /хв  $\times$  мг білка, у діапазоні рН 7,5–9,0 і за температури 20–40°C) та спорідненість сульфурредуктази до субстрату ( $K_m = 0,09 \pm 0,02$  мкМ).

*Ключові слова:* *Desulfuromusa*, сіркове дихання, фумаратне дихання, активність ензиму сульфурредуктази.

Сіркове дихання шляхом неповного окиснення субстратів із накопиченням ацетату властиве для багатьох мікроаерофільних сірко- та деяких сульфатвідновлювальних бактерій [6]. Повне окиснення субстратів із утворенням діоксиду карбону здійснюють анаеробні бактерії родів *Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Desulfuromusa*, *Geobacter*, *Pelobacter* [8, 11]. *Desulfuromonas acetoxidans* окиснюють лактат до ацетату, який перетворюється через ацетил-КоА у модифікованому циклі трикарбонових кислот (ЦТК) до  $CO_2$  [5]. Як донор електронів, фумарат, як і лактат, зазнає окиснення в ЦТК до діоксиду карбону, при цьому у середовищі нагромаджується незначна кількість ацетату [15]. Більшість мікроорганізмів використовує фумарат як додатковий акцептор електронів для отримання енергії [10]. *Geobacter sulfurreducens* використовує фумарат як акцептор електронів та додаткове джерело карбону [16]. Відновлення фумарату до сукцинату у *D. acetoxidans* здійснює сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.99.1) за наявності НАДН<sup>+</sup> [5]. У *Wolinella succinogenes* відновлення фумарату здійснюють фумаратредуктаза (сукцинат:хінон оксидоредуктаза, КФ 1.3.5.4) і гідрогеназа (форміатдегідрогеназа, КФ 1.1.5.6) [9, 10]. Будова фумаратредуктази подібна до сукцинатдегідрогенази, хоча ензим забезпечує перебіг оберненої реакції відновлення фумарату до сукцинату, що спряжене із окисненням хінолу до хінону [9]. Фумаратредуктаза виділена

у сірковідновлювальних бактерій *W. succinogenes*, а також у *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* [6, 8, 16].

Відновлення сірки забезпечують локалізовані у цитоплазматичній мембрані сульфурредуктаза (КФ 1.97.1.3) та полісульфідредуктаза (КФ 1.12.98.4), які зв'язані через цитохроми чи хінони з гідрогеназою. У *W. succinogenes* електрони від гідрогенази через цитохром *b* і менахінон транспортуються до полісульфідредуктази [6]. Сульфурредуктаза виділена у сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans*, *D. acetoxigens*, *D. succinoxidans*, *W. succinogenes*, сульфатвідновлювальних – *Desulfovibrio baculatus*, *Sulfospirillum deleyianum*, а також термофільних бактерій – *Desulfurolobus ambivalens*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga neapolitana*, *Pyrodictium abyssi*, *Acidiantus ambivalens* та сіркоокиснювальних бактерій – *Thiobacillus thiooxidans* [8].

Сірковідновлювальні бактерії роду *Desulfuromusa* використовують елементну сірку як кінцевий акцептор електронів, окиснюючи субстрати до діоксиду карбону [11], але особливості дисиміляційної сіркоредакції у них досліджені недостатньо.

Виділені та ідентифіковані нами із порід відвалів вугільних шахт Червоноградського гірничопромислового району бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30 окрім елементної сірки відновлюють також сполуки феруму, купруму, мангану, хрому, нітрат- та нітрит-йони [4], що робить перспективним дослідження механізмів зниження рухомості важких металів за рахунок утворення комплексів із біогенним сірководнем, перетворення нітрит-йонів у менш токсичний  $\text{NH}_4^+$ .

Метою роботи було визначити особливості використання натрій лактату та фумарату як джерел карбону та донорів електронів, елементної сірки як термінального акцептора електронів дисиміляційної сіркоредакції, а також дослідити сульфурредуктазну активність бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень були виділені та ідентифіковані нами із порід відвалів вугільних шахт Червоноградського гірничопромислового району бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30.

Культуру досліджених бактерій вирощували у щільно закритих гумовими корками пробірках у термостаті за температури  $+28^\circ\text{C}$  у рідкому середовищі Постгейта С (рН 7,5) [2].

Використання органічних джерел карбону та донорів електронів досліджували упродовж 21 доби, визначаючи накопичення біомаси та утворення гідроген сульфід у рідкому середовищі Постгейта С за внесення натрій лактату (53,57 мМ) і елементної сірки (32,29 мМ) – контроль; натрій лактату (53,57 мМ), фумарату (32,29 мМ) і елементної сірки (32,29 мМ); фумарату (53,57 мМ) і елементної сірки (32,29 мМ); натрій лактату (53,57 мМ); фумарату (53,57 мМ).

Дослідження особливостей використання натрій лактату та фумарату бактеріями *Desulfuromusa* sp. СВ30 проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), використовуючи хроматографічну систему Varian ProStar (Varian Medical Systems, США). Хроматографічна система складалася з двох pomp Varian ProStar 210 (Varian Medical Systems, США), хроматографічної колонки Polaris 5 C18-A (Varian Medical Systems,

США), 250×4,6 мм у модулі колонок Varian ProStar 500 (Varian Medical Systems, США), спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею Varian ProStar 335 (Varian Medical Systems, США). Як рухоми фазу використовували два розчинники: розчин А – ацетонітрил, розчин В – 0,2% розчин трифтороцтової кислоти (ч.д.а., AppliChem, ФРН) у воді, отриманий з допомогою системи очищення води Adrona Crystal CreBio з ультрафільтром Millipore (Merck Millipore, США). Хроматографічне розділення здійснювали у 0,2% розчині трифтороцтової кислоти упродовж 8 хв. Потік розчинника – 1,5 мл/хв [7]. Хроматограми записували за довжини хвилі 210 нм. Температура колонки була +35°C. Аналізували культуральну рідину на вміст органічних кислот на 1, 4 та 8 доби культивування у середовищі Постгейта С за наявності донорів і акцепторів електронів, які вносили еквівалентно до молярної концентрації натрій лактату як донора (53,57 мМ) та елементної сірки як акцептора (32,29 мМ): 1) контроль – натрій лактат (53,57 мМ) і елементна сірка (32,29 мМ); 2) натрій лактат (53,57 мМ) і фумарат (32,29 мМ); 3) натрій лактат (53,57 мМ); 4) фумарат (53,57 мМ).

Визначення активності ензиму сульфурредуктази проводили за описаним методом [13]. Для встановлення локалізації ензиму визначали сульфурредуктазну активність у культуральній рідині бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30, розчинній та осадовій фракціях. Культуральну рідину відокремлювали від клітин центрифугуванням (4000 g, 30 хв) на центрифугі ОС-6М. Для визначення сульфурредуктазної активності у розчинній та осадовій фракціях клітини двічі промивали 10 мМ калій фосфатним буфером (рН 7,5) та руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т (частота 22 кГц, 5 хв). Супернатант (розчинна фракція) відділяли центрифугуванням клітинного екстракту (9000 g, 30 хв) на центрифугі К-24. Осадову фракцію ресуспендували в екстрагуючому буфері (50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,5; 10<sup>-5</sup>М ЕДТА (етиленадіамінтетраацетат); 10<sup>-5</sup>М ФМСФ (фенілметилсульфонілфторид)). Активність ензиму визначали за кількістю продукованого гідроген сульфід, що утворився в ході реакції. Реакційна суміш мала такий склад: калій фосфатний буфер (рН 7,5) – 440 мкл; S<sup>0</sup> – 0,04 г; 10 мМ NADH<sup>+</sup> – 120 мкл; 10 мМ ЕДТА – 120 мкл; гліцерин – 120 мкл; культуральна рідина – 400 мкл. Реакційну суміш переносили в пробірки, що були наповнені аргоном. Час інкубації 10 хв. Реакцію запускали додаванням NADH<sup>+</sup> і зупиняли 2М розчином NaOH (0,2 мл). Гідроген сульфід визначали за методом утворення метиленової сині [14]. Для вивчення впливу температури та рН середовища на сульфурредуктазну активність *Desulfuromusa* sp. СВ30 змінювали температуру (10, 20, 30, 40, 50°C) і рН реакційної суміші (4, 5, 6, 7, 8, 9).

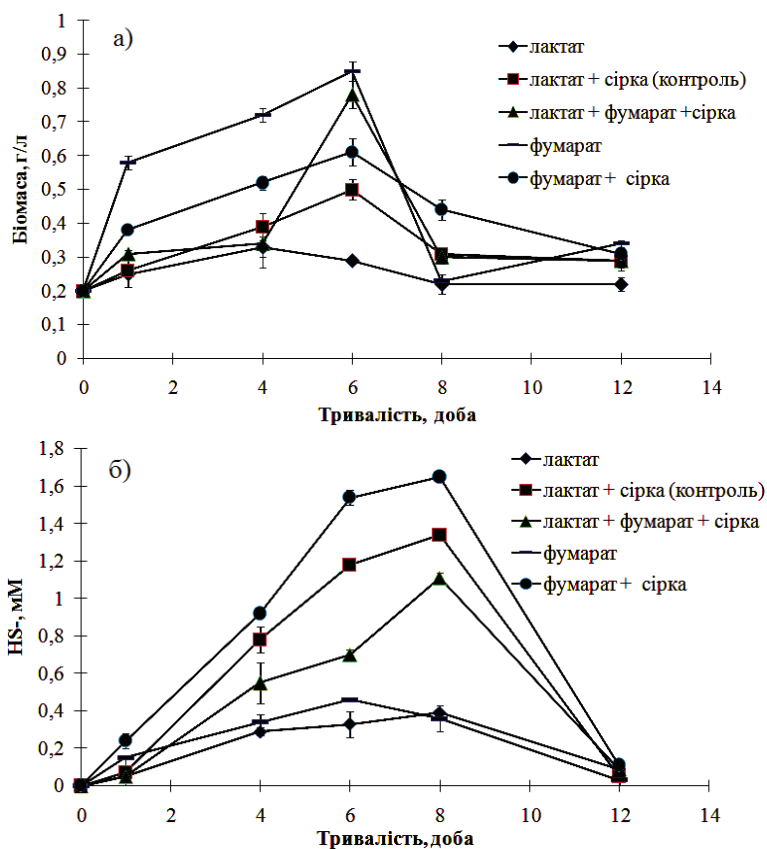
Концентрацію білка визначали у культуральній рідині, розчинній та осадовій фракціях за методом Лоурі [12]. Біомасу бактерій визначали колориметрично, використовуючи КФК-3 (довжина хвилі 340 нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм) за калібрувальною кривою.

Статистичну обробку результатів досліджень та побудову графіків проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2007», «Origin 6.1». Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних визначали коефіцієнт Стюдента, вірогідною вважалася різниця за рівня значущості  $p \leq 0,05$  [1].

**Результати досліджень.** Сірковідновлювальні бактерії ростуть за використання коротколанцюгових жирних кислот,  $H_2$ , рідше – спиртів, моноароматичних сполук як джерел карбону. Під час дисиміляційної сіркоредакції вони відновлюють елементну сірку, а металоредакції – йони Fe (III), Co (III), Mn (VI), Hg (II), а також сполуки хлору та нітрогену [2, 5, 6, 8, 11, 16]. Ми показали, що виділені із порід відвалів бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30 використовують натрій лактат, фумарат, натрій цитрат, натрій піруват, малат, стеарат, ацетат, аспартат, аскорбінову кислоту, етанол, фенол, манітол, глюкозу, аланін, гліцин як джерела карбону та донори електронів дисиміляційної сіркоредакції, що зумовило необхідність дослідити особливості відновлення елементної сірки залежно від наявних донорів електронів [4].

Нами було досліджено використання органічних джерел карбону і донорів електронів та продукцію гідроген сульфіді бактеріями *Desulfuromusa* sp. СВ30, виділеними із порід відвалів вугільних шахт, упродовж 21 доби культивування.

Встановлено, що найбільшу біомасу бактерії нагромаджували за наявності у середовищі фумарату ( $0,85 \pm 0,03$  г/л) або натрій лактату і фумарату ( $0,78 \pm 0,04$  г/л) на шосту добу (рис. 1, а), а із шостої по восьму добу бактерії продукували найбільшу кількість гідроген суль-



**Рис. 1.** Накопичення біомаси (а) та продукція HS (б) бактеріями *Desulfuromusa* sp. СВ30 за росту у середовищі Постгейта С із різними джерелами карбону та донорами електронів;  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$  – вірогідні зміни у порівнянні з контролем

фіду (рис. 1, б). Найвищу сульфідогенну активність виявили за додавання до середовища з фумаратом елементної сірки ( $1,65 \pm 0,04$  мМ), що у 1,23 рази вище, ніж у контролі (натрій лактат і елементна сірка). Після восьмої доби культивування бактерій сульфідогенна активність різко знижувалась в усіх варіантах досліду, а після дванадцятої доби бактерії утворювали не більше 10 мМ гідроген сульфіду.

За наявності фумарату і елементної сірки остання відновлювалася із вичерпанням фумарату, оскільки окисно-відновний потенціал окисно-відновної пари фумарат/сукцинат є вищий, ніж у пари  $S^0/HS^-$  [3].

Відомо, що відновлення фумарату відбувається за участю мембранного електронтранспортного ланцюга, до складу якого входять відповідні дегідрогенази. Утворення сукцинату в результаті відновлення фумарату свідчить про використання фумарату як акцептора

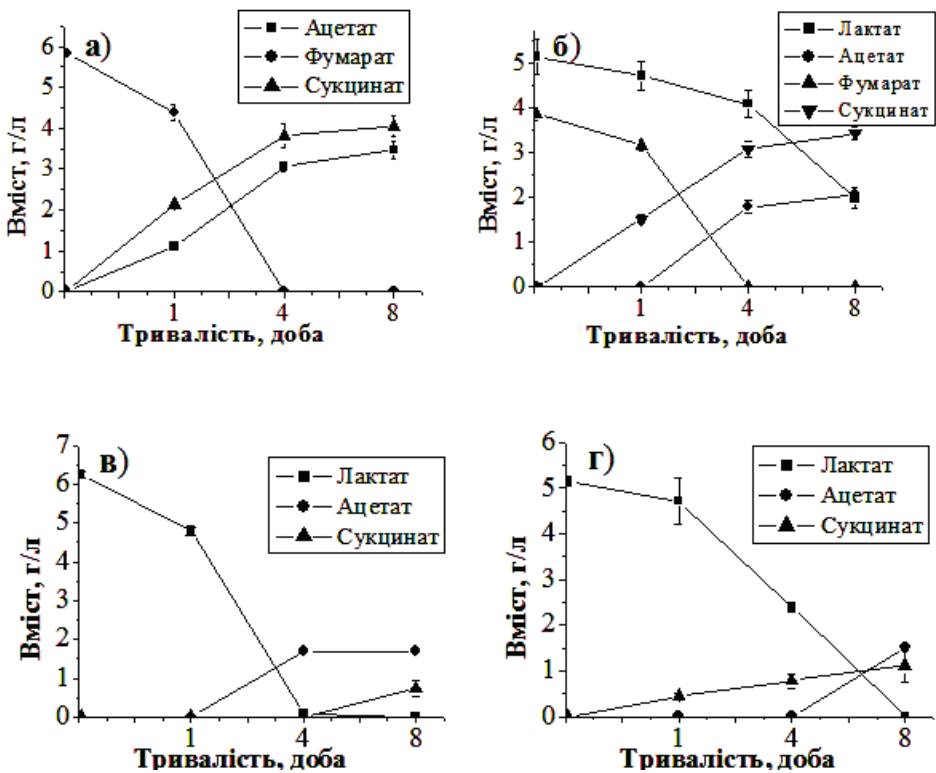


Рис. 2. Використання органічних речовин бактеріями *Desulfuromusa* sp. CB30 у середовищі Постгейта С із фумаратом (а), фумаратом і натрій лактатом (б), натрій лактатом (в), натрій лактатом та сіркою (г);  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$  – вірогідні зміни у порівнянні з контролем:

- а) використання фумарату (—●—), нагромадження ацетату (—■—), нагромадження сукцинату (—▲—);
- б) використання фумарату (—▲—), використання натрій лактату (—■—), нагромадження сукцинату (—▼—), нагромадження ацетату (—●—);
- в) використання натрій лактату (—■—), нагромадження ацетату (—●—), нагромадження сукцинату (—▲—);
- г) використання натрій лактату і елементної сірки (—■—), нагромадження ацетату (—●—), нагромадження сукцинату (—▲—), контроль

електронів. За використання фумарату як донора електронів відбувається його окиснення в ЦТК до  $\text{CO}_2$  [9, 15].

Хроматографічний аналіз культуральної рідини після вирощування *Desulfuromusa* sp. CB30 у середовищі з фумаратом показав, що бактерії, починаючи із першої доби, нагромаджують сукцинат та ацетат (рис. 2, а). Нагромадження сукцинату (до  $4,05 \pm 0,26$  г/л) в результаті відновлення фумарату свідчить про те, що бактерії використовують фумарат як акцептор електронів. За використання фумарату як донора електронів бактеріями *Desulfuromusa* sp. CB30 відбувається його окиснення до  $\text{CO}_2$ , у середовищі нагромаджується до  $3,47$  г/л ацетату.

За одночасного внесення натрій лактату і фумарату (рис. 2, б) бактерії використовували останній як акцептор електронів, накопичуючи велику щільність біомаси вже на другу добу ( $0,69 \pm 0,01$  г/л) (рис. 3). За цих умов відбувалось повне відновлення фумарату до сукцинату, а натрій лактат залишався у кількості  $1,97 \pm 0,07$  г/л, оскільки він, очевидно, включався в цикл після вичерпання фумарату. У культуральній рідині на восьму добу також залишався лактат.

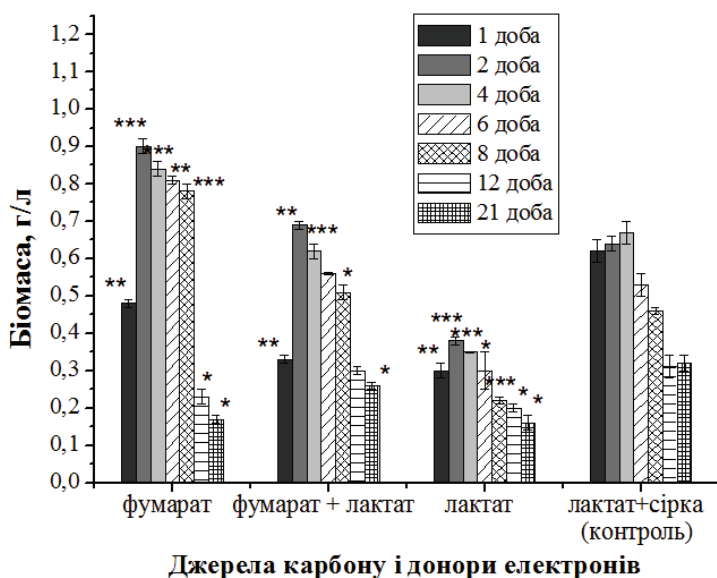


Рис. 3. Нагромадження біомаси бактеріями *Desulfuromusa* sp. CB30 у середовищі Постгейта С із різними джерелами карбону та донорами електронів; \* –  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ,  $n = 3$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ ,  $n = 3$  – вірогідні зміни у порівнянні з контролем

Виділені бактерії *Desulfuromusa* sp. CB30 із широкого кола сполук сульфуру (сульфат-, сульфит-, тіосульфат-йони, органічні сульфоксиди, елементна сірка, полісульфіди, органічні дисульфіди тощо) здатні використовувати лише елементну сірку як кінцевий акцептор електронів, продукуючи до  $1,02 \pm 0,02$  мМ гідроген сульфід [4]. Відновлення елементної сірки у ході дисиміляційної сіркоредакції забезпечує ензим сульфурредуктаза або полісульфідредуктаза, які зв'язані через цитохроми чи хінони з

гідрогеназою та локалізовані у цитоплазматичній мембрані [6]. З метою встановлення імовірної локалізації ензиму у досліджених бактерій було визначено сульфурредуктазну активність у культуральній рідині, розчинній і осадовій фракціях (рис. 4).

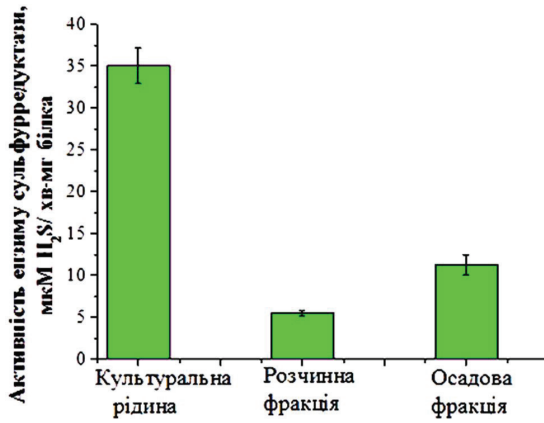


Рис. 4. Активність ензиму сульфурредуктази *Desulfuromusa* sp. CB30 у культуральній рідині, розчинній та осадовій фракціях

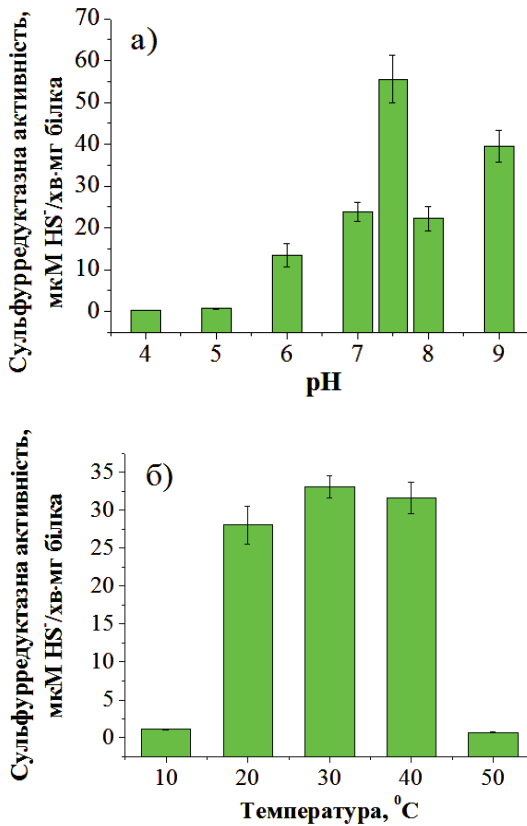


Рис. 5. Вплив рН (а) та температури (б) на активність ензиму сульфурредуктази бактерій *Desulfuromusa* sp. CB30

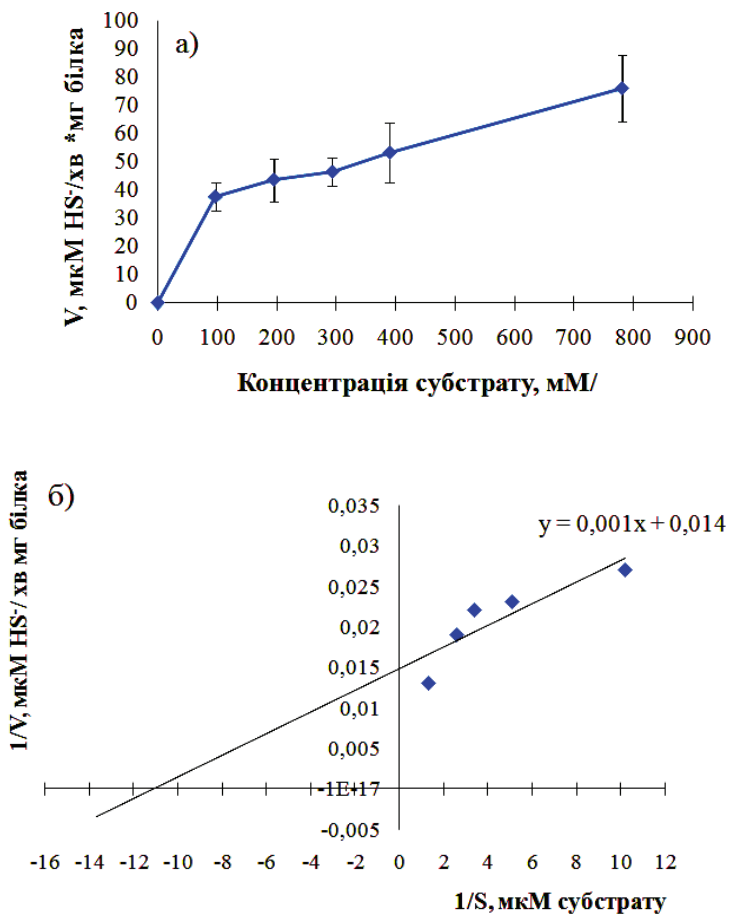


Рис. 6. Залежність початкової швидкості реакції від концентрації субстрату: а) графік Міхаеліса-Ментен, б) графік Лайнуівера-Берка;  $p \leq 0,01$ ,  $n=3$  – вірогідні зміни у порівнянні з контролем

Оскільки виділений штам *Desulfuromusa* sp. СВ30 накопичує найбільшу біомасу та кількість гідроген сульфіді з 6 по 8 добу (середина експоненціальної фази росту; рис. 1), повністю відновлюючи акцептор електронів, то активність ензиму сульфурредуктази визначали на 6–8 добу.

Найвища активність ензиму сульфурредуктази у *Desulfuromusa* sp. СВ30 була у культуральній рідині ( $35,0 \pm 2,1$  мкМ  $H_2S$ / хв  $\times$  мг білка) на шосту добу, що у 3,11 раза вища, ніж в осадовій фракції ( $11,27 \pm 1,19$  мкМ  $H_2S$ / хв  $\times$  мг білка). Активність розчинної фракції ензиму сульфурредуктази була найнижчою серед усіх ( $5,51 \pm 0,30$  мкМ  $H_2S$ /хв  $\times$  мг білка), що свідчить про локалізацію цього ензиму на мембранних структурах бактеріальної клітини.

Дослідивши вплив рН та температури на активність ензиму сульфурредуктази *Desulfuromusa* sp. СВ30, ми відмітили, що вона була найвищою у діапазоні рН 7,5–9,0 (від  $39,5 \pm 5,88$  до  $55,6 \pm 9,67$  мкМ  $H_2S$ / хв  $\times$  мг білка) і за температури 20–40°C (рис. 5). За використання однофакторного дисперсійного аналізу встановили суттєвий і достовірний вплив як температури (78%), так і рН (88%) на активність ензиму сульфурредуктази бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30.



Дослідження основних кінетичних параметрів активності ензиму сульфурредуктази *Desulfuromusa* sp. СВ30 у культуральній рідині показало, що за температури 30°C і рН 7,5  $K_m$  становить  $0,09 \pm 0,02$  мкМ,  $V_{max}$  –  $67,58 \pm 9,13$  мкМ  $H_2S$ / хв  $\times$  мг білка, що вказує на високу спорідненість сульфурредуктази *Desulfuromusa* sp. СВ30 до субстрату (рис. 6).

**Обговорення результатів.** Сірковідновлювальні бактерії широко розповсюджені у природі. Разом із сульфатвідновлювальними бактеріями вони є основними продуцентами гідроген сульфіді [2, 6]. Особливо важлива роль цих бактерій у перетворенні сполук сульфуру порід вугільних відвалів Червоноградського гірничопромислового району. Проведені нами дослідження фізіолого-біохімічних властивостей сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30, виділених із порід вугільних відвалів, показали, що внесення фумарату до середовища Постгейта С для культивування сірковідновлювальних бактерій спричиняє інтенсифікацію накопичення біомаси дослідженими бактеріями (у 1,56 рази) і гідроген сульфіді (у 1,23 рази) у порівнянні із контролем. Оскільки окисно-відновний потенціал окисно-відновної пари фумарат/сукцинат вищий, ніж у пари  $S^0/H_2S$ , то відновлення фумарату дає можливість отримати вищий вихід АТФ [3, 6], що підтверджує накопичення у культуральній рідині бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30 сукцинату. Нагромадження у культуральній рідині ацетату як проміжної сполуки окиснення фумарату у модифікованому ЦТК є наслідком використання фумарату як донора електронів або додаткового джерела карбону.

Бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30 мають високу сульфурредуктазну активність ( $55,6 \pm 9,67$  мкМ  $H_2S$ / хв  $\times$  мг білка, у діапазоні рН 7,5–9,0 і за температури 20–40°C) та спорідненість сульфурредуктази до елементної сірки ( $K_m = 0,09 \pm 0,02$  мкМ), що дозволяє розглядати можливість їх використання для розробки технологій рекультивування забруднених територій із метою зниження рухливості йонів важких металів у результаті утворення нерозчинних металосульфідів.

**С. В. Дякив, С. А. Гнатуш, А. А. Галушка**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
ул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

## **ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *DESULFUROMUSA* SP. СВ30, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОРОДНЫХ ОТВАЛОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ**

### **Резюме**

Проведено исследование физиолого-биохимических свойств серовосстанавливающих бактерий *Desulfuromusa* sp. СВ30, выделенных из породных отвалов угольных шахт Червоноградского горнопромышленного района. Установлено, что внесение фумарата в среду Постгейта С для культивирования исследуемых бактерий приводит к интенсификации накопления ими биомассы (в 1,56 раза) и гидроген сульфида (в 1,23 раза) в сравнении с контролем. Бактерии *Desulfuromusa* sp. СВ30 используют фумарат одновременно как донор электронов, накапливая в культуральной жидкости ацетат (до 3,47 г/л), и акцептор, восстанавливая его до сукцината (4,05 г/л). При внесении

натрия лактата и фумарата происходит восстановление фумарата и его использование как дополнительного источника карбона, натрий лактат используется после исчерпания фумарата. Бактерии имеют высокую активность энзима сульфурредуктазы ( $55,6 \pm 9,67 \text{ мкМ H}_2\text{S/мин} \times \text{мг белка}$ , в диапазоне pH 7,5–9,0 и при температуре 20–40 °C) и сродство сульфурредуктазы к субстрату ( $K_m = 0,09 \pm 0,02 \text{ мкМ}$ ).

*Ключевые слова:* *Desulfuromusa*, серное дыхание, фумаратное дыхание, активность энзима сульфурредуктазы.

**S. V. Diakiv, S. O. Hnatush, A. A. Halushka**

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

## **PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF DESULFUROMUSA SP. SV30, ISOLATED FROM COAL PITS WASTE HEAPS**

### Summary

The study of physiological and biochemical characteristics of sulfur reducing bacteria *Desulfuromusa* sp. SV30, isolated from coal pits waste heaps of Chervonograd mining region was conducted. It was established that fumarate applying into Postgate C medium for cultivation of investigated bacteria caused their biomass intensifying accumulation (in 1.56 times) and hydrogen sulfide (in 1.23 times) compared with the control. Bacteria *Desulfuromusa* sp. SV30 utilize fumarate simultaneously as electron donor, accumulating acetate (till 3.47 g/l) in the culture fluid, as well as acceptor, reducing fumarate to succinate (4.07 g/l). Under conditions of sodium lactate and fumarate applying occurs the fumarate reducing the same as its usage as an additional carbon source. Sodium lactate is utilized after fumarate ending. Bacteria have a high rate of sulfur reductase enzyme activity ( $55.6 \pm 9.67 \text{ }\mu\text{M H}_2\text{S/min} \times \text{mg protein}$ , in pH range 7.5–9.0 and under the 20–40 °C) and sulfur reductase affinity to the substrate ( $K_m = 0.09 \pm 0.02 \text{ }\mu\text{M}$ ).

*Keywords:* *Desulfuromusa*, sulfur respiration, fumarate respiration, sulfur reductase enzyme activity.

1. Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М., Чабан М. Є. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести: навч. посібник. – Львів: Видавн. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2004. – 112 с.
2. Розанова Е. П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и её окисленные соединения // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. – Пушкино, 1978. – С. 123–136.
3. Таширев А.Б., Галинкер Э.В., Андрюк Е.И. Термодинамическое прогнозирование редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_2^{-4}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ ) // Доповіди Національної академії наук України. – 2008. – № 4. – С. 166–172.
4. Diakiv S. V., Hnatush S. O., Moroz O. M., Prypin O. Ya., Kulachkovskiy O. R., Bodnaruk V. Ye. Sulfur reducing bacteria from coal pits waste heaps of Chervonograd mining region // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. – 2016. – 10, № 2. – С. 63–76.
5. Gebhardt N. A., Thauer R. K., Linder D., Kaulfers P. M., Pfennig N. Mechanism of acetate oxidation to  $\text{CO}_2$  with elemental sulfur in *Desulfuromonas acetoxidans* // *Arch. Microbiol.* – 1985. – 141. – P. 392–398.

6. Hedderich R., Klimmek O., Kroger A., Dirmeier R., Keller M., Stetter K.O. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides // FEMS Microbiol. Reviews. – 1998. – 22. – P. 353–381.
7. Kerem Z., Bravdo B., Shoseyov O., Tugendhaft Y. Rapid liquid chromatography – ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must // J. Chromatogr. A. – 2004. – 1052. – P. 211–215.
8. Kletzin A. Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaeobacterium *Desulfurolobus ambivalens* // J. Bacteriol. – 1989. – 171, N 3. – P. 1638–1643.
9. Kröger A., Biel S., Simon J., Gross R., Uden G., Lancaster R. Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – 1553, N 1–2. – P. 23–38.
10. Lancaster R., Simon J. Succinate: quinone oxido-reductases from e-proteobacteria // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – 1553, N 1–2. – P. 84–101.
11. Liesack W., K. Finster. Phylogenetic analysis of five strains of gram-negative, obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria and description of *Desulfuromusa* gen. nov., including *Desulfuromusa kysingii* sp. nov., *Desulfuromusa bakii* sp. nov., and *Desulfuromusa succinoxidans* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1994. – 44, N 4. – P. 753–758.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 265–275.
13. Sugio D., Oda C., Matsumoto K., Takai M., Wakasa S., Kamimura K. Purification and characterization of sulfur reductase from a moderately thermophilic bacterial strain, TI-1, that oxidizes iron // Biosci. Biotech. Biochem. – 1998. – 62, N 4. – P. 705–709.
14. Pat. 6340596 USA. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide / M. Sugiyama. – Publ. 22.01.02.
15. Thauer R. K. Citric-acid cycle, 50 years on modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria // Eur. J. Biochem. – 1988. – 176. – P. 497–508.
16. Yang T. H., Coppi M. V., Lovley D. R. et al. Metabolic response of *Geobacter sulfurreducens* towards electron donor/acceptor variation // Microb. Cell Factor. – 2010. – 9, 90.

Отримано 19.10.2016