

**НІТРАТРЕДУКТАЗНА АКТИВНІСТЬ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ
*DESULFOMICROBIUM SP. CrR3***

Л. С. Дорош, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

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

Нітратредуктаза (ЕС 1.6.6.2; NR) – це молібденвмісний фермент, що забезпечує відновлення нітрату, широко розповсюджена в прокариотичних і еукариотичних організмах, і відіграє важливу роль в метаболізмі нітрогену. Здатність використовувати нітрати як акцептори електронів описано у декількох родів сульфатвідновлювальних бактерій: *Desulfovibrio* [4, 6], *Desulfobacterium* [8] та *Desulfobulbus* [9].

Дисиміляційна нітратредуктаза сульфатвідновлювальних бактерій містить молібден, що входить до складу молібдоптерингуанозину, що є її кофактором. Периплазматична нітратредуктаза у сульфатвідновлювальних бактерій за молекулярною масою значно менша, порівняно з нітратредуктазами інших бактерій, наприклад, *Escherichia coli*, *Paracoccus denitrificans*. Донором електронів для нітратредуктази можуть бути лактат, фумарат, ацетат та інші органічні сполуки [3].

Метою нашої роботи було дослідити нітратредуктазну активність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* за різних умов культивування.

Об'єктом дослідження були хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* [1].

Бактерії культивували у середовищі Постгейта С за температури 30 °С і анаеробних умов [5].

Для визначення нітратредуктазної активності *Desulfomicrobium sp. CrR3*, бактерії культивували протягом однієї доби у модифікованому середовищі Постгейта С, у якому замість сульфатів додавали нітрати у концентрації 10 мМ як єдині акцептори електронів.

Активність НАД-залежної нітратредуктази визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм за температури 30°C [7]. Реакційна суміш для визначення НАД-залежної нітратредуктази містила калій фосфатний буфер (25 мМ рН 7,3), 10 мМ калій нітрату, 0,05 мМ ЕДТА (реактив А) та свіжоприготовлений розчин НАДН у концентрації 2 мМ (реактив В). Реакцію запускали додаванням розчину безклітинного екстракту. Через 2 хвилини реакцію зупиняли додаванням 58 мМ розчину сульфаніламід у 3 н НСІ (реактив Д) та 0,77 мМ реактиву НЕДА (N-(1-нафтил) – етилендіамін дигідрохлорид).

За умов вирощування бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* у середовищі з нітратами (10 мМ), як кінцевим акцептором електронів максимальну активність нітратредуктази спостерігали на першу добу культивування. Вона становила 12 мкМ нітриту / хв·мг білка. Після 24 годин культивування активність ферменту знижувалась, що, очевидно, пов'язане із зменшенням концентрації субстрату в середовищі, і нагромадженням нітриту та амонію, які є інгібіторами нітратредукції.

Активність ферменту спостерігається і у середовищі з сульфатами як єдиним акцептором електронів дає підставу свідчить, що нітратредуктаза у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* є конститутивним ферментом. Відомо, що молібден є складовою частиною молібденгуанозиндинуклеотиду, коензиму нітратредуктази [3]. В результаті проведених досліджень було встановлено, що молібдат в концентрації 2 мМ пригнічує активність нітратредуктази більше ніж на 50 %.

Активність нітратредуктази за концентрації нітрату 2 мМ є на 40 % нижча порівняно з контролем на першу добу культивування. На п'яту добу культивування, де активність нітратредуктази у середовищі з нітратами концентрацією 10 мМ становила 7 мМ нітриту/ хв·г білка, тоді як у середовищі з 2 мМ нітратів активність ферменту дорівнювала нулю.

Встановлено, що за внесення фумарату нітратредуктазна активність найвища. Шоляк К. та ін [2] показали здатність сульфатвідновлювальних *Desulfomicrobium sp. CrR3* використовувати фумарат як донор електронів. Фумарат за цих умов окиснювався до ацетату. Наявність у середовищі фумарату, як єдиного донора електронів забезпечує підвищення нітратредуктазної активності на 25 % порівняно з контролем. Внесення ацетату у середовище культивування, як донора електронів не забезпечує росту бактерій і, відповідно, нітратредуктазної активності.

Донорами електронів в процесі нітратредукції у *Desulfomicrobium sp. CrR3* можуть бути лактат та інші органічні сполуки. Однак, фумарат забезпечує ріст бактерій за відсутності сульфатів та нітратів. Найвища нітратредуктазна активність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* виявлена за умов культивування бактерій у середовищі з фумаратом як донором електронів.

Література

1. Шоляк К. В. Сульфатвідновлювальні бактерії, стійкі до підвищених концентрацій шестивалентного хрому / К. В. Шоляк, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 2. – С. 66–76.
2. Шоляк К. В. Акцептори електронів для сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* у процесі окиснення органічних сполук / К. В. Шоляк, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь // Біологічні Студії. – 2013. – № 2. – С. 57–64.
3. Dias J. M. Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9Å solved by MAD methods / J. M. Dias, M. E. Than, A. Humm, R. Huber // Structure. – 1999. – № 1. – P. 65–79.
4. Mitchell G. Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species / G. J. Mitchell, J. G. Jones, J. A. Cole // Arch. Microbiol. – 1986. – № 144 – P. 35–40.
5. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria / Postgate J. R [2nd ed]. – Cambridge Univ. press, 1984. – 199 p.
6. Seitz H. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate to nitrite / H. J. Seitz, H. Cypionka // Arch. Microbiol. – 1986. – № 146 – P. 63–67.

7. Smarrelli J. Enzymatic Assay of Nitrate reductase / J. J. Smarrelli, S. H. Campbell // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1983. – № 742 – P. 435–445.
8. Szewzyk R. Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov // R. Szewzyk, N. Pfennig // *Arch. Microbiol.* – 1987. – № 147 – P. 163–168.
9. Widdel F. Studies on dissimilatory sulfatereducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov / F. Widdel, N. Pfennig // *Arch. Microbiol.* – 1982. – № 131 – P. 360–365.