

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ТАРАБАС ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 579.[266+22+84+81]+57.042

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПЕРЕТВОРЕННЯ СПОЛУК СУЛЬФУРУ І НІТРОГЕНУ
ФОТОТРОФНИМИ ПУРПУРОВИМИ БАКТЕРІЯМИ, ВИДІЛЕНИМИ
З ТЕХНОГЕННО ЗМІНЕНОГО СЕРЕДОВИЩА**

03.00.07 – мікробіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело


_____ О. В. Тарабас

Науковий керівник: Гнатуш Світлана Олексіївна, кандидат біологічних наук,
професор кафедри мікробіології

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Тарабас О. В. Перетворення сполук Сульфуру і Нітрогену фототрофними пурпуровими бактеріями, виділеними з техногенно зміненого середовища. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 “Мікробіологія”. – Львівський національний університет імені Івана Франка; Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2023.

У дисертаційній роботі досліджено закономірності використання сульфід- і нітрит-іонів у модельному середовищі та стічних водах фототрофними пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620, виділеними з техногенно створеного озера Яворівське, та встановлено здатність цих бактерій генерувати електричний струм і продукувати водень за різних умов культивування.

Озеро Яворівське (Львівська область, Україна) утворилося на місці кар’єру колишнього сірковидобувного підприємства у результаті затоплення. Його водоносний комплекс характеризує високий вміст H_2S і сульфат-іонів. Основною групою фототрофних мікроорганізмів, які розвиваються у водних і наземних середовищах, є аноксигенні фототрофні пурпурові бактерії, здатні фіксувати карбон діоксид, молекулярний азот й окиснювати відновлені сполуки Сульфуру і Нітрогену, тому вони відіграють важливу роль у глобальних біогеохімічних циклах Карбону, Нітрогену та Сульфуру.

Наукова новизна. Уперше визначено вміст фотосинтезувальних несіркових бактерій (ФНСБ) у воді озера Яворівське й у воді джерельного типу заповідника Розточчя та продемонстровано, що на глибині 30 м кількість ФНСБ виявилася найбільшою і у 21,8 раза вищою, порівняно з контролем. Чисельність ФСБ була найбільшою на глибинах 50 і 70 м і у 222 та 314 разів вищою за контроль, відповідно.

З води озера Яворівське виділено штам пурпурових несіркових бактерій Ya-2016, який активно метаболізує органічні речовини та неорганічні сполуки Сульфуру й Нітрогену. Виділені пурпурові несіркові бактерії Ya-2016 є рухомими, мають вібріоїдну форму, за Грамом фарбуються негативно, не утворюють спор, належать до нейтрофільних (оптимальне рН 6,8–7,3), мезофільних (оптимальна температура 27...30 °С) мікроорганізмів. Після 10-ти діб культивування довжина клітин становить від 1,5 до 1,8 мкм, а ширина – від 0,4 до 0,46 мкм. Бактерії ростуть за анаеробних фототрофних і аеробних хемотрофних умов. За результатами секвенування консервативної ділянки гена 16S рРНК (номер доступу в GenBank OL711631) встановлено, що нуклеотидна послідовність бактерій штаму Ya-2016 виявляє високу подібність (99 % ідентичних залишків у попарному вирівнюванні методом BLASTN) до 16S рРНК бактерій *Rhodopseudomonas* sp. A7, *Rhodopseudomonas* sp. J5-3, *Rhodopseudomonas palustris* DX-1, але виділені бактерії відрізняються від них за деякими фізіолого-біохімічними властивостями. Отже, жоден зі секвенованих на сьогодні видів цього роду не є достатньо близьким до *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 на філогенетичному дереві (не лежать на одній кладі), аби стверджувати, що *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 належить до описаних раніше видів. Бактерії штаму Ya-2016 використовують нітрати й сечовину як джерела Нітрогену. Також виділені бактерії Ya-2016 відрізняються за морфологічними характеристиками від усіх валідно описаних видів роду *Rhodopseudomonas* у визначнику Берджі. Встановлено, що бактерії штаму Ya-2016 як основне джерело Карбону можуть використовувати різні органічні сполуки: ацетат, лактат, цитрат, гліцерол, етанол, малат, пептон, капронову кислоту, крохмаль, дріжджовий екстракт, бензоат. Спостерігали незначний ріст у середовищі з пропіонатом, сукцинатом, глюкозою, фруктозою, піруватом. Проте ці бактерії не нагромаджують біомасу в середовищах із фумаратом і масляною кислотою. Вони здатні використовувати сульфат-іони як джерело Сульфуру і за їхньої концентрації у середовищі 2,5 мМ асимілюють 17,7 % сульфат-іонів.

Досліджувані бактерії ростуть за анаеробних і аеробних умов. Для росту потребують вітаміну В₁₂. З використанням вискоєфективної рідинної

хроматографії в екстрактах пігментів із клітин бактерій штаму Ya-2016 визначено три гомологічні форми бактеріохлорофілу *a*, які мали спектри поглинання з λ_{max} =361; 605; 770 нм. У процесі розділення каротиноїдів ідентифікували лікопін з λ_{max} =446; 473; 504 нм та ангідрородовібрин з λ_{max} =459; 485; 519 нм.

За результатами вищеописаних досліджень ідентифікували бактерії штаму Ya-2016 як представників роду *Rhodopseudomonas*, надавши назву *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 (Свідоцтво про депонування штаму бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016 у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України від 01.08.2017).

Виявлено здатність бактерій *R. yavorovii* IMBB-7620 продукувати водень у середовищах зі сукцинатом, цитратом натрію, малатом, глюкозою та крохмалем як джерелами Карбону і донорами електронів. За внесення в середовище культивування натрій ацетату досліджувані мікроорганізми не продукували водню. Сумарний об'єм водню за росту бактерій у середовищі з 90 мМ натрій цитрату та з NH_4^+ становив $25,54 \pm 0,49$ мл, що у 1,5 раза більше утвореного H_2 за росту бактерій у середовищі з 60 мМ натрій цитрату з внесенням NH_4^+ .

Схарактеризовано закономірності окиснення сульфід- і тіосульфат-іонів пурпуровими несірковими бактеріями *R. yavorovii* IMBB-7620. Ефективність окиснення 1,4; 2,8; 5,6 мМ сульфід- і тіосульфат-іонів як донорів електронів під час аноксигенного фотосинтезу бактеріями становила 97,4; 42,6; 18,7 та 68,8; 28,0; 3,7 %, відповідно. Встановлено, що внаслідок окиснення бактеріями гідроген сульфід та натрій тіосульфату в середовищі нагромаджуються сульфат-іони, а елементна сірка є проміжним метаболітом у середовищі з Na_2S .

Виявлено здатність бактерій *R. yavorovii* IMBB-7620 окиснювати нітрит-іони за фототрофних умов росту. Ефективність окиснення 0,7; 1,4; 2,8; 5,6 мМ нітрит-іонів як донорів електронів бактеріями була 100; 93,67; 67,66; 6,7 % на 10-ту добу культивування. Встановлено, що внаслідок окиснення бактеріями нітрит-іонів у середовищі нагромаджуються нітрат-іони. За культивування досліджуваних мікроорганізмів у середовищах з різними концентраціями нітрит-іонів (0,7; 1,4; 2,8; 5,6 мМ) бактерії найкраще росли у середовищі з 2,8 мМ NO_2^- . Здатність

досліджуваних мікроорганізмів окиснювати нітрит-іони та використовувати нітрат-іони свідчить про суттєвий вплив пурпурових несіркових бактерій на перерозподіл потоків сполук Нітрогену в екосистемах і про суттєву роль цих мікроорганізмів у біогеохімічному циклі Нітрогену.

Досліджено закономірності нагромадження біомаси бактеріями *R. yavorovii* ІМВВ-7620 у стічній воді дріжджового заводу та воді фільтрату відстійника № 3 Львівського полігону твердих побутових відходів (ЛПТПВ) за розведення в 10; 30; 50; 100 разів. Підібрано оптимальне розведення стічної води для культивування бактерій. Ефективність окиснення органічних сполук стічної води дріжджового заводу та води фільтрату відстійника № 3 ЛПТПВ, визначена за хімічним споживанням кисню, становила 42,3 та 65,6 %, відповідно, на 21-шу добу культивування. Ефективність використання деяких хімічних речовин фільтрату відстійника № 3 ЛПТПВ становила понад 90 %. Встановлена можливість впливу бактерій *R. yavorovii* ІМВВ-7620 на зниження вмісту загального Fe, Ca²⁺, Mg²⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, HS⁻ у стічних водах доповнює та розширює розуміння ролі пурпурових несіркових бактерій в екосистемах, які можуть суттєво впливати на біогеохімічні цикли цих сполук у природі. Отримані результати можуть стати основою для розробки ефективних біотехнологій очищення стічних вод від сірководню й інших сполук Сульфуру, а також від сполук Нітрогену за участю цих мікроорганізмів.

За результатами дослідження здатності до генерування електричного струму бактеріями *R. yavorovii* ІМВВ-7620 як анодними біокаталізаторами в однокамерному мікробному паливному елементі (МПЕ) під час окиснення натрій цитрату (як модельного субстрату) й органічних речовин стічних вод (стічної води дріжджового заводу, розведеної в 10 разів) встановлено, що максимальне значення густини потужності мікробного паливного елемента (1148,75 мВт/м²) впродовж культивування *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 спостерігали у період з 8-ї до 80-ї год культивування бактерій, що супроводжувалося інтенсивним відновленням католіту. Очевидно, використання бактеріями *R. yavorovii* ІМВВ-7620 натрій цитрату як єдиного донора електронів у анодній камері МПЕ зумовлює

його інтенсивне окиснення та генерування електричного струму. За внесення у МПЕ стічної води дріжджового заводу найвище значення густини потужності електричного струму отримано на 96-ту год культивування, що в 1,6 раза більше, ніж за використання модельного субстрату. Одночасно спостерігали зміну концентрації низки неорганічних і органічних сполук у цій воді.

Практичне значення. Практичне значення дисертаційної роботи полягає у можливості використання пурпурових несіркових бактерій для дослідження механізмів генерування електричного струму та продукування водню. Отримано патент на корисну модель. Вивчення властивостей виділеного штаму *R.yavorovii* ІМВ В-7620 є важливим для розуміння процесів кругообігу сполук Сульфуру і Нітрогену у природі. На основі бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 можуть бути розроблені технології очищення забруднених органічними та неорганічними сполуками водних середовищ. Результати дисертаційної роботи впроваджено у процесі викладання курсів “Мікробіологія”, “Актуальні питання практичної мікробіології”, “Біогеохімічна діяльність мікроорганізмів”, “Екологія мікроорганізмів”, “Фізіологія і біохімія мікроорганізмів” для студентів закладів вищої освіти.

Ключові слова: фототрофні пурпурові бактерії, *Rhodopseudomonas*, окиснення нітрит-, сульфід-, тіосульфат-іонів, утворення водню, мікробний паливний елемент, біоремедіація.

ANNOTATION

Tarabas O. V. Transformation of Sulfur and Nitrogen compounds by phototrophic purple bacteria isolated from man-made environment. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (Doctor of Philosophy) on the specialty 03.00.07 "Microbiology". – Ivan Franko Lviv National University; Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2023.

In this dissertation it is investigated the patterns of use of sulfide and nitrite ions in a model environment and wastewater by phototrophic purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620, isolated from the man-made Lake Yavorivske, and it is established the ability of these bacteria to generate electric current and produce hydrogen under different conditions cultivation.

Lake Yavorivske (Lviv region, Ukraine) was formed on the site of a quarry of a former sulfur mining enterprise as a result of flooding. Its aquifer complex contains large amounts of H₂S and is enriched with sulfate ions. The main group of phototrophic microorganisms that are developed in aquatic and terrestrial environments are anoxygenic phototrophic purple bacteria, which are able to fix carbon dioxide, molecular nitrogen and oxidize reduced compounds of sulfur and nitrogen, therefore they play an important role in the global biogeochemical cycles of carbon, nitrogen and sulfur.

Scientific novelty. The amount of photosynthetic non-sulfur bacteria (PNSB) in the water of Lake Yavorivske and the spring-type water of the Roztochya reserve was determined in this work for the first time, and it was demonstrated that at a depth of 30 m, the number of PNSB was the highest and 21.8 times higher compared to the control. The abundance of PSB was the greatest at depths of 50 and 70 m and 222 and 314 times higher than the control, respectively.

A strain of purple non-sulfur bacteria Ya-2016 was isolated from the water of Lake Yavorivske, which actively metabolizes organic substances and inorganic compounds of sulfur and nitrogen. The isolated purple non-sulfur bacteria Ya-2016 are motile, have a vibrioid shape, are negatively Gram-stained, do not form spores, belong to neutrophilic

(optimal pH 6.8–7.3), mesophilic (optimal temperature 27...30 °C) microorganisms. After 10 days of cultivation, the length of the cells is from 1.5 to 1.8 μm , and the width is from 0.4 to 0.46 μm . Bacteria grow under anaerobic phototrophic and aerobic chemotrophic conditions. According to the results of sequencing of the conserved region of the 16S rRNA gene (GenBank accession number OL711631), it was established that the nucleotide sequence of bacteria strain Ya-2016 showed high similarity (99 % of identical residues in pairwise alignment by BLASTN) to the 16S rRNA of bacteria *Rhodopseudomonas* sp. A7, *Rhodopseudomonas* sp. J5-3, *Rhodopseudomonas palustris* DX-1, but the isolated bacteria differ from them in some of their physiological and biochemical properties. Thus, none of the currently sequenced species of this genus is sufficiently close to *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 on the phylogenetic tree (not in the same clade) to claim that *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 belongs to the previously described species. Bacteria of the Ya-2016 strain use nitrates and urea as nitrogen sources. Also, the isolated Ya-2016 bacteria differ in morphological characteristics from all validly described species of the genus *Rhodopseudomonas* in the Bergey determinant. It was established that bacteria of strain Ya-2016 can use various organic compounds as the main source of carbon: acetate, lactate, citrate, glycerol, ethanol, malate, peptone, caproic acid, starch, yeast extract, benzoate. Insignificant growth was observed in the medium with propionate, succinate, glucose, fructose, and pyruvate. But these bacteria did not accumulate biomass in environments with fumarate and butyric acid. They are able to use sulfate ions as a source of sulfur and at their concentration in the medium of 2.5 mM assimilate 17.7 % of sulfate ions.

The studied bacteria grow under anaerobic and aerobic conditions and need vitamin B12 for their growth. Using high-performance liquid chromatography, three homologous forms of bacteriochlorophyll a were determined in extracts of pigments from bacterial cells of strain Ya-2016, which had absorption spectra with $\lambda_{\text{max}}=361; 605; 770$ nm. In the process of separating carotenoids, lycopene was identified with $\lambda_{\text{max}}=446; 473; 504$ nm and anhydrorhodovibrin was found with $\lambda_{\text{max}}=459; 485; 519$ nm.

According to the results of the above-described studies, bacteria of the Ya-2016 strain were identified as representatives of the genus *Rhodopseudomonas*, and the name

Rhodopseudomonas yavorovii IMV B-7620 was given to them (Certificate of deposit of the bacterial strain *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016 in the Depository of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine from 01.08.2017).

The ability of *R. yavorovii* IMV B-7620 bacteria to produce hydrogen in media with succinate, sodium citrate, malate, glucose, and starch as carbon sources and electron donors was revealed. When sodium acetate was added to the culture medium, the studied microorganisms did not produce hydrogen. The total volume of hydrogen during the growth of bacteria in a medium with 90 mM sodium citrate and with NH_4^+ was 25.54 ± 0.49 ml of H_2 , which is 1.5 times more than the H_2 formed during the growth of bacteria in a medium with 60 mM sodium citrate with the introduction NH_4^+ .

The patterns of oxidation of sulfide and thiosulfate ions by purple non-sulfur bacteria *R. yavorovii* IMBB-7620 were characterized. Oxidation efficiency 1.4; 2.8; 5.6 mM of sulfide and thiosulfate ions as electron donors of anoxygenic photosynthesis by bacteria was 97.4; 42.6; 18.7 and 68.8; 28.0; 3.7 %, respectively. It was established that due to the oxidation of hydrogen sulfide and sodium thiosulfate by bacteria, sulfate ions are accumulated in the environment, and elemental sulfur is an intermediate metabolite in the environment with $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$.

The ability of bacteria *R. yavorovii* IMB-7620 to oxidize nitrite ions under phototrophic growth conditions was revealed. Oxidation efficiency 0.7; 1.4; 2.8; 5.6 mM of nitrite ions as electron donors was 100 bacteria; 93.67; 67.66; 6.7 % on the 10th day of cultivation. It was established that as a result of the oxidation of nitrite ions by bacteria, nitrate ions are accumulated in the environment. When the studied microorganisms were cultivated in the environment with different concentrations of nitrite ions (0.7; 1.4; 2.8; 5.6 mM), the bacteria grew best in an environment with 2.8 mM NO_2^- . The ability of the studied microorganisms to oxidize nitrite ions and use nitrate ions indicates the significant influence of purple non-sulfur bacteria on the redistribution of nitrogen compound flows in ecosystems and the significant role of these microorganisms in the biogeochemical cycle of nitrogen.

The patterns of accumulation of biomass by bacteria *R. yavorovii* IMB-7620 in the wastewater of the yeast plant and the filtrate water of the settling tank No. 3 of the Lviv landfill of solid household waste (LTPW) at a dilution of 10; 30; 50; 100 times were studied. The optimal dilution of water for the cultivation of bacteria was selected. The efficiency of oxidation of organic compounds of the wastewater of the yeast factory and the filtrate water of the settling tank No. 3 LTPV, determined by chemical oxygen consumption, was 42.3 and 65.6 %, respectively, for 21 days of cultivation. The efficiency of the use of some chemicals in the filtrate of the settling tank No. 3 LTPV was more than 90 %. The established ability of *R. yavorovii* IMBB-7620 bacteria to reduce the content of total Fe, Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , Cl^- , HS^- in wastewater complements and expands the understanding of the role of purple non-sulfur bacteria in ecosystems that can significantly affect the biogeochemical cycles of these compounds in nature. The obtained results can become the basis for the development of effective biotechnologies for the purification of wastewater from hydrogen sulfide and other sulfur compounds, as well as nitrogen compounds with the participation of these microorganisms.

According to the results of the study of the ability to generate electric current by bacteria *R. yavorovii* IMBB-7620 as anode biocatalysts in a single-chamber microbial fuel cell (MFC) during the oxidation of sodium citrate (as a model substrate) and organic substances of wastewater (wastewater of a yeast factory diluted in 10 times) it was established that the maximum value of the power density of the microbial fuel cell (1148.75 mW/m^2) during the cultivation of *R. yavorovii* IMV B-7620 was observed in the period from 8 to 80 h of bacterial cultivation, which was accompanied by intensive recovery of the catholyte. Obviously, the use of sodium citrate by bacteria *R. yavorovii* IMV B-7620 as the only electron donor in the anode chamber of MFC causes its intense oxidation and generation of electric current. The highest value of the power density of the microbial fuel cell during the cultivation of *R. yavorovii* IMV B-7620 the electric current power density was obtained for 96 h of cultivation, which is 1.6 times higher than with the use of a model substrate, when yeast plant wastewater was introduced into the MFC.

At the same time, a change in the concentration of a number of inorganic and organic compounds in this water was observed.

Practical meaning. The practical value of the dissertation is in the possibility of using purple non-sulfur bacteria to study the mechanisms of electric current generation in the process of hydrogen production. A patent for a utility model was received as well. Studying the properties of the isolated strain *R. yavorovii* IMB B-7620 is important for understanding the processes of the cycle of sulfur and nitrogen compounds in nature. On the basis of *R. yavorovii* IMB B-7620 bacteria, technologies for cleaning water environments contaminated with organic and inorganic compounds can be developed. The results of the dissertation work are implemented in the teaching process of the courses "Microbiology", "Current issues of practical microbiology", "Biogeochemical activity of microorganisms", "Ecology of microorganisms", "Physiology and biochemistry of microorganisms" for students of higher education institutions.

Keywords: phototrophic purple bacteria, *Rhodopseudomonas*, oxidation of nitrite, sulfide-, thiosulfate- ions, hydrogen production, microbial fuel cell, bioremediation.

СПИСОК ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті

(* – особистий внесок здобувача)

1. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Василечко, В. О., Гришук, Г. В., Звір, Г. І., & Комплікевич, С. Я. (2017). Використання сульфід- та тіосульфат-іонів пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii*. *Biosystems Diversity*, 25(3), 181–185. <https://doi.org/10.15421/011727> (*проведено дослідження закономірностей окиснення сульфід- і тіосульфат-іонів бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016, участь у написанні й оформленні публікації).
2. **Tarabas, O. V.**, Hnatush, S. O., & Moroz, O. M. (2019). The usage of nitrogen compounds by purple non-sulfur bacteria of the *Rhodopseudomonas* genus. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(1), 83–86.

<https://doi.org/10.15421/02193> (*проведено дослідження закономірностей використання нітрит-іонів, участь у написанні й оформленні публікації).

3. **Тарабас, О.**, Мороз, О., Гнатуш, С., Яворська, Г., Звір, Г., & Ковальчук, М. (2017). Еколого-трофічні групи мікроорганізмів води озера Яворівське. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (76), 166–178. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.76.21> (*проведено дослідження фізико-хімічних властивостей води озера Яворівське та водойми заповідника Розточчя, визначено чисельність мікроорганізмів різних груп, участь у написанні й оформленні публікації).

4. **Тарабас, О.**, Гнатуш, С., Осташ, Б., Мутенко, Г., & Кошла, О. (2017б). Ідентифікація пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (75), 140–145. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.75.15> (*проведено дослідження морфо-фізіологічних характеристик бактерій, участь у виділенні сумарної ДНК та проведенні ПЛР, у написанні й оформленні публікації).

5. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Галушка, А. А., & Мороз, О. М. (2018). Пігменти *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *Мікробіологія і біотехнологія*, 1(41), 57–65. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).120468](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).120468) (*отримала зразки пігментів клітин, участь у їхній ідентифікації, у написанні й оформленні публікації).

6. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Ковальчук, М. М. (2019). Біоремедіація стічних вод за використання фототрофних несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *Екологія та ноосферологія*, 30(2), 63–67. <https://doi.org/10.15421/03193002> (*проведено дослідження нагромадження біомаси бактеріями за росту у стічних водах, деяких хімічних характеристик цих вод, участь у написанні й оформленні публікації).

7. **Tarabas, O. V.**, Hnatysh, S. O., Tashyrev, O. V., Novorukha, V. M., Havryliuk, O. A., Moroz, O. M., & Halushka, A. A. (2021). Production of hydrogen by purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii* IMV B-7620. *Mikrobiologichnij Zhurnal*, 83(5), 19–29.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj83.05.019> (*проведено дослідження нагромадження біомаси бактеріями за росту в середовищах з різними органічними сполуками і визначення окисно-відновного потенціалу та рН, участь у визначенні вмісту газу у складі газової фази, вмісту органічних кислот у культуральній рідині, у написанні й оформленні публікації).

Патенти (свідоцтва про право автора на корисну модель) України

1. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Осташ, Б. О. (2017). Свідоцтво про депонування штаму бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016 у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України з наданням реєстраційного номеру ІМВ В-7620.

2. Гнатуш, С. О., **Тарабас, О. В.**, Василів, О. М., Масловська, О. Д., Мороз, О. М. Пат. 132187 Україна, МПК Н01М 8/00; Н01М 8/16; Н01М 8/22. Спосіб одержання електричного струму у мікробному паливному елементі. Заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. № u201809830; заявл. 02.10.2018; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3.

Тези доповідей і матеріали конференцій, з'їздів

1. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О. Оптимізація умов культивування пурпурових фототрофних бактерій. *Молодь і поступ біології: XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 19–21 квітня 2016 р.). Львів, 2016. С. 230–231.

2. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М. Використання донорів електронів пурпуровими фототрофними сіркобактеріями. *Досягнення та перспективи розвитку мікробіології: Міжнародна наукова конференція* (Львів, 12–14 жовтня 2016 р.). Львів: СПОЛОМ, 2016. С. 63.

3. Шегинська, М. В., Мороз, О. М., Звір, Г. І., **Тарабас, О. В.**, Гнатуш С. О. Утилізація гідроген сульфїду фототрофними сіркобактеріями за різних його концентрацій у середовищі. *Молодь і поступ біології: XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 19–21 квітня 2016 р.). Львів, 2016. С. 229–230.

4. **Тарабас, О.**, Гнатуш, С., Мороз, О., Комплікевич, С., Захарко, С. Використання гідроген сульфідів пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. *Молодь і поступ біології: XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 25–27 квітня 2017 р.)*. Львів, 2017. С. 198–199.
5. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Осташ, Б. О., Мороз, О. М., Мутенко, Г. В., Іжовська, І. М. Визначення чутливості бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 до антибіотиків. *XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, 11–15 вересня 2017 р.)*. Одеса, 2017. С.150.
6. **Tarabas, O.**, Moroz, O., Hnatush, S., Yavorska, G., Zvir, G., Borsukevych, V., Izhovska, I. Ecological trophic groups of microorganisms of Yavorivske lake water. *7th International Weigl Conference (Lviv, 2017 September 26–29)*. Lviv, 2017. P.150.
7. **Tarabas, O.**, Hnatush, S., Govorukha, V., Tashyrev, O., Moroz, O. Production of molecular hydrogen by purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *7th International Weigl Conference (Lviv, 2017 September 26–29)*. Lviv, 2017. P.188.
8. Комплікевич, С., **Тарабас, О.**, Верига, Л., Василів, О., Іжовська, І. Ріст бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 за впливу ферум (III) цитрату. *Біологія: від молекули до біосфери: XI Міжнародна конференція молодих учених (Харків, 29 листопада – 1 грудня 2017 р.)*. Харків, 2017. С. 79.
9. Верига, Л., **Тарабас, О.**, Мороз, О., Звір, Г., Масловська, О., Комплікевич, С. Фототрофні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 230–231.
10. Гордій, Г., Павлюх, Х., Мороз, О., Яворська, Г., **Тарабас, О.** Сульфат- та сірководновлювальні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 233.
11. Горошок, Х., Василів, О., **Тарабас, О.**, Гнатуш, С. *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384 та *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 як анодні

біокаталізатори однокамерної біоелектрохімічної системи. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 233–234.

12. Кацюба, А., Мороз, О., Яворська, Г., **Тарабас, О.** Олігонітрофільні та нітрифікувальні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 240–241.

13. Комплікевич, С., **Тарабас, О.**, Гнатуш, С. Використання ферум (III) цитрату бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В- 7620. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 243–244.

14. Павлишин, І., Мороз, О., **Тарабас, О.**, Борсукевич, Б. Сірководисновувальні і целюлозоруйнівальні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 247–248.

15. Пастух, Н., Мороз, О., Яворська, Г., **Тарабас, О.** Чисельність актинобактерій у воді озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 250–251.

16. Тиндик, І., **Тарабас, О.**, Мороз, О., Звір, Г. Денітрифікувальні бактерії і ціанобактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.)*. Львів, 2018. С. 257–258.

17. Комплікевич, С., **Тарабас, О.**, Верига, Л., Масловська, О., Гнатуш, С. Використання ферум (III) цитрату бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В- 7620 упродовж культивування та іммобілізованими клітинами. *“Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. Bioscience advances”*: XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених (Київ, 24–27 квітня 2018 р.). Київ, 2018. С. 95–96.

18. **Tarabas, O.**, Hnatush, S., Vasyliv, O., Maslovska, O., Moroz, O. Electricity generation by *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *International Conference: “Advances in Microbiology and Biotechnology”* (Lviv, 2018 October 29–31). Lviv, 2018. P. 120.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОТРОФНИХ ПУРПУРОВИХ БАКТЕРІЙ І ЇХНЄ ЗНАЧЕННЯ В ПЕРЕТВОРЕННІ СПЛУК СУЛЬФУРУ ТА НІТРОГЕНУ У ПРИРОДІ	
1.1. Особливості метаболізму фототрофних пурпурових бактерій.....	26
1.2. Метаболізм сполук Сульфуру	33
1.3. Метаболізм сполук Нітрогену	43
1.4. Поширення пурпурових бактерій	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1. Відбір проб води для мікробіологічного аналізу та визначення хімічного складу води.....	55
2.2. Кількісне визначення фототрофних бактерій у воді озера Яворівське..	61
2.3. Виділення чистих культур пурпурових несіркових бактерій з води озера Яворівське.....	62
2.4. Визначення властивостей бактерій.....	63
2.5. Ідентифікація пурпурових несіркових бактерій молекулярно- генетичними методами	66
2.6. Визначення пігментів <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620.....	68
2.7. Визначення метаболічних показників розвитку мікроорганізмів.....	69
2.8. Застосування <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620 як анодних біокатализаторів у мікробному паливному елементі й вимірювання сформованої сили струму.....	74
2.9. Електронно-мікроскопічні дослідження.....	75
2.10. Статистичне оброблення результатів	75

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

3.1.	Фізико-хімічна характеристика води озера Яворівське та чисельність фототрофних бактерій у ній.....	77
3.2.	Фізіолого-біохімічні властивості й ідентифікація пурпурових несіркових бактерій, виділених з озера Яворівське	82
3.3.	Використання сполук Сульфуру та Нітрогену бактеріями <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620.....	93
3.4.	Продукування водню бактеріями <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620.....	108
3.5.	Біоремедіація стічних вод за використання фототрофних несіркових бактерій <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620.....	118
3.6.	Екзоелектрогенні властивості <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620.....	125
	УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	133
	ВИСНОВКИ.....	143
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	145
	ДОДАТКИ.....	168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АМФ	–	аденозинмонофосфат
АТФ	–	аденозинтрифосфат
ВЕРХ	–	високоєфективна рідинна хроматографія
ЕДТА	–	етилендіамінтетраоцтова кислота
ЛПЕ	–	ланцюг перенесення електронів
НАДН	–	нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДФН	–	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
ПНСБ	–	пурпурові несіркові бактерії
ПСБ	–	пурпурові сіркові бактерії
ПТЕ	–	позаклітинний транспорт електронів
РЦ	–	реакційний центр
СЗК	–	світлозбиральний комплекс
ФНСБ	–	фототрофні несіркові бактерії
ФСБ	–	фототрофні сіркові бактерії
ХСК	–	хімічне споживання кисню
ЦТК	–	цикл трикарбонових кислот
ТСА	–	триптон-соєвий агар

ВСТУП

Актуальність теми. Основною групою фототрофних мікроорганізмів, які розвиваються у водних і наземних середовищах, є аноксигенні фототрофні пурпурові бактерії, здатні фіксувати карбон діоксид, молекулярний азот і окиснювати відновлені сполуки Сульфуру та Нітрогену. Тому вони відіграють важливу роль у глобальних біогеохімічних циклах Карбону, Нітрогену та Сульфуру. За здатністю накопичувати молекулярну сірку в клітинах їх поділяють на пурпурові несіркові бактерії (ПНСБ) та пурпурові сіркові бактерії (ПСБ) (Kerpen et al., 2013; Imhoff, 2017; Dahl, 2017).

У цьому процесі аноксигенного фотосинтезу, який здійснюють ці мікроорганізми, екзогенними донорами електронів можуть бути йони сульфідів, тіосульфату, тетратіонату, молекулярна сірка, молекулярний водень (у фотолітотрофів) і органічні речовини (у фотоорганотрофів) (Dahl, 2017; Ozaki et al., 2019). У представників ПНСБ виявлено багато різних метаболічних процесів, завдяки яким ці бактерії отримують необхідну енергію. Багато бактерій цієї групи можуть рости за хемотрофних аеробних чи мікроаерофільних умов, отримуючи енергію у процесі дихання за використання органічних речовин, зокрема, органічних кислот чи водню (Ozaki et al., 2019; Adessi et al., 2021).

ПНСБ можуть утворювати водень під час використання органічних субстратів, якими можуть бути різні відходи. Утворення водню фотосинтезувальними мікроорганізмами відбувається за умов використання світла (Adessi et al., 2017). Ці бактерії можуть продукувати індол-3-оцтову та 5-амінолевулінову кислоти, а також полі- β -гідроксибутират (Basak, & Das, 2007; Gabrielyan et al., 2016; Adessi et al., 2021). Продукти метаболізму клітин ПНСБ можуть бути використані як біодобриво для рослин (Sepúlveda-Muñoz et al., 2023).

Ефективність перетворення енергії та оптимальне джерело Карбону є ключовими факторами, які визначають отримання водню в біологічних системах (Basak, & Das, 2007). Виділення та дослідження нових штамів H_2 -продукуючих фототрофних бактерій важливе для розроблення технологічних процесів, у яких поєднують нефотосинтезувальні та фотосинтезувальні бактерії у гібридній системі,

що може забезпечити збільшення виходу водню (Basak, & Das, 2007; Gabrielyan et al., 2016).

Забруднення ґрунту і ґрунтових вод промисловими органічними та неорганічними, сільськогосподарськими й побутовими відходами вже давно стало серйозною проблемою для довкілля та здоров'я населення. Нітроген аміаку, нітрат- і нітрит-іони є неорганічними забруднювачами, як і F^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Ca^{2+} і Mg^{2+} . У підземних водах було виявлено органічні забруднювачі, і їхній вміст продовжує зростати (Kurwadkar, 2019; Копанчук, 2020). Очищення стічних вод за участі мікроорганізмів є ефективною, економічно вигідною альтернативою фізичним і хімічним методам. Штами ПНСБ використовують для очищення не тільки стічних вод, а й акваріумних вод і сільськогосподарських стоків. Бактерії метаболізують органічні кислоти, моносахариди, полісахариди (Rajani et al., 2016; Merugu et al., 2017; Costa et al., 2017; Sepúlveda-Muñoz et al., 2023).

Дослідження з очищення навколишнього середовища за використання біоелектрохімічних систем є перспективними з огляду на їхнє практичне застосування. У мікробних паливних елементах (МПЕ) екзоелектрогенні бактерії окиснюють органічні речовини і переносять електрони на анод (Gadkari et al., 2019). Представники класів *Alphaproteobacteria* та *Betaproteobacteria* генерують електричний струм (Venkidusamy, & Megharaj, 2016). Зокрема, екзоелектрогенами є *Rhodospseudomonas palustris* DX-1 і *Rhodospseudomonas palustris* RP2 (Xing et al., 2008; Venkidusamy, & Megharaj, 2016). Хоча пурпурові бактерії були модельними організмами для вивчення фотохімічних процесів у фотосинтезуювальних організмів, дослідження їхніх фотобіоелектрохімічних властивостей розпочалося нещодавно (Grattieri, 2020).

З огляду на описане вище, можна стверджувати, що інтерес до пурпурових бактерій зростає. Визначення чисельності ПСБ та ПНСБ є важливим для оцінки внеску цих мікроорганізмів у біогеохімічні цикли Карбону, Нітрогену та Сульфуру, зокрема, у техногенно трансформованих екосистемах, а дослідження властивостей бактерій розширює знання про їхню роль у трансформації сполук Сульфуру та Нітрогену.

З води озера Яворівське (Львівська область, Україна), яке утворилося на місці кар'єру колишнього сірковидобувного підприємства у результаті затоплення та водоносний комплекс якого містить великі кількості H_2S та збагачений сульфат-іонами, виділені пурпурові несіркові бактерії *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано в межах наукових досліджень, які проводили на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка за темами: “Функціонування мікробоценозів антропогенно змінених територій” (№ державної реєстрації 0115U003549, термін виконання 2015–2017 рр.), “Функціонування мікробоценозів техногенно змінених територій та їхня участь у трансформації сполук важких металів і Сульфуру” (№ державної реєстрації 0116U001534, термін виконання 2016–2018 рр.), “Адаптації мікроорганізмів, які перетворюють сполуки Сульфуру у природі, до впливу хімічних забруднень як стресових чинників” (№ державної реєстрації 0120U101771, термін виконання 2020–2024 рр.), “Моделювання та прогнозування впливу хімічних забруднень на мікроорганізми, які перетворюють сполуки Сульфуру” (№ державної реєстрації 0121U109616, термін виконання 2021–2023 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити закономірності використання сульфід-, тіосульфат- і нітрит-іонів фототрофними пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620, виділеними з озера Яворівське, для визначення їхньої ролі у перетворенні сполук Сульфуру та Нітрогену і встановлення можливості практичного використання. Для досягнення мети поставлені завдання, які будуть поступово представлені на презентації.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

- 1) визначити чисельність фототрофних несіркових і сіркових бактерій у техногенно зміненій екосистемі (озеро Яворівське) і природній водоймі (Розточчя);
- 2) виділити й ідентифікувати фототрофні пурпурові несіркові бактерії, дослідити їхні морфолого-фізіологічні та біохімічні властивості;

3) дослідити здатність бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовувати відновлені сполуки Сульфуру (гідроген сульфід- і тіосульфат-іони) та нітрит-іони як донори електронів упродовж росту в модельних поживних середовищах або стічних водах;

4) встановити можливість використання *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у процесі утворення екологічно чистої енергії (водню) та генеруванні електричного струму з метою ремедіації середовища від забруднення органічними сполуками.

Об'єктом дослідження є перетворення сполук Сульфуру та Нітрогену, утворення водню і генерування струму фототрофними пурпуровими бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620.

Предмет дослідження: перетворення сполук Сульфуру і Нітрогену фототрофними пурпуровими бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620, виділеними з техногенно зміненого середовища – озера Яворівське.

Методи дослідження – мікробіологічні (виділення чистих культур мікроорганізмів, дослідження їхніх властивостей, культивування бактерій *in vitro*), молекулярної біології (виділення й аналіз ДНК, гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція), хроматографічні (дослідження вмісту органічних кислот, складу газової фази), хіміко-аналітичні (визначення вмісту сульфід-, тіосульфат-, сульфат-, нітрит-, нітрат-іонів, елементної сірки, йонів кальцію, магнію, хімічного споживання кисню та ін.), електрохімічні (дослідження генерування бактеріями електричного струму), статистичні (для аналізу й оцінки достовірності статистичних параметрів експериментальних даних).

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше визначено кількість фотосинтезувальних несіркових бактерій у воді озера Яворівське та воді джерельного типу заповідника Розточчя. Вивчення властивостей виділеного штаму *R. yavorovii* ІМВ В-7620 є важливим для розуміння процесів кругообігу сполук Сульфуру і Нітрогену в природі. Показано здатність виділеного й ідентифікованого штаму пурпурових несіркових бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовувати нітрит-іони як донор електронів. Отримані дані дають змогу зробити висновки щодо ймовірного впливу цього метаболічного процесу на глобальний цикл

Нітрогену. Описано наукові підходи щодо використання *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у процесах отримання водню та електричного струму за одночасної біоремедіації стічних вод харчової промисловості.

Практичне значення отриманих результатів. Практичне значення дисертаційної роботи полягає у можливості використання пурпурових несіркових бактерій для дослідження механізмів генерування електричного струму та продукування водню. Отримано патент на корисну модель. На основі бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 можуть бути розроблені технології очищення забруднених органічними та неорганічними сполуками водних середовищ. Результати дисертаційної роботи впроваджені у процесі викладання курсів “Мікробіологія”, “Актуальні питання практичної мікробіології”, “Біогеохімічна діяльність мікроорганізмів”, “Екологія мікроорганізмів”, “Фізіологія і біохімія мікроорганізмів” для студентів закладів вищої освіти.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно опрацьовано літературу за темою роботи і за її проблемними питаннями. Особисто підготовано огляд літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено статистичне опрацювання результатів досліджень. Разом з науковим керівником к. б. н., проф. С. О. Гнатуш проведено планування експериментів, здійснено інтерпретацію результатів, розроблено основні положення дисертаційної роботи і підготовано до друку наукові публікації. Спільно з д. б. н., проф. Б. О. Осташем проведено секвенування консервативної ділянки 16S рРНК. Спільно зі ст. наук. сп., к. б. н. В. М. Говорухою (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ) проведено аналіз складу газової фази на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД. Спільно з завідувачем вимірювальної лабораторії структурного підрозділу “Науковий Центр” ТзОВ “Інститут ГІРХІМПРОМ” М. Ковальчуком проведено дослідження хімічного складу стічної води. Спільно з завідувачем міжфакультетської лабораторії інструментальних методів дослідження ЛНУ ім. Івана Франка доц., к. б. н. А. А. Галушкою досліджено пігменти *R. yavorovii* ІМВ В-7620 за використання ВЕРХ. Спільно з к. б. н. О. М. Василів досліджено здатність *R.*

yavorovii ІМВ В-7620 генерувати електричний струм у МПЕ. Названі співробітники є співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень репрезентовані на XII-XIV Міжнародних конференціях “Молодь і поступ в біології” (Львів, Україна, 2016–2018 рр.); на звітних наукових конференціях Львівського національного університету імені І. Франка (2017–2018 рр.); на Міжнародній науковій конференції “Досягнення та перспективи розвитку мікробіології” (Львів, 2016 р.); на XV з’їзді товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, 2017 р.); на Міжнародній Вайглівській конференції (Львів, 2017 р.); на XI Міжнародній конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2017 р.); на Міжнародній конференції “Досягнення мікробіології та біотехнології” (Львів, 2018 р.); на Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки Bioscience advances” (Київ, 2018 р.).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 27 наукових праць, серед них – 7 статей у фахових журналах (із них 2 – у виданнях бази Scopus, 1 – у виданні бази Web of Science), 1 свідоцтво про депонування штаму бактерій, 1 патент на корисну модель і 18 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Структура й обсяг дисертації. Дисертація містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати дослідження, обговорення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел (197 посилань) і додатки. Роботу викладено на 180 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 31 рисунком та 14 таблицями.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ
ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОТРОФНИХ ПУРПУРОВИХ БАКТЕРІЙ І
ЇХНЄ ЗНАЧЕННЯ В ПЕРЕТВОРЕННІ СПОЛУК СУЛЬФУРУ ТА
НІТРОГЕНУ У ПРИРОДІ

1.1 Особливості метаболізму фототрофних пурпурових бактерій

Пурпурові бактерії (ПБ) – гетерогенна група мікроорганізмів, які ростуть за анаеробних умов, здійснюючи аноксигенний фотосинтез. Їх поділяють на пурпурові несіркові бактерії, які можуть бути фототрофами чи хемотрофами, та пурпурові сіркові бактерії, які майже всі ростуть за умов освітлення, і лише деякі з них – у темряві (Kerpen et al., 2013; Imhoff, 2017; Dahl, 2017).

ПСБ та ПНСБ бактерії спочатку класифікували за фізіологічними ознаками, враховуючи їхню стійкість до впливу сульфід-іонів. До ПСБ залучали види, які росли у середовищах з мілімолярними кількостями сульфід-іонів та окиснювали останні до сірки (S^0), що накопичувалась усередині клітин. ПНСБ, на відміну від ПСБ, накопичували S^0 поза клітинами (Madigan & Jung, 2009; George et al., 2020). Однак за результатами дослідження (Hansen & van Gemerden, 1972) продемонстровано, що ці критерії для поділу пурпурових бактерій не були достатніми. У середовищах із низькими концентраціями сульфід-іонів (0,5 мМ і менше) більшість видів ПНСБ ростуть і за цих умов окиснюють сульфід-іони до S^0 , тетратіонат-іонів ($S_4O_6^{2-}$) або сульфат-іонів (SO_4^{2-}). Незважаючи на це, є важлива відмінність у перетворенні сульфід-іонів ПСБ та ПНСБ. Сірка, що утворюється ПНСБ, накопичується поза клітинами (Madigan & Jung, 2009; George et al., 2020; Moroz et al., 2021). Класифікацію пурпурових бактерій на основі відмінностей у метаболічних шляхах перетворення сульфід-іонів було підтверджено методами молекулярної біології. Філогенетичні дослідження пурпурових бактерій на основі порівняльного аналізу результатів секвенування 16S рРНК продемонстрували, що ПСБ належать до класу *Gamma*proteobacteria, тоді як пурпурові несіркові бактерії

належать до *Alpha-* або *Betaproteobacteria* (Brenner et al., 2005; Imhoff et al., 2019; George et al., 2020).

Відомо понад 25 родів ПСБ. Представники родини *Chromatiaceae* накопичують елементну сірку у периплазматичному просторі, тоді як представники родини *Ectothiorhodospiraceae* виділяють S^0 поза клітини. Слід зазначити, що результати дослідження процесу окиснення сульфід-іонів бактеріями *Allochromatium vinosum* демонструють, що внутрішньоклітинна сірка, яку вони утворюють, накопичується у периплазмі, а не в цитоплазмі клітини (Brenner et al., 2005; Dahl, 2017).

Бактерії роду *Rhodopseudomonas* належать до родини *Bradyrhizobiaceae* порядку *Rhizobiales* класу *Alphaproteobacteria* (Brenner et al., 2005; Kis et al., 2014). ПНСБ родів *Rhodobacter* і *Rhodopseudomonas* використовують як модельні об'єкти для вивчення механізму фотосинтезу.

ПНСБ виділяли з різних середовищ, таких як ґрунти, рослинні та тваринні організми. Досліджено різноманітні фенотипові ознаки, метаболічні й екологічні властивості кожного роду. Встановлено, що їхній вплив на біогеохімічні цикли Карбону, Сульфуру та Нітрогену має важливе значення. Біологічна фіксація молекулярного азоту, яку здійснюють представники роду *Bradyrhizobium*, є однією із найважливіших їхніх екологічних функцій. У межах родини *Bradyrhizobiaceae* ПНСБ філогенетично тісно пов'язані з видами бактерій, які не здатні до фотосинтезу (Brenner et al., 2005; Zimmer et al., 2016; Imhoff, 2017; Imhoff et al., 2019). Пігменти у складі фотосинтезувального апарату в різних видів ПНСБ мало відрізняються. Це вказує на те, що набуття пурпуровими бактеріями здатності до фотосинтезу, очевидно, відбулося шляхом горизонтального перенесення генів (Nagashima et al., 1997).

Важливою особливістю фототрофних пурпурових бактерій є їхня здатність рости фотоавтотрофно, фіксуючи CO_2 у реакціях відновного пентозофосфатного циклу (цикл Кальвіна) (Гудзь та ін., 2011; George et al., 2020). Ці мікроорганізми добре ростуть за освітлення й анаеробних умов у мінеральних середовищах із додаванням сульфід-іонів і бікарбонату (фотоавтотрофний тип живлення) або

органічного субстрату (фотогетеротрофний тип живлення). ПСБ ростуть фотоавтотрофно, використовуючи сульфід-, тіосульфат-іони або молекулярний водень як донори електронів аноксигенного фотосинтезу (Dahl, 2017; Adessi et al., 2021; George et al., 2020). Кілька видів цієї групи мікроорганізмів також можуть використовувати Fe^{2+} як донор електронів, окиснюючи його до Fe^{3+} (Adessi et al., 2021; Moroz et al., 2021). Бактерії *Thiocapsa* sp. штам KS1 можуть використовувати нітрит-іони як донори електронів, окиснюючи їх до нітрат-іонів (Schott et al., 2010; Nemp et al., 2016). ПСБ можуть рости також фотогетеротрофно, використовуючи органічні кислоти, спирти і навіть вуглеводи (Dahl, 2017; Adessi et al., 2021). Бактерії родів *Allochromatium*, *Thiocystis*, *Amoebobacter* і *Thiocapsa* можуть рости в темряві хемоорганотрофно (Dahl, 2017; George et al., 2020).

ПНСБ є фізіологічно універсальною групою бактерій, котрі добре ростуть як фототрофно, так і хемотрофно. Ріст деяких ПНСБ, наприклад, *Rhodobacter capsulatus*, можливий за фототрофних умов із використанням як CO_2 , так і органічного Карбону, або в темряві за хемолітотрофних умов за рахунок енергії, отриманої у процесах дихання або бродіння (Kerpen et al., 2013; Costa et al., 2017; George et al., 2020). Метаболізм Карбону в ПНСБ описаний в оглядах (Gibson & Harwood, 1995; Tang et al., 2011). За фототрофних аноксигенних умов ПНСБ ростуть з H_2 або низькими концентраціями сульфід-іонів як донорами електронів, деякі види можуть використовувати $S_2O_3^{2-}$, Fe^{2+} (Huang et al., 2010; Moroz et al., 2021) та NO_2^- (Griffin et al., 2007; Nemp et al., 2016; Adessi et al., 2021) як донори електронів. Проте більшість ПНСБ бактерій краще ростуть фотогетеротрофно в середовищах, що містять легкодоступні органічні субстрати, такі як малат або піруват, використовуючи йони амонію як джерело Нітрогену (Dahl, 2017; Moroz et al., 2021). Дріжджовий екстракт є джерелом вітамінів групи В для цих мікроорганізмів. Більшості видам для росту необхідні тіамін, нікотинова кислота, біотин і *n*-амінобензойна кислота. Вітамін B_{12} необхідний для росту лише невеликої кількості ПНСБ (Madigan & Jung, 2009; Hiraishi & Okamura, 2017). Багато видів ПНСБ використовують органічні кислоти, амінокислоти, жирні кислоти, спирти, вуглеводи (Madigan & Jung, 2009; Pott et al., 2013; Hiraishi & Okamura, 2017). Кілька

видів ПНСБ асимілюють ароматичні сполуки, такі як бензол, його гідроксипохідні та циклогексанкарбоксилат за умов освітлення. *Phaeospirillum* (раніше *Rhodospirillum*) *fulvum* та *Rhodopseudomonas palustris* ростуть у середовищах з бензеном (Gibson & Harwood, 1995; Austin et al., 2015). *Blastochloris sulfoviridis* використовують для росту толуен (Zengler et al., 1999).

Багато органічних сполук, які асимілюють ПНСБ за умов освітлення, використовують їх як донори електронів і джерела Карбону для росту за хемотрофних умов. У представників різних родів толерантність до кисню відрізняється. Наприклад, бактерії роду *Rhodobacter* можуть рости за умов сильної аерації (Adessi et al., 2021). Деякі ПНСБ можуть рости за анаеробних умов у темряві, здійснюючи анаеробне дихання, а деякі – отримуючи енергію під час ферментації гексоз (Uffen et al., 1978), хоча для бактерій роду *Rhodobacter* (раніше *Rhodopseudomonas*) *capsulatus* і *Rhodobacter* (раніше *Rhodopseudomonas*) *sphaeroides* виявлено незначне нагромадження біомаси за цих умов (Schulz & Weaver, 1982). *R. sphaeroides* є типовими денітрифікаторами, які відновлюють NO_3^- до N_2 (Bergaust et al., 2014). ПНСБ можуть фіксувати молекулярний азот, за винятком лише кількох їхніх представників (Madigan & Jung, 2009). *R. capsulatus* і *R. sphaeroides* ростуть у середовищі з N_2 як єдиним джерелом Нітрогену, на що вказують найвищі показники активності нітрогенази *in vivo* (Masepohl & Hallenbeck, 2010).

Хемолітотрофія досить поширена серед ПНСБ у природі, але, ймовірно, здатність отримувати енергію під час окиснення неорганічних донорів електронів забезпечує останнім додаткову конкурентоздатність серед бактерій, які не здатні до фотосинтезу (Dahl, 2017).

Результати секвенування повних послідовностей геному *Rhodopseudomonas palustris* та інших видів ПНСБ вказують на метаболічну різноманітність цієї групи бактерій. Було встановлено, що геном *R. palustris* містить усі гени, необхідні для переходу від хемотрофії до фототрофії, від органотрофії до літотрофії, від гетеротрофії до автотрофії (Adessi et al., 2021).

Основні етапи процесів фотосинтезу та дихання відбуваються на мембранах ПБ. У цих двох процесах АТФ утворюється внаслідок протонно-рушійної сили, що генерується у процесі транслокації електронів у ланцюзі перенесення електронів (ЛПЕ). Однак ці два процеси відбуваються на різних мембранах пурпурових бактерій: у цитоплазматичній мембрані, що містить компоненти дихального апарату, та внутрішньоцитоплазматичних мембранах, які містять фотосинтезувальний апарат (Klamt, Grammel, Straube, Ghosh, & Gilles, 2008; Moroz et al., 2021).

Особливість ПБ полягає в їхній здатності запасати енергію у формі АТФ за анаеробних умов, використовуючи світло як джерело енергії. У цьому процесі бактеріохлорофіли (Бхл) *a* чи *b* є як основними донорами електронів у ПНСБ, так і кінцевими акцепторами електронів, оскільки аноксигенний фотосинтез – це циклічний процес (рис. 1.1) (Brinkmann et al., 2018). Світлозбиральні комплекси поглинають фотон світла (див. рис. 1.1) і передають збудження до бактеріохлорофілів у реакційному центрі (РЦ), де відбувається трансформація електромагнітної енергії в хімічну (Codgell et al., 2006; Adessi et al., 2021). Ця енергія використовується для вивільнення електрона. Як тільки світлозбиральні комплекси поглинули наступний фотон світла, електрон із хінону транспортується до цитохромів *bc₁*. Пізніше відбувається транспорт електронів до цитохрому *c₂* та вивільнення протонів у периплазматичному просторі. Цитохроми *c₂* здатні відновлювати окиснені первинні донори електронів в РЦ, таким чином замикаючи цикл (Brinkmann et al., 2018). Протони, накопичені в периплазмі, утворюють протонний градієнт, який АТФ-синтаза використовує для утворення АТФ (див. рис. 1.1).

ЛПЕ під час аноксигенного фотосинтезу пов'язаний із дегідрогеназами. Ця взаємодія відбувається переважно на рівні пулу убіхінону (Q-пул), що є ключовим у разі поєднання транспортування електронів та обміну речовин під час фототрофного росту. Під час фотогетеротрофного росту з дикарбоновими кислотами як джерелами Карбону головними дегідрогеназами є НАДН-дегідрогеназа та сукцинатдегідрогеназа (див. рис. 1.1).

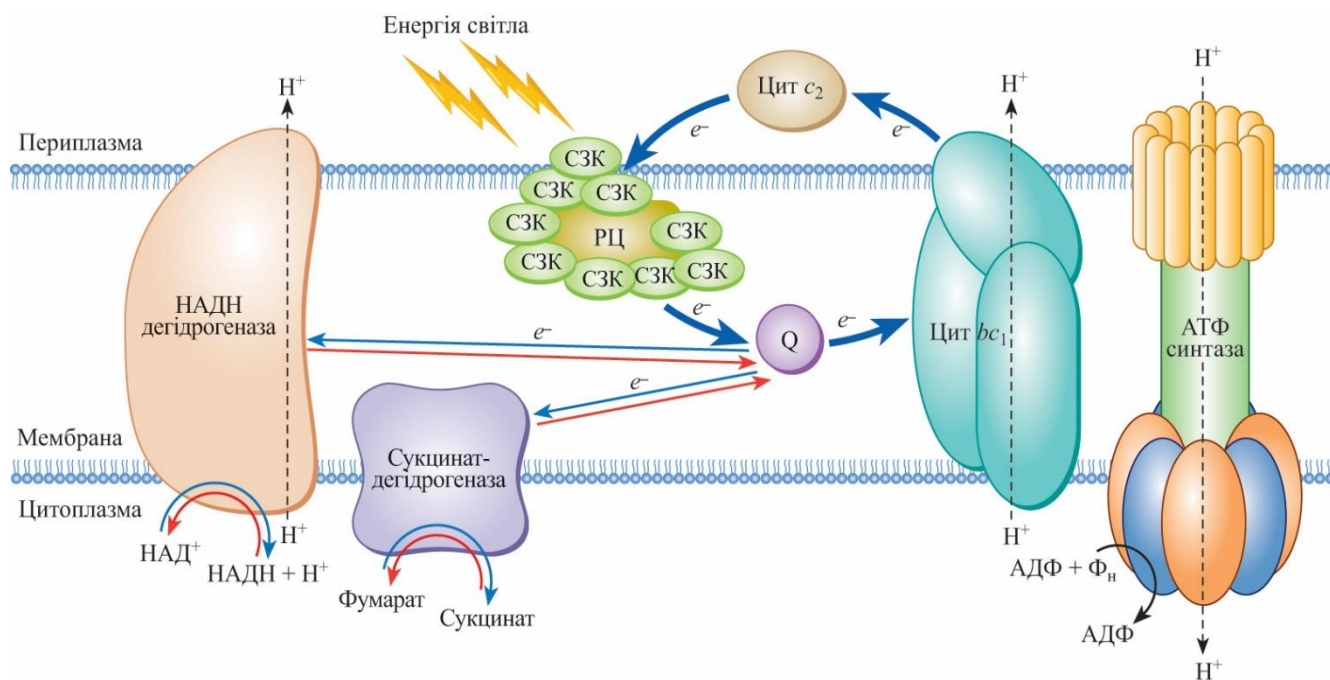


Рис. 1.1 – Схематичне зображення ланцюга перенесення електронів за освітлення й анаеробних умов росту пурпурових бактерій: РЦ – реакційний центр; СЗК – світлозбиральний комплекс; Q – хінони; Цит bc_1 – комплекс цитохромів bc_1 ; Цит c_2 – цитохром c_2 . Транспорт електронів під час фотосинтезу позначений синіми жирними стрілками; нециклічний транспорт електронів позначений тонкими синіми стрілками; червоні стрілки вказують на окиснення НАДН і сукцинату й відновлення хінонів (Q); пунктиром позначені етапи транслокації протонів (модифіковано за Adessi et al., 2021)

Убіхінол, що утворюється у разі окиснення сукцинату, може окиснюватися за рахунок зворотного електронного потоку до хінонів (Q). НАДН-дегідрогеназа каталізує окиснення НАДН за аеробних умов, але за фототрофних умов діє як убіхінол-НАД⁺ оксидоредуктаза. Сукцинатдегідрогеназа бере участь у функціонуванні ЛПЕ і ЦТК і переносить електрони зі сукцинату на Q (Fixen et al., 2019). НАДН використовують бактерії у процесах асиміляції CO₂. Для поповнення електронів, що не повернулися на “вакансії”, які виникли в первинних донорах, ПБ використовують екзогенні донори електронів (Гудзь та ін., 2011; Adessi et al., 2021).

За наявності O_2 відбувається пригнічення синтезу пігментів аноксигенного фотосинтезу в ПБ, а АТФ синтезується під час аеробного дихання (рис. 1.2) (Klamt et al., 2008; Alsiyabi, Immethun & Saha, 2019).

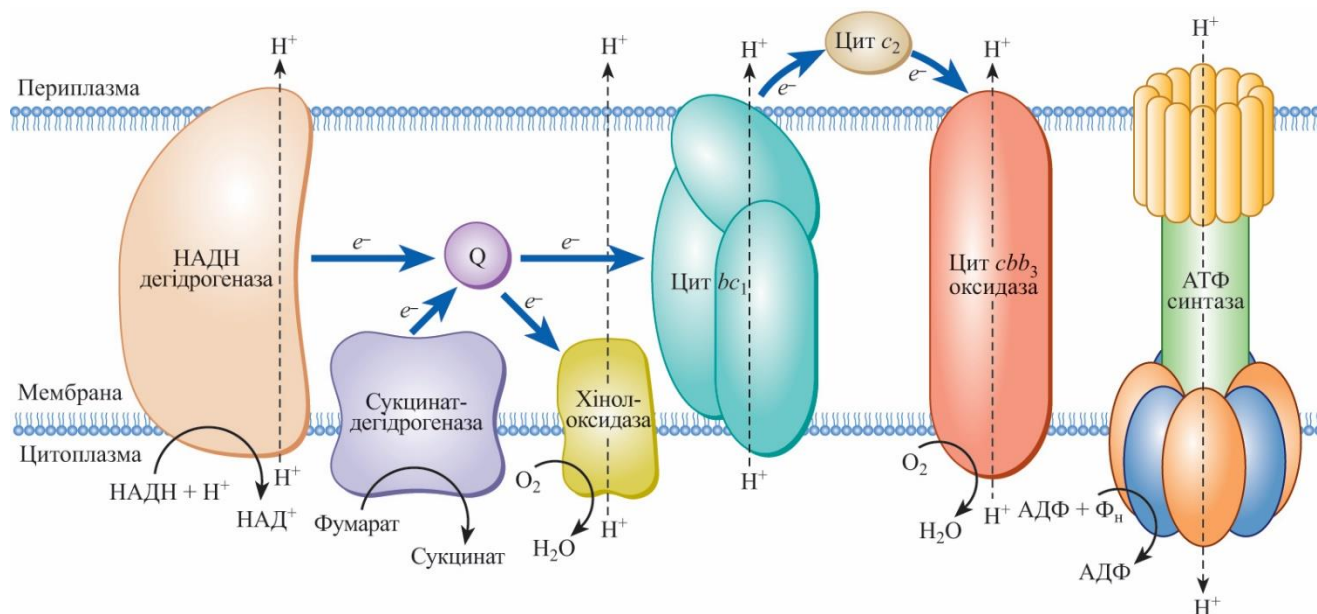


Рис. 1.2 – Схематичне зображення ланцюга перенесення електронів за аеробних умов росту пурпурових бактерій: Q – хінон; Цит bc_1 – комплекс цитохромів bc_1 ; Цит c_2 – цитохром c_2 . Сині жирні стрілки вказують на потік електронів під час дихання за аеробних умов росту. Пунктирними стрілками позначені етапи транслокації протонів (модифіковано за Adessi et al., 2021)

За участю НАДН-дегідрогенази відбувається окиснення НАДН із подальшим відновленням хінону. Q також може бути відновлений за участю сукцинатдегідрогенази, але в цьому процесі транслокація протонів не відбувається. Відновлений хінон мігрує крізь мембрану і може окиснюватись як хінолоксидазою (тоді кисень є акцептором електронів), так і комплексом цитохромів bc_1 , який функціонує так само, як і під час фотосинтезу, та на стадії транслокації протонів передає електрони на цитохром c_2 . Цей розчинний білок за аеробного дихання окиснюється за участю цитохром cbb_3 -оксидази. Кінцевим акцептором електронів у цій реакції є O_2 . Як і у процесі фотосинтезу, накопичені в периплазмі протони утворюють протонний градієнт, який використовується АТФ-синтазою для

генерування АТФ (див. рис. 1.2). Хінолоксидаза окиснює хіноли (QH_2) до хінонів (Q). Цей фермент перекачує протони в периплазматичний простір (Swem & Bauer, 2002; Adessi et al., 2021).

Таким чином, відіграючи провідну роль у процесах колообігу біогенних елементів, фототрофні пурпурові несіркові бактерії беруть участь у перетворенні сполук Сульфуру, Нітрогену та Карбону, зокрема, за рахунок використання сульфід-, тіосульфат-, тетратіонат-, нітрит-іонів та органічних сполук як донорів електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу. Штами цих бактерій можуть бути високорезистентними до несприятливих факторів довкілля за рахунок метаболічної лабільності, тобто здатності до переходу від хемотрофії до фототрофії, від органотрофії до літотрофії, від гетеротрофії до автотрофії, що забезпечує їхнє виживання.

1.2 Метаболізм сполук Сульфуру

ПСБ є представниками родин *Chromatiaceae* і *Ectothiorhodospiraceae*, які використовують відновлені сполуки Сульфуру як донори електронів під час фотолітоавтотрофного росту. Бактерії з родини *Chromatiaceae* утворюють внутрішньоклітинні глобули сірки під час росту в середовищах зі сульфід-іонами, полісульфідами, тіосульф-іонами, на відміну від представників родини *Ectothiorhodospiraceae*, які виділяють їх назовні клітин. Глобули сірки в клітинах представників родини *Chromatiaceae* оточені білковою оболонкою, і це є характерною ознакою більшості, якщо не всіх фототрофних пурпурових сіркових бактерій (George et al., 2020). Бактерії *Thiorhodospira sibirica* з родини *Ectothiorhodospiraceae* нагромаджують позаклітинну і внутрішньоклітинну сірку (Bryantseva et al., 1999). Окиснення полісульфідів є поширеним явищем серед ПСБ, оскільки вони утворюються як проміжні продукти окиснення сульфід-іонів до сірки (Prange et al., 2004). Використання сульфід-іонів, елементної сірки та тіосульфат-іонів властиве видам роду *Ectothiorhodospira*, тоді як види родів *Halorhodospira* і *Thiorhodospira* окиснюють лише сульфід-іони до сульфат-іонів.

Halorhodospira halophila у процесі росту використовують лише тіосульфати (Raymond & Sistro, 1969). Здатність рости у середовищі зі сульфід-іонами за концентрації 11 мМ характерна для ПСБ *Thiorhodococcus drewsii* (Zaar et al., 2003).

Тривалий час вважали, що ПНСБ не використовують відновлені сполуки Сульфур у як донори електронів. Першу згадку про те, що ці мікроорганізми справді здатні використовувати сполуки Сульфур, можна знайти у Hansen & van Gemerden (1972), де описано здатність *Rhodospirillum rubrum*, *R. palustris*, *R. spheroides* використовувати сульфід-іони під час фотолітоавтотрофного росту. ПНСБ здатні використовувати токсичні сполуки Сульфур, такі як сульфіди, за набагато менших концентрацій, порівняно з ПСБ. Проте багато видів ПНСБ досить стійкі до впливу сульфід-іонів. Наприклад, морські штами роду *Rhodobacter* (раніше *Rhodopseudomonas*) *sulfidophilus* і *Rhodoferax antarcticus*, виділені з нижніх, насичених сульфідами вод постійно замерзлого прісноводного озера Фрікселл (Fryxell), можуть рости у середовищах зі сульфід-іонами за концентрацій понад 4 мМ, які є токсичними для багатьох ПСБ (Madigan et al., 2000; Sattley & Madigan, 2006; Madigan & Jung, 2009).

Фототрофні бактерії класу *Betaproteobacteria* рядів *Rhodocyclales* і *Burkholderiales* не використовують відновлені сполуки Сульфур. Навіть низькі концентрації сульфідів пригнічують їхній ріст (Dahl, 2017). Однак у геномі *Rubrivivax gelatinosus* є *sox* гени, що вказує на можливість використання цими бактеріями тіосульфат-іонів (Sander & Dahl, 2009).

Серед представників ПНСБ класу *Alphaproteobacteria* поширена здатність до використання відновлених сполук Сульфур. Утворені проміжні та кінцеві продукти значно різняться залежно від виду мікроорганізмів. Повне окиснення сульфід-іонів до сульфат-іонів було описано для кількох видів (Frigaard & Dahl, 2008; Sander & Dahl, 2009; Wu et al., 2021). Деякі види ПНСБ, зокрема, *Rhodoplanes roseus* і *Rhodoplanes elegans* як донор електронів використовують лише тіосульфати (Hiraishi & Ueda, 1994). Тіосульфат-іони використовують багато видів бактерій, повністю окиснюючи їх до сульфат-іонів (рід *Rhodovulum*) або перетворюючи до тетратіонат-іонів (*Rhodopila globiformis*). Деякі види використовують для росту

елементну сірку, зокрема, *Rhodopseudomonas julia* та багато видів роду *Rhodovulum* (Sander & Dahl, 2009).

Окиснення відновлених сполук Сульфуру найкраще описано на прикладі ПСБ *Allochromatium vinosum*. Для побудови схеми окиснення сполук Сульфуру в *A. vinosum* (рис. 1.3) поєднали результати біохімічних досліджень, інформацію про секвенування геному, а також загальне транскриптомічне профілювання геному і порівняльно-кількісну протеоміку (Weissgerber et al., 2011; Weissgerber et al., 2014).

Окиснення тіосульфат-іонів. Відомо про два різні шляхи окиснення $S_2O_3^{2-}$. У першому – два аніони тіосульфату окиснюються до тетратіонат-іонів за участю тіосульфатдегідрогенази (TsdA) (див. рис. 1.3). У другому – ці аніони за участі периплазматичного Sox мультиензимного комплексу окиснюються до сульфат-іонів (Friedrich et al., 2001). У деяких бактерій, зокрема, *A. vinosum*, є два шляхи (Hensen et al., 2006; Dahl, 2017). Здатність до окиснення двох іонів тіосульфату до тетратіонат-іонів ($2 S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2e^-$) поширена серед прокариот. Ця реакція є проміжним етапом окиснення відновлених сполук Сульфуру до сульфат-іонів не тільки для хемолітоавтотрофних бактерій (Then & Truper, 1981; Dahl, 2017), але і для деяких ПНСБ, а саме *Rhodomicrobium vannielii* і *Rhodopila globiformis*, та ПСБ *A. vinosum* (Hensen et al., 2006; Frigaard & Dahl, 2008; Dahl, 2017). У клітинах *A. vinosum* ідентифіковано ген (*tsdA*), що кодує периплазматичну дигемовмісну цитохром *c* тіосульфатдегідрогеназу (Denkman et al., 2012). Окиснення тіосульфат- до сульфат-іонів за участю мультиензимного Sox-комплексу відбувається у периплазмі в *A. vinosum* (Friedrich et al., 2001).

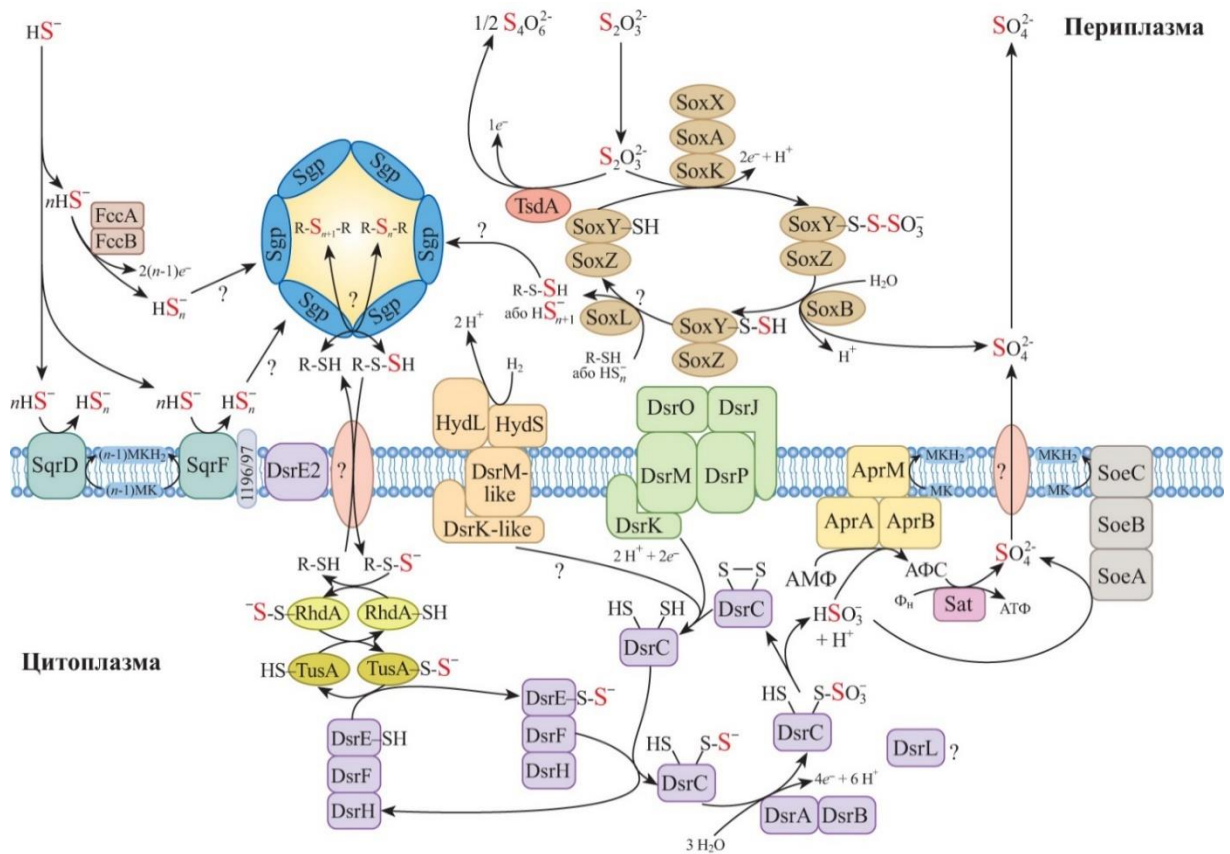


Рис. 1.3 – Схема окиснення Сульфуру *Allochroamtium vinosum*: SoxB, SoxX, SoxYZ – протеїни Sox-комплексу; TsdA – цитохром *c* тіосульфатдегідрогеназа; FccAB – флавоцитохром *c* сульфіддегідрогеназа; SqrDF – сульфід:хіноноксидоредуктаза; Sgp – протеїни оболонки сіркових глобул; DsrAB – зворотна дисиміляційна сульфїтредуктаза; DSR-система (DsrEFH, DsrC), що містить зворотну дисиміляційну сульфїтредуктазу (DsrAB) і гетеросульфїдредуктазу (DsrKM-like), яка каталізує окиснення сірки до сульфїт-іонів; TusA, RhdA, і, можливо, dsrE2A – сульфуртранспортні протеїни; Soe ABC – фермент, що каталізує пряме окиснення сульфїт-іонів до сульфат-іонів у цитоплазмі *A. vinosum*; AprMBA – аденозин-5-фосфосульфатредуктаза; Sat – аденозинтрифосфатсульфурилаза; АФС – аденозин-5-фосфосульфат (модифіковано за Weissgerber et al., 2014)

У термоацидофільних архей *Acidianus ambivalens* виявлено мембранозв'язану тіосульфат:хінон оксидоредуктазу (ТҚО), що каталізує реакцію окиснення тіосульфат- до тетратіонат-іонів (Dahl, 2020).

Sox-шлях метаболізму тіосульфат-іонів у бактерій *A. vinosum*, що накопичують глобули сірки як проміжні продукти, та *Paracoccus pantotrophus*, що не утворюють їх, має принципову відмінність, яка полягає у залученні гемомолібдопротеїну SoxCD у процес окиснення тіосульфат-іонів (рис. 1.4, А).

У *P. pantotrophus* Sox-комплекс задіяний в окисненні тіосульфатів *in vivo* та каталізує відновлення цитохрому *c*, який бере участь у процесах окиснення тіосульфат-, сульфід-, сульфит-іонів та елементної сірки *in vitro*.

У мікроорганізмів, які не накопичують глобул сірки всередині клітин, окиснення тіосульфат-іонів відбувається за участю чотирьох різних протеїнів: SoxB, SoxXA, SoxYZ і SoxCD Sox-комплексу (див. рис. 1.4, А) (Friedrich et al., 2001). Гетеродимерний білок SoxYZ каталізує перенесення проміжних метаболітів до залишку цистеїну, розташованого поблизу карбоксильного кінця SoxY субодиниці. Цитохром *c* SoxXA каталізує утворення дисульфідного зв'язку між Сульфуром тіосульфату і Сульфуром цистеїну SoxYZ. Сульфогрупа потім гідролітично вивільняється у вигляді йонів сульфату в реакції, що каталізується SoxB. Наступним етапом є окиснення SoxYZ-SS⁻ до SoxYZ-SSO₃²⁻ за участю гемомолібдопротеїну SoxCD, а далі знову відбувається гідролітичне вивільнення сульфат-іонів (Appia-Ayme et al., 2001; Friedrich et al., 2001).

У мікроорганізмів, які утворюють глобули сірки як проміжний продукт, SoxCD немає, а сульфур SoxYZ-SS⁻ переноситься на сірку (S_n), що накопичується у периплазмі у вигляді глобул (рис. 1.4, Б). Процес відбувається за невідомими механізмами, можливо, із залученням подібного до родонази протеїну SoxL (Friedrich et al., 2001).

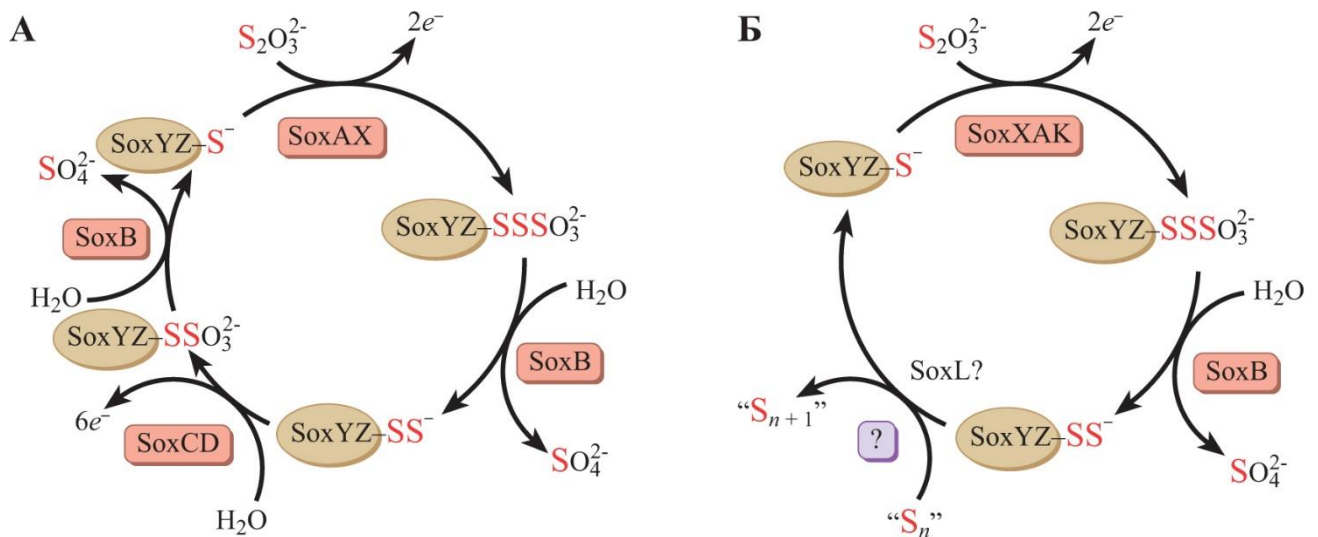


Рис. 1.4 – Схема Sox-окиснення тіосульфат-іонів у *Paracoccus pantotrophus* (А) і *Allochromatium vinosum* (Б) у периплазмі клітин: SoxB, SoxXA(K), SoxYZ, Sox CD – гемомолібдопротеїни; SoxYZ-SS⁻ – сульфан сульфуру, зв'язаний зі SoxYZ; SoxYZ-SSO₃²⁻ – сульфон сульфуру тіосульфату, зв'язаний зі SoxYZ (модифіковано за Sander & Dahl, 2009)

У ПСБ та ПНСБ є Sox-комплекс окиснення тіосульфат-іонів. Проте гени, що кодують гемомолібдопротеїн SoxCD, у ПСБ не ідентифіковано (Friedrich et al., 2001).

Окиснення сульфід-іонів. У ПНСБ *Rhodovulum sulfidophilum* із родини *Rhodobacteraceae* у природних умовах ферменти Sox системи каталізують окиснення йонів не лише тіосульфату, але і сульфїду (Appia-Ayme et al., 2001). Сульфїд:хіноноксидоредуктаза (SQR) і флавоцитохром *c* сульфїддегідрогеназа (FccAB) є двома основними ферментами, що беруть участь в окисненні сульфїд-іонів у *A. vinosum* (Meyer & Cusanovich, 2003; Dahl, 2017). Гени, що кодують SQR та FccAB, наявні і у ПСБ, і у ПНСБ (Friedrich et al., 2001).

Полісульфїди є первинними продуктами окиснення сульфїд-іонів у *A. vinosum* та інших ПСБ (Prange et al., 2004). Не з'ясовано, як полісульфїди перетворюються на глобули сірки (див. рис. 1.3). Висувають припущення, що це може бути спонтанним хімічним процесом (Dahl, 2017; Dahl, 2020).

Окиснення елементної сірки. ПСБ окиснюють елементну сірку, що надходить ззовні. S^0 є у формі циклічного (S_8 кілець) і аліфатичного полімерного Сульфур. Трапляються також S_7 кільця. Елементна сірка практично нерозчинна у воді. До цих пір не досліджено, як саме фототрофи зв'язують і поглинають субстрат. Для *A. vinosum* необхідним є прямий контакт клітин зі сіркою для її використання (Dahl, 2017).

В аноксигенних фототрофних сіркових бактерій глобули сірки утворені як проміжний продукт окиснення йонів сульфідів, вони ніколи не відкладаються у цитоплазмі. Незалежно від місця локалізації, глобули сірки мають подібну структуру. У ПСБ глобули сірки за структурою є довгими ланцюгами Сульфур, що можуть закінчуватися органічними залишками (Prange et al., 2002; Dahl, 2017). У більшості випадків глобули сірки наявний у вигляді S_8 -кілець нанокристалічної будови (Dahl, 2020).

Під час окиснення відновлених сполук Сульфур *A. vinosum* накопичують Сульфур у периплазмі у вигляді внутрішньоклітинних глобул сірки (див. рис. 1.3). Глобули оточені протеїновою оболонкою, яка складається з протеїнів SgpA, SgpB, SgpC. Злиття гена-репортера *sgpA* і лужної фосфатази показало конститутивну експресію *sgpA* в *A. vinosum* і дало додаткові докази периплазматичної локалізації глобул сірки. У бактерій, які утворюють позаклітинні глобули сірки, Sgp протеїни не виявлено (Prange et al., 2004).

Окиснення молекулярної сірки до сульфід-іонів. Окиснення глобул сірки у фототрофних сіркових бактерій дотепер залишається важливим предметом дослідження. Добре охарактеризовано DSR-систему, що включає зворотну дисиміляційну сульфідредуктазу (DsrAB), яка каталізує окиснення сірки до сульфід-іонів. Припускають, що низькомолекулярні органічні персульфіди, такі, наприклад, як глутатіонамід персульфід, можуть бути молекулами-носіями, що транспортують Сульфур із периплазматичних або позаклітинних сіркових глобул до цитоплазми (Frigaard & Dahl, 2008; Dahl, 2017). Остаточо не відомо, як саме утворюються молекули-носії (йони персульфіду) і чи специфічні ферменти беруть участь у цьому процесі. Система Cys-SSH, виявлена в *A. vinosum* (див. рис. 1.3), транспортує атоми Сульфур, які входять до складу глобул сірки, через каскад

протеїн-персульфідних проміжних продуктів, розміщених на родоназах TusA або, можливо, на DsrE2A, DsrE і DsrC, до активного центру сульфїтредуктази (Dahl et al., 2013; Tanabe et al., 2019) – ферменту, що каталізує утворення сульфїт-іонів. Hdr-ферментна система є центральним і ключовим елементом у біоенергетиці сіркоокиснювальних прокаріот, у яких немає DSR системи (Zhan et al., 2019; Wang et al., 2019). *Dsr* гени наявні лише у ПСБ (Dahl, 2017).

Окиснення сульфїт-іонів до сульфат-іонів. Останнім етапом окиснення відновлених сполук Сульфуру є утворення сульфат-іонів зі сульфїт-іонів, яке характерне для великої кількості мікроорганізмів. Багато ПСБ можуть використовувати навіть зовні доступні сульфїт-іони як донори електронів. Описано два різні шляхи окиснення сульфїт-іонів у хемотрофних і фототрофних бактерій: пряме окиснення та непряме (АМФ-залежне окиснення через проміжний метаболіт: аденозин-5'-фосфосульфат (АФС)) (Dahl, 2017).

Ферменти, що каталізують пряме окиснення сульфїт-іонів, локалізовані у периплазмі грамнегативних бактерій. Пурпурові бактерії, які утворюють сіркові глобули у процесі окиснення йонів тіосульфату, містять Sox систему без SoxCD протеїнів (Hensen et al., 2006; Frigaard & Dahl, 2008; Dahl, 2017).

Значна кількість пурпурових бактерій окиснюють сульфїт-іони в цитоплазмі, використовуючи непрямий шлях з утворенням аденозин-АФС. Окиснення сульфїт-іонів і АФС у цих бактерій каталізують АФС-редуктаза (AprBA) і АТФ-сульфурилаза (Sat), відповідно (Frigaard & Dahl, 2008; Dahl, 2017) (див. рис. 1.3). У бактерій *A. vinosum* ген *sat*, що кодує АТФ-сульфурилазу, розташований безпосередньо біля *aprMBA* генів, що кодують мембранозв'язану АФС-редуктазу (Weissgerber et al., 2011). Теоретично обґрунтовано важливу функцію протеїну AprM як мембранного якоря, що зв'язує АФС-редуктазу з цитоплазматичною мембраною. Також було висловлено припущення про те, що AprM є місцем транслокації електронів, які виділяються у процесі формування АФС зі сульфїт-іонів і АМФ, крізь мембрану (Meyer & Kuever, 2007). Бактерії, здатні окиснювати сульфур сульфїт-іонів, мають комплекс протеїнів QmoABC, що функціонує як акцептор електронів, які виділяються у процесі утворення АФС, і тому має

функцію, аналогічну AprM. Отже, можна стверджувати, що електрони, які виділяються у процесі утворення АФС з іонів сульфїту й АМФ, приєднуються до фотосинтезувального ланцюга перенесення електронів на рівні пулу хїнонів (менахінону) завдяки AprM або комплексу QmoABC (Meyer & Kuever, 2007; Dahl, 2017).

Слід зазначити, що шлях окиснення сульфїт-їонів до сульфат-їонів, каталізований АФС-редуктазою, характерний не для всіх ПСБ і не є основним у *A. vinosum* (Dahl, 1996; Dahl, 2017). Гени *sat* і *aprAB* не трапляються у деяких представників родини *Chromatiaceae* (Meyer & Kuever, 2007) і бактерій родини *Ectothiorhodospiraceae*. Ідентифіковано мембранозв'язаний Fe-S Мо-протеїн SoeABC, що каталізує пряме окиснення йонів сульфїту до сульфат-їонів у цитоплазмі *A. vinosum* (Neumann et al., 2000; Dahl, 2017) (див. рис. 1.3). Гени, що кодують комплекс протеїнів SoeABC, наявні в пурпурових, а також у зелених сіркових бактерій. Припускають, що SoeABC беруть участь в окисненні сульфїт-їонів, що утворюються в цитоплазмі DSR системою (Frigaard & Dahl, 2008).

Асиміляційна сульфатредукція в Allochromatium vinosum. Деякі фототрофні бактерії, що ростуть у середовищах з відновленими сполуками Сульфуру, не здатні асимілювати сульфат-їони. З іншого боку, дуже багато пурпурових сіркових та несіркових бактерій можуть засвоювати і відновлювати сульфат-їони у середовищах, які не містять відновлених сполук Сульфуру.

Асиміляційне відновлення йонів сульфату в *A. vinosum* представлено на рис. 1.5. Сульфат-їони поглинаються мембранозв'язувальними компонентами периплазматичної субстратов'язувальної транспортної системи CysTWA типу ABC у поєднанні з білком CysP, що входять до складу клітин *A. vinosum*. Цей процес відбувається аналогічно як у бактерій *Escherichia coli* (Dahl, 2017).

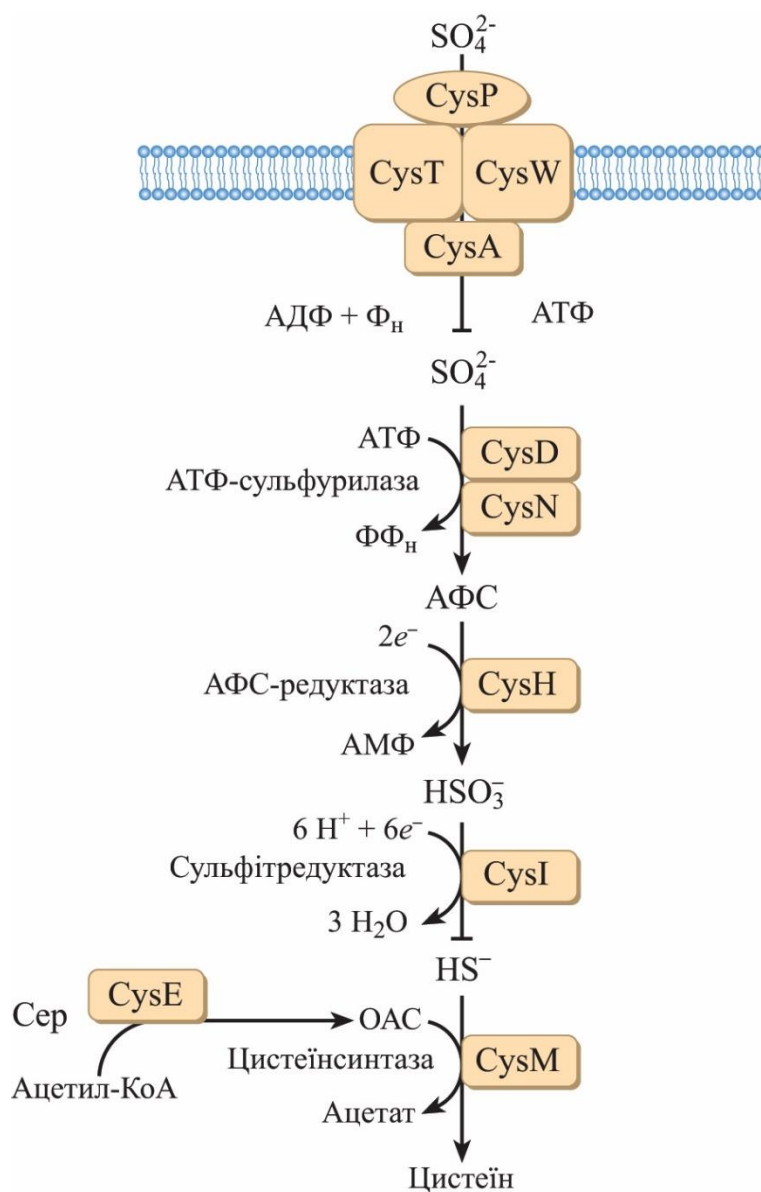


Рис. 1.5 – Схема асиміляційного відновлення сульфат-іонів в *Allochromatium vinosum*. CysE – серин *O*-ацетилтрансфераза; ОАС – *O*-ацетил-L-серин; CysTWA – субстратозв'язувальна транспортна система (модифіковано за Weissgerber et al., 2014)

У клітині сульфат-іони активуються внаслідок перетворення в аденозин-5'-фосфосульфат (АФС) за участю АТФ-сульфурилази типу CysDN, так як в *E. coli*, або АТФ-сульфурилази Sat-типу. Під час відновлення йонів сульфату в *A. vinosum* фосфоаденозин-5'-фосфосульфат не утворюється (Neumann et al., 2000). Натомість Fe-S зв'язувальна АФС-редуктаза типу CysH каталізує розщеплення АФС до йонів сульфїту і аденозинмонофосфату (АМФ). Сульфїт-іони за участю асиміляційної

сульфітрeredуктази перетворюються на сульфід-іони. У *A. vinosum* асиміляційною сульфідредуктазою є CysI, фередоксин-залежний сирогем-[4Fe-4S]-вмісний протеїн, який також трапляється у ціанобактерій, водоростей і вищих рослин (Dhillon et al., 2005). Цей фермент є в аноксигенних фототрофних бактерій (Frigaard & Dahl, 2008). Утворенню цистеїну передують формування *O*-ацетил-L-серину, який потім трансформується в цистеїн за участю цистеїнсинтази В (CysM) в реакції, яка залежить від наявності йонів сульфідру (Dahl, 2017).

Отже, метаболізм сполук Сульфуру ПСБ відрізняється як серед представників родин *Chromatiaceae* і *Ectothiorhodospiraceae*, так і серед представників ПНСБ, та є дослідженим лише в окремих видів (*A. vinosum*, *T. sibirica*, *R. sulfidophilum*, *P. pantotrophus*, *R. vannieli*, *R. globiformis*, *R. rubrum*, *R. palustris*, *R. spheroides*).

1.3 Метаболізм сполук Нітрогену

Нітроген є у складі нуклеїнових кислот, білків та інших сполук і має важливе значення для живих клітин. Саме тому зменшення вмісту Нітрогену може обмежувати продуктивність екосистем, а нітрогеновмісні добрива використовують для підвищення продукції біомаси в сільському господарстві (Zhang et al., 2020).

Коли Нітроген із високою реакційною здатністю потрапляє в екосистему, здебільшого у вигляді йонів амонію, більша його частина трансформується у процесі нітрифікації в нітрат- і нітрит-іони та може бути використана як акцептор електронів для мікробного анаеробного дихання. Нітрат- і нітрит-іони можуть бути відновлені у процесі дисиміляційної нітратредукції (або денітрифікації) до йонів амонію або N_2 (Kraft, 2014).

Відновлення нітрит-іонів до N_2 може відбуватись і третім шляхом. Замість того, щоб відновити оксид нітрогену до закису нітрогену, як у процесі класичної денітрифікації, бактерії *Methylomirabilis oxyfera* дисмутують нітроген(II) оксид до N_2 та кисню. Утворений кисень бактерії використовують для окиснення метану (Cui et al., 2015). Під час анамокс-реакції молекула азоту утворюється з йонів

нітриту й амонію (Wu et al., 2020). Іншими процесами кругообігу Нітрогену є азотофіксація й амоніфікація. У результаті азотофіксації молекулярний азот відновлюється до амонію за участю мікроорганізмів і стає доступним для більшості живих організмів (рис. 1.6).

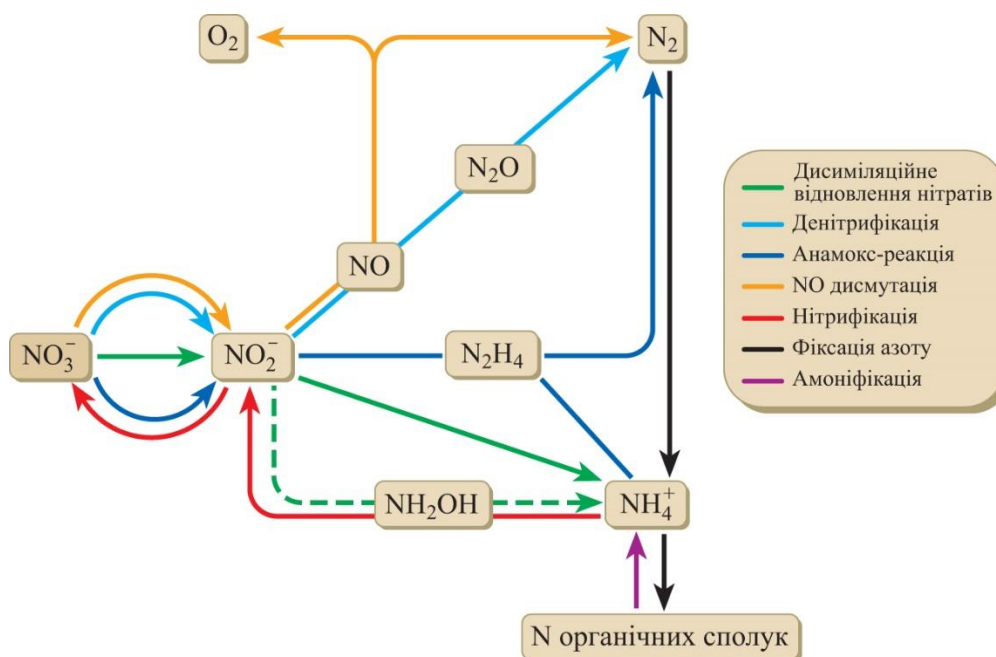


Рис. 1.6 – Біологічна трансформація Нітрогену (модифіковано за Kraft, 2014)

Амоніфікація – це процес розкладання нітрогеновмісних органічних речовин гетеротрофними мікроорганізмами з утворенням аміаку.

Фототрофні пурпурові бактерії (ФПБ) здійснюють денітрифікацію й асиміляцію нітратів (асиміляційна нітратредукція), які є важливими етапами кругообігу Нітрогену.

Денітрифікація у ФПБ. Денітрифікація – це процес відновлення нітратів до азоту. Для утворення N_2 з нітрат-іонів ФПБ необхідні чотири ферменти, які каталізують утворення трьох проміжних продуктів: нітрит-іонів (NO_2^-), нітроген(II) оксиду (NO) та нітроген(I) оксиду (закису нітрогену) (N_2O) (рис. 1.7, А).

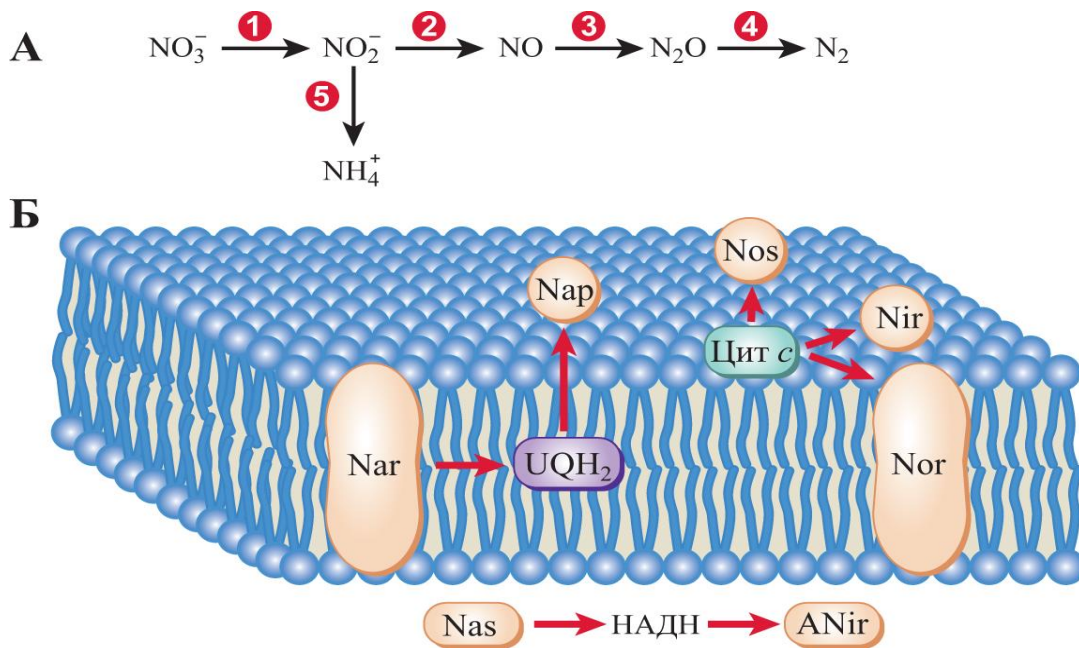


Рис. 1.7 – Схема реакцій денітрифікації й асиміляційної нітратредукції (А) і топологічне розташування ферментів цих процесів (Б): UQH_2 – убіхінол; Цит *c* – периплазматичний цитохром *c*; реакція 1 каталізується Nar – мембранозв’язаною нітратредуктазою, Nap – периплазматичною нітратредуктазою або Nas – асиміляційною нітратредуктазою; реакція 2 каталізується Cu-Nir – Cu-вмісною нітритредуктазою або *cd₁*-Nir – гемовмісною нітритредуктазою; реакція 3 каталізується qNor – хінол окиснювальною NO-редуктазою або cNor – цитохром-*c* окиснювальною NO-редуктазою; реакція 4 каталізується Nos – редуктазою закису азоту; реакція 5 каталізується ANir – асиміляційною нітритредуктазою (модифіковано за Hunter et al., 2009)

У багатьох мікроорганізмів процес денітрифікації може затримуватися на стадії утворення йонів нітриту до повного вичерпання запасу нітрат-іонів. Нітрит-іони накопичуються в середовищі або з часом відновлюються до йонів амонію (див. рис. 1.7, А). Це характерно для *E. coli*, але не для ФПБ (Richardson et al., 2001).

Нітратредуктаза каталізує початкову реакцію денітрифікації, відновлення йонів нітрату до нітриту (див. рис. 1.7, А). Це єдиний фермент денітрифікації, який також мають мікроорганізми, що не здійснюють цього процесу. У бактерій виявлено два типи дисиміляційних нітратредуктаз: Nar і Nap (див. рис. 1.7, Б).

Нітратредуктаза Nar зв'язана з цитоплазматичною мембраною з боку цитоплазми і функціонує за наявності у середовищі достатнього вмісту нітрат-іонів. Нітратредуктаза Nar є периплазматичним ферментом. Nar і Nar містять Мо-вмісні кофактори. Nar і Nar використовують хіноли як донори електронів. Далі електрони переносяться від хінолів через [Fe-S] кластери та цитохроми до Мо-вмісного кофактора, де, власне, і відбувається відновлення йонів нітрату до нітриту (Richardson et al., 2001).

Нітритредуктаза (Nir) каталізує відновлення нітрит-іонів до нітроген(II) оксиду (див. рис. 1.7, А). У денітрифікаторів є дві нітритредуктази, що містяться в периплазмі: Cu-вмісний фермент і гемовмісний фермент (Watmough et al., 1999; Hunter et al., 2009). Обидві отримують електрони з цитохромів *c* або Cu-вмісних білків, які приймають електрони з комплексу цитохромів *bc₁* і локалізовані в периплазмі.

Редуктаза оксиду нітрогену (Nor) міститься винятково в цитоплазматичній мембрані (див. рис. 1.7, Б) та приймає електрони або з хінолу, або з цитохрому *c* (див. рис. 1.7, А, Б) і є двох типів: cNor та qNor (Zumft & Kroneck, 2006). У фотосинтезувальних денітрифікаторів є cNor редуктаза, що приймає електрони від цитохрому *c*.

Кінцевим етапом денітрифікації є відновлення N_2O до N_2 (див. рис. 1.7, А). Редуктаза закису нітрогену (Nos) є Cu-вмісним ензимом (Zumft & Kroneck, 2006). У ФПБ Nos міститься у периплазматичному просторі.

Процес денітрифікації можуть здійснювати грампозитивні та грамнегативні бактерії, археї, гриби. Відомо, що цей процес здійснюють форамініфери (Risgaard-Petersen et al., 2006). Філогенетичною групою з найбільшою кількістю денітрифікаторів є *Proteobacteria*, особливо *Alphaproteobacteria* (Bellini et al., 2013). Більшість представників ФПБ здійснюють дисиміліційне відновлення нітрат-іонів повністю до N_2 . Проте деякі з них не мають усіх ферментів денітрифікації, тобто є частковими денітрифікаторами.

ПБ найчастіше мають периплазматичну нітратредуктазу (Nar), Cu-вмісну нітритредуктазу (Cu-Nir), цитохром *c* окиснювальну NO-редуктазу (cNor) та

оксидоредуктазу (Nos); деякі містять зв'язану з мембраною нітратредуктазу (Nar) та гемовмісну Nir (*cd₁-Nir*), але не досліджено жодного представника, який не містить хінол окиснювальну NO-редуктазу (qNor) (Michalski & Nicholas, 1988).

Оскільки ПФСБ є облігатними анаеробами, про здійснення дисиміляційної нітратредукції (денітрифікації) цими бактеріями у літературі не повідомлялось.

Денітрифікація добре досліджена у ПНСБ *R. sphaeroides*. *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* був першим ізольованим фотосинтезувальним денітрифікатором, проте пізніше також було досліджено здатність до денітрифікації й інших штамів *R. sphaeroides* (Michalski & Nicholas, 1988).

Асиміляція нітрат-іонів (асиміляційна нітратредукція). Деякі фотосинтезувальні бактерії відновлюють йони нітрату до амонію у процесі асиміляції. Це 8-електронне відновлення, під час якого нітрат-іони відновлюються до нітрит-іонів, а нітрит-іони відновлюються безпосередньо до йонів амонію, останні далі включаються у біосинтез амінокислот. Оскільки для відновлення нітратного Нітрогену до амонійного витрачається 8 електронів, які мікроорганізми могли би використати для синтезу АТФ у дихальному ланцюзі, процес є енергозатратним (Richardson et al., 2001).

Асиміляційна нітратредуктаза (Nas) – фермент, який каталізує відновлення йонів нітратів до нітритів, має структурно-функціональну подібність з Nar і Nar та локалізований у цитоплазмі клітин фототрофних пурпурових бактерій (див. рис. 1.7, Б). Є дві форми нітритредуктаз, що беруть участь у відновленні йонів нітриту до амонію. Одна форма приймає електрони від ферредоксину, тоді як інша приймає електрони від НАДФН (Richardson et al., 2001).

Здатність використовувати нітрат-іони як джерело Нітрогену не поширена серед ФПБ (Pino et al., 2006). Два штами *R. palustris* HaA2 та BisA53 асимілюють нітрат-іони. Жоден із цих штамів не має Nar або Nar, проте *R. palustris* штам BisA53 має всі інші ферменти денітрифікації. Серед представників класу *Alphaproteobacteria* нітритредуктази є НАДФН-редуктазами. *Roseobacter denitrificans* асимілює нітрат-іони, проте жоден зі штамів *R. sphaeroides* асиміляційної нітратредуктази Nas не має (Olmo-Mira et al., 2006).

Асиміляційна нітратредукція найкраще вивчена у *R. capsulatus* E1F1 (Pino et al., 2006). Ці бактерії також використовують гідроксиламін як джерело Нітрогену (Cabello et al., 2004; Pino et al., 2006).

Асиміляція азоту, утвореного під час денітрифікації. Більшість ФПБ не використовують нітрат-іони як джерело Нітрогену, проте використовують азот, що утворюється під час денітрифікації. Це було встановлено за використання ^{15}N -міченого Нітрогену бактеріями *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* під час росту в середовищі з нітрат-іонами (Dunstan et al., 1982). У *R. sphaeroides* асиміляція азоту, утвореного під час денітрифікації, відбувається лише за фототрофних умов росту (Dunstan et al., 1982). Аноксигенний фотосинтез забезпечує достатню кількість АТФ для росту цих бактерій і фіксації ними азоту. Екологічне значення такого використання N_2 незрозуміле.

Фіксація азоту. Мікробна фіксація N_2 – єдиний процес фіксації молекулярного азоту повітря, що поповнює пул Нітрогену, втраченого в результаті денітрифікації, анамоксу та дисмутації NO. Другий відомий природний процес фіксації N_2 – за допомогою електричних розрядів – становить приблизно 2 % від фіксації азоту (Sun et al., 2021).

Перетворення азоту до йонів амонію є ендергонічною реакцією, оскільки для розриву дуже міцного потрійного зв'язку між атомами Нітрогену в молекулі азоту необхідна висока енергія активації. Ця реакція у мікроорганізмів каталізується чутливим до кисню гетеродимерним нітрогеназним комплексом. Бактерії здійснюють азотофіксацію за звичайних умов, але витрачають на це велику кількість енергії.

Згідно з рівнянням: $\text{N}_2 + 8e^- + 8\text{H}^+ + 16\text{АТФ} = 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{АДФ} + 16\text{Ф}_\text{H}$, для відновлення однієї молекули азоту бактеріям необхідно 16 молекул АТФ і 8 відновних еквівалентів. За рахунок енергії, що виділяється під час гідролізу АТФ, істотно знижується окисно-відновний потенціал нітрогеназного комплексу (з -290 до -400 мВ), тобто нітрогеназа набуває властивостей “супервідновника”. Відновні еквіваленти використовуються для поетапного відновлення азоту до аміаку. Оскільки паралельно з утворенням амонійного Нітрогену відбувається виділення

молекулярного водню, процес потребує 8 електронів (Rees, 2005). Здатність до фіксації азоту характерна для різних груп мікроорганізмів, у т. ч. ціанобактерій, протеобактерій а також архей, оскільки вони мають нітрогеназний комплекс (Rees, 2005; Tang et al., 2020; Sun et al., 2021). Фіксація азоту може бути пов'язана з різноманітними метаболічними шляхами мікроорганізмів, зокрема, оксигенним і аноксигенним фотосинтезом, бродінням, відновленням іонів сульфату, метаногенезом (Rees, 2005; Tang et al., 2021; Sun et al., 2021).

Фототрофні бактерії використовують сполуки Нітрогену у процесах асиміляції та дисиміляції. Зазвичай амоній є найкращим джерелом Нітрогену для цих мікроорганізмів, проте деякі фототрофні штами використовують нітрати, якщо амонію немає у середовищі. Ці мікроорганізми безпосередньо впливають на цикл Нітрогену через відновні процеси, такі як фіксація Нітрогену, асиміляція і дихання (Olmo-Mira et al., 2006; Pino et al., 2006).

Окиснення нітрит-іонів. Аеробне окиснення нітритів (аеробну нітрифікацію) здійснюють бактерії родів *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira*. Під час цього процесу електрони з нітрит-іона переносяться на кисень, а CO₂ є джерелом Карбону ($\text{NO}_2^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 = \text{NO}_3^-$). Анаеробне окиснення нітрит-іонів відбувається лише за участю фототрофів (Griffin et al., 2007; Moroz et al., 2021). У процесі фототрофного окиснення нітриту нітрит-іон є донором електронів аноксигенного фотосинтезу, а електрони використовуються для автотрофної фіксації CO₂. Описано окиснення нітритів у процесі аноксигенного фотосинтезу штамми пурпурових сіркових бактерій роду *Thiocapsa* (Schott et al., 2010; Nemp et al., 2016). Детально проаналізовано використання цими бактеріями нітрит-іонів як донорів електронів з огляду на їхню потенційну роль в окисненні нітритів у природі (Schott et al., 2010; Nemp et al., 2016).

Таким чином, біогеохімічний кругообіг Нітрогену майже повністю залежить від перебігу різноманітних окисно-відновних реакцій, які, головню, здійснюють мікроорганізми, серед яких і фотосинтезувальні пурпурові бактерії.

1.4 Поширення пурпурових бактерій

Детальний опис основних екологічних ніш пурпурових бактерій можна знайти в оглядах (Madigan & Jung, 2009; Imhoff, 2001, 2014, 2017; Imhoff et al., 2019; Hubas et al., 2017; Hiraishi et al., 2020; Sirevag, 2021).

ПСБ часто розвиваються в сульфідних водних екосистемах за впливу світла, спричиняючи їхнє “цвітіння”. Якщо у водоймі є у великій концентрації сульфат-іони, то це приводить до розвитку сульфатвідновлювальних бактерій, які утворюють сульфід-іони. Гідроген сульфід піднімається вгору з осаду у воду, утворюючи градієнт його концентрації. ПСБ розвиваються в освітлених середовищах з оптимальними концентраціями сульфід-іонів або інших донорів електронів (Kimble-Long & Madigan, 2002; Imhoff, 2014; Hubas et al., 2017). Якщо концентрація клітин досить висока, вода забарвлюється у червоний, фіолетовий або червоно-коричневий колір (Overmann et al., 1996; Imhoff, 2014).

В одних озерах “цвітіння” спричиняють різні види ПСБ і ПНСБ (Caldwell & Tiedje, 1975; Imhoff, 2014, 2017; Hiraishi et al., 2020), а в інших – пурпурові бактерії одного виду (Overmann et al., 1996; Overmann, 2013). Приклади розшарування фототрофних пурпурових бактерій у стратифікованих озерах можна знайти в роботах Caldwell та Tiedje (Caldwell & Tiedje, 1975). Ці дослідники аналізували зразки води, відібрані з двох евтрофних озер – Вінтергрін (Wintergreen) та Берк (Burke), розташованих на південному заході штату Мічиган (США). У воді обох озер ідентифіковано бактерії родів *Thiopedia*, *Thiospirillum*, *Thiocystis*, *Chromatium*. У озері Берк домінували бактерії роду *Thiospirillum*, а в озері Вінтергрін – бактерії роду *Thiopedia*.

ПСБ також трапляються у мікробних матах, зокрема, в тих, що утворюються в морських або гіперсолоних середовищах і у стоках термальних джерел (Hubas et al., 2017; Imhoff, 2014, 2017; Sirevag, 2021). ПСБ родів *Thiocapsa* й *Allochromatium* часто утворюють густий пігментований шар між ціанобактеріями та нижніми шарами мату. Тут пурпурові бактерії окиснюють сульфід-іони, які дифундують

знизу вгору, досягаючи шару, де розвиваються ціанобактерії (Imhoff, 2014; Hubas et al., 2017).

У забруднених прісноводних середовищах (канави для стічних вод) ПНСБ можуть домінувати над ПСБ та зеленими сірковими бактеріями (ЗСБ) за поєднання умов високої інтенсивності освітлення, дефіциту гідроген сульфідіду та високого вмісту органічних сполук.

ПНСБ нагромаджуються в місцях, де концентрація сульфід-іонів є низькою. Вони розвиваються лише в незначних кількостях під час “цвітіння” ПСБ, ймовірно, через їхню чутливість до сульфід-іонів. Однак морські види ПНСБ, що належать до роду *Rhodovulum*, можуть використовувати відносно високі концентрації сульфід-іонів як донори електронів для фотолітотрофного росту. Здатність ПНСБ до фотогетеротрофії робить їх більш конкурентоздатними, ніж хемогетеротрофи та ПСБ (Hiraishi et al., 2020).

Здатність ПНСБ рости за мікроаерофільних і аеробних умов дає цим мікроорганізмам змогу легко адаптуватися до змін середовища існування (Adessi et al., 2021). ПНСБ розвиваються також у стічних водах (Hiraishi et al., 2020). Різні ПНСБ виявлено у каналізації заводу в Геттінгені (Göttingen), Німеччина, зокрема, *R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. palustris*, *Rhodopseudomonas (Blastochloris) viridis*, *Rhodocyclus (Rubrivivax) gelatinosus*, *Rhodocyclus tenuis*, *Rhodopseudomonas photometricum*. У сміттєвих лагунах є оптимальні умови для росту ПНСБ (Madigan & Jung, 2009; Cooper, Rands, & Woo, 1975). У лагунах відходів овочевого консервного комбінату у штаті Мінесота (США) описано “цвітіння” внаслідок розвитку ПНСБ *R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. palustris*, які домінували та використовували леткі жирні кислоти, що привело до зменшення запаху (Madigan & Jung, 2009; Cooper et al., 1975). Морфологічно та генетично унікальні ПНСБ *Rhodocyclus purpureus* ізольовані Н. Пфеннінгом (N. Pfennig) більше 40 років тому зі сміттєвої лагуни у штаті Айова, США (Pfennig, 1980). Ці бактерії не мають нітрогеназного комплексу (Madigan & Jung, 2009).

Пурпурові бактерії виділили з екстремальних середовищ, зокрема, гарячих, холодних, кислих, лужних і гіперсолоних (Madigan & Jung, 2009; Hubas et al., 2017;

Sirevag, 2021; George et al., 2020; Dahl, 2020). Перші екстремофільні ПБ виявлено в 1960-х роках, і вони виявились або галофілами, або ацидофілами. Наприкінці 70-х років ХХ ст. було знайдено кілька нових видів галофільних і галоалкалофільних пурпурових бактерій. У 80-х роках уперше виділено термофільні пурпурові бактерії *Thermochromatium tepidum* (оптимальна температура ~ 50 °С, максимальна температура 57 °С). Світлозбиральний комплекс *T. tepidum* поглинає світло за довжини хвилі 920 нм (Nozawa et al., 1986). З тих пір виділили велику кількість алкалофільних і галофільних пурпурових бактерій. Психрофільні фототрофи описано лише зовсім недавно. Відомі галофільні або галоалкалофільні ПСБ, які належать до родів *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Halochromatium*, *Marichromatium*, *Thiohalocapsa*, а також ПНСБ родів *Rhodovibrio*, *Rhodothalassium*, *Rhodobium*, *Rhodovulum* і *Roseospira* (Imhoff, 2001, 2014).

Серед аноксигенних фототрофних бактерій описано також ацидофіли та алкалофіли: *Ectothiorhodospira haloalkaliphile* та ПНСБ роду *Rhodobacabogoriensis*, ростуть у діапазоні рН від 8,5 до 10,5 (George et al., 2020). *Rhodoblastus acidophilus* (раніше *Rhodopseudomonas acidophila*) здатні рости у слабокислих середовищах, таких як калюжі, болота й кислі озера (рН 4,5–5,8) (Pfennig, 1969; George et al., 2020). За своїми властивостями ці бактерії подібні до *Rhodoblastus sphagnicola* (Kulichevskaya et al., 2006). *Rhodopseudomonas globiformis* виділили з кислих теплих сульфідних джерел (рН 3,5–5,1) (Pfennig, 1974). Мікроорганізми, подібні до *R. globiformis*, також виділено з джерел, які впадають в озеро Німфа (Nymph), тепле, кисле і насичене сульфідами, рН води якого 3,0 (Madigan & Jung, 2009; Imhoff, 2017). Не описано жодних ацидофільних ПСБ, і це, ймовірно, обумовлено тим, що за кислого рН сульфідні перебувають у найбільш токсичній формі сірководню.

ПБ розвиваються також у постійно холодних середовищах (Madigan & Jung, 2009; George et al., 2020). Дослідниками було виділено ПНСБ зі зразків мікробних матів озер Антарктики, а також із води під льодом (Karr et al., 2003). ПНСБ *Rhodoferax antarcticus* поширені як у мікробних матах, так і у воді озера Фрікселл (Fryxell) (Антарктика) (Sattley & Madigan, 2006). Озеро Фрікселл слабо стратифіковане та не змішане, оскільки солоні води дна перекриті прісною водою.

Мікромольярні кількості сульфід-іонів наявні на глибині від 9 до майже 1,5 мм в осаді. *R. antarcticus* – це вперше описані аноксигенні фототрофи, що здатні рости за температури 0 °C (Madigan et al., 2000; George, Vincent, & Mackey, 2020).

Отже, пурпурові фотосинтезувальні бактерії живуть у різних середовищах, демонструючи мінливість свого метаболізму, і чинять вплив на процеси колообігу хімічних елементів у різних біогеоценозах.

Здатність використовувати органічні речовини як донори електронів і джерело Карбону може слугувати теоретичною основою для практичного розроблення систем очищення стічних вод біологічним методом за участю ПНСБ.

Підсумовуючи дані літератури, можна зробити висновок, що процеси метаболізму сполук Сульфуру у ПСБ досліджено ґрунтовніше, ніж у ПНСБ. ФПБ здійснюють денітрифікацію й асиміляцію нітрат-іонів. Більшість ФПБ не використовують нітрат-іони як джерело Нітрогену, проте використовують азот, що утворюється під час денітрифікації. Однак анаеробне окиснення нітрит-іонів за участю фототрофних несіркових бактерій повністю не досліджено. *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 виділено з води озера Яворівське (Львівська область, Україна), яка збагачена різними сполуками Сульфуру. Врахування важливості ролі ПНСБ у функціонуванні біогеоценозів, їхньої метаболічної різноманітності (гнучкості), можливості використовувати останні у біотехнологічних процесах очищення водних біотопів робить їх важливими об'єктами дослідження.

Залишається нез'ясованою низка питань, дослідженню яких присвячена наша робота:

- не досліджено фізіолого-біохімічні властивості пурпурових несіркових бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620, виділених із озера Яворівське;
- не досліджено якісний склад пігментів *R. yavorovii* ІМВ В-7620;
- мало даних про використання сполук Сульфуру ПНСБ, зокрема, бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620;
- мало даних про використання сполук Нітрогену ПНСБ;

- не досліджено продукування водню *R. yavorovii* ІМВ В-7620;
- не з'ясовано можливість застосування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 для очищення стічних вод і для генерування електричного струму у МПЕ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Відбір проб води для мікробіологічного аналізу та визначення хімічного складу води

Відбір проб води з різних глибин озера Яворівське (0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 м) проводили з використанням батометра (Антипчук & Кіреєва, 2005). Для здійснення фонового (контрольного) мікробіологічного моніторингу використали екосистему водойми джерельного типу заповідника Розточчя, яка не зазнала прямого антропогенного впливу. Контрольну пробу води відбирали з глибини 2 м придонного шару.

У пробах води визначали вміст іонів кальцію, магнію, амонію, натрію, калію хлориду, гідрокарбонату, сульфіді, нітрату, сульфату, фосфор (V) оксиду та загальну мінералізацію.

Титрометричний метод визначення вмісту Ca^{2+} та Mg^{2+} у воді. Концентрацію Ca^{2+} та Mg^{2+} визначали відповідно до ДСТУ ISO 6059:2003. Принцип методу базується на реакції утворення стійких комплексних сполук іонів кальцію та магнію з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (трилоном Б). Досліджувану пробу титрували трилоном Б до зміни вишнево-червоного забарвлення на синє за наявності у пробі аміачного буферного розчину й індикатора етіохрому чорного Т. За об'ємом трилону Б, витраченого на титрування, визначали сумарний вміст кальцію і магнію. Потім у іншій порції води, використовуючи інший індикатор – мурексид, відтитровували тільки солі кальцію відповідно до ДСТУ ISO 6058-2003. Розрахунок вмісту кальцію і магнію проводили за формулами 2.1 та 2.2:

$$C_{Ca^{2+}} = \frac{V_2 \cdot c \cdot 20,04 \cdot 1000}{V}, \quad (2.1)$$

$$C_{Mg^{2+}} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot 12,16 \cdot 1000}{V}, \quad (2.2)$$

де: $C_{Ca^{2+}}$ – концентрація йонів кальцію, мг/л;
 $C_{Mg^{2+}}$ – концентрація йонів магнію, мг/л;
 V_1 – об'єм трилону Б, витрачений на титрування сумарного вмісту йонів кальцію та магнію, мл;
 V_2 – об'єм трилону Б, витрачений на титрування тільки йонів кальцію, мл;
 c – нормальність розчину трилону Б;
20,04 – молярна маса еквівалента йонів кальцію;
12,16 – молярна маса еквівалента йонів магнію;
 V – об'єм проби, взятий для титрування, мл.

Для приготування трилону Б (0,05 н) 9,3 г трилону Б вносили у мірну колбу об'ємом 1 л із дистильованою водою та доводили до мітки. Для приготування аміачного буферного розчину у 50 мл 25 % NH_4OH додавали 10 г NH_4Cl і доводили дистильованою водою до мітки у мірній колбі об'ємом 500 мл. Для приготування етіохрому чорного Т змішували індикатор етіохром чорний Т з KCl у співвідношенні 1:200 і ретельно розтирали у ступці.

Аргентометричний метод визначення вмісту хлоридів у воді. Вміст хлоридів у пробах води визначали згідно з (Набиванець та ін., 2007). У конічну колбу піпеткою вносили 100 мл досліджуваної проби води. Додавали 1 мл розчину K_2CrO_4 і титрували розчином $AgNO_3$ до зміни лимонно-жовтого забарвлення на оранжево-жовте. Паралельно проводили холостий дослід із таким самим об'ємом дистильованої води.

Вміст хлорид-іонів розраховували за формулою 2.3:

$$C_{Cl^-} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot C \cdot 1000 \cdot 35,45}{V}, \quad (2.3)$$

де: C_{Cl^-} – вміст хлоридів, мг/л;
 V_1 – об'єм стандартного розчину $AgNO_3$, витраченого на титрування досліджуваної проби води, мл;
 V_0 – об'єм стандартного розчину $AgNO_3$, витраченого на титрування контрольного розчину, мл;

C – концентрація стандартного розчину AgNO_3 , моль-екв/л;

V – об'єм досліджуваної проби води, мл;

35,45 – молярна маса еквівалента хлорид-іонів.

Для приготування розчину аргентум нітрату (0,05 моль-екв/л) 8,494 г AgNO_3 розчиняли у дистильованій воді й доводили об'єм розчину до 1 л у мірній колбі. Розчин зберігали у склянці з темного скла. Концентрацію розчину встановлювали титруванням за стандартним розчином NaCl . Розчин калій хромату: 120 г K_2CrO_4 , розчиняли в невеликому об'ємі дистильованої води; для видалення хлорид-іонів додавали розчин AgNO_3 до появи червоно-бурого осаду. Через 2 год його фільтрували і доводили об'єм фільтрату дистильованою водою до 1 л у мірній колбі. Для приготування стандартного розчину натрій хлориду (0,05 моль-екв/л) NaCl прожарювали за температури 500...600 °С до повного видалення вологи. 2,922 г такого NaCl розчиняли в дистильованій воді й доводили об'єм розчину до 1 л у мірній колбі.

Для визначення концентрації розчину AgNO_3 у конічну колбу піпеткою вносили 15,0 мл стандартного розчину NaCl концентрацією 0,05 моль-екв/л і доливали дистильовану воду до об'єму 50 мл. Додавали 0,5 мл розчину K_2CrO_4 і титрували розчином AgNO_3 , як описано вище. Концентрацію розчину аргентум нітрату обчислювали за формулою 2.4:

$$C = \frac{15,0 \cdot 0,05}{V - V_0}, \quad (2.4)$$

де: C – концентрація розчину аргентум нітрату, моль-екв/л;

V – об'єм стандартного розчину AgNO_3 , витрачений на титрування досліджуваної проби води, мл;

V_0 – об'єм стандартного розчину AgNO_3 , витрачений на титрування контрольного розчину (дистильованої води), мл;

15,0 – об'єм взятого стандартного розчину NaCl , мл;

0,05 – концентрація стандартного розчину NaCl , моль-екв/л.

Титрометричний метод визначення вмісту гідрокарбонатів у воді. Вміст гідрокарбонатів визначали згідно з (Шевченко, 2008). Принцип методу базується

на титруванні проби хлоридною кислотою за наявності метилоранжу. Вміст гідрокарбонатів розраховували за формулою 2.5:

$$X = \frac{a \cdot 0,0061 \cdot 1000}{V}, \quad (2.5)$$

де: X – вміст гідрокарбонатів, г/л;

a – об'єм 0,1 н розчину хлоридної кислоти, витраченого на титрування, мл;

0,0061 – кількість грамів гідрокарбонат-іонів, яка відповідає 1 мл 0,1 н розчину хлоридної кислоти;

V – об'єм води, взятої для дослідження, мл;

1000 – коефіцієнт для перерахунку об'єму в л.

Фотометричне визначення вмісту амонію у воді. Концентрацію йонів амонію визначали згідно з (Набиванець та ін., 2007). Метод базується на здатності аміаку та йонів амонію утворювати забарвлену в жовто-коричневий колір сполуку з реактивом Несслера (калій тетраіодомеркурат (II)). До 50 мл досліджуваної проби додавали 0,5 мл розчину сегнетової солі та ретельно перемішували. Потім доливали 1 мл реактиву Несслера, перемішували та через 10 хв вимірювали оптичну густину розчину, пропорційну масовій концентрації аміаку і йонів амонію, на КФК-3 за довжини хвилі $\lambda=400-425$ нм. Перед проведенням дослідження готували серію стандартних розчинів, на основі яких будували калібрувальний графік (у мірні колби місткістю 50 мл вносили 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 мл робочого розчину амоній хлориду та доводили дистильованою водою до мітки; концентрація йонів амонію у цих колбах дорівнювала відповідно 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 N/л). Калібрувальний графік не є стабільним, тому його будували щоразу в день проведення аналізу.

Вміст іонів амонію визначали за формулою 2.6:

$$C_{NH_4^+} = \frac{C \cdot 50}{V}, \quad (2.6)$$

де: $C_{NH_4^+}$ – концентрація йонів амонію, мг N/л (1 мг NH_4^+ /л = 1,288 мг N/л);

C – концентрація йонів амонію, визначена за калібрувальною кривою, мг/л;

V – об'єм проби води, взятої для аналізу, мл;

50 – об'єм стандартного розчину, мл.

Визначення вмісту K^+ та Na^+ у воді. Вміст іонів калію та натрію у пробах води визначали за допомогою методу полуменево-емісійної спектрометрії ($\lambda_K=768$ нм, $\lambda_{Na}=589$ нм; спектрофотометр Flahho-4 Carl Zeiss, Jena). В основі емісійного методу полуменевої фотометрії лежить випромінювання світла збудженими у полум'ї атомами і молекулами елемента, який визначають. Місцеположення спектральної лінії чи смуги слугує для ідентифікації елемента, а інтенсивність випромінювання є мірою його концентрації (Зінчук та ін., 1997).

Визначення вмісту P_2O_5 у воді. Для приготування розчину А 2,5 г амоній ванадієвокислого розчиняли в 500 мл дистильованої води за 60...90 °С, охолоджували, додавали 20 мл HNO_3 і доводили об'єм дистильованою водою до 1 л. Для приготування розчину Б 50 г амонію молібденовокислого розчиняли в 500 мл дистильованої води за 50 °С, охолоджували і доводили об'єм дистильованою водою до 1 л. Розчин В – це HNO_3 , розведена водою у співвідношенні 1:2. До 50 мл води вносили по 8,3 мл розчинів А, Б і В та доводили об'єм дистильованою водою до 100 мл. Вміст P_2O_5 визначали фотоколориметрично на КФК-3 ($\lambda=440$ нм) (Peters et al., 1974) і розраховували за формулою 2.7:

$$C = \frac{E_{440} \cdot 1000 \cdot 50}{0,28}, \quad (2.7)$$

де: C – концентрація P_2O_5 , мг/л;

E_{440} – показник екстинкції за довжини хвилі 440 нм;

0,28 – коефіцієнт перерахунку, визначений за калібрувальною кривою;

50 – об'єм досліджуваної проби води, мл;

1000 – коефіцієнт для перерахунку об'єму в л.

Визначення концентрації сульфат-іонів у воді. Концентрацію сульфат-іонів у пробах води визначали після їхнього осадження барій хлоридом з утворенням барій сульфату. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин (Peters et al., 1974). Оптичну густину отриманої суміші визначали турбідиметрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=520$ нм, $l=10$ мм) і розраховували за формулою 2.8:

$$C = \frac{E_{520} \cdot n}{K}, \quad (2.8)$$

де: C – концентрація SO_4^{2-} , мМ;

E_{520} – показник екстинкції за довжини хвилі 520 нм;

n – розведення, разів;

K – коефіцієнт перерахунку, визначений за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартного розчину K_2SO_4 , $K=0,036$.

Визначення концентрації нітрат-іонів у воді. Концентрацію нітрат-іонів у пробах води визначали після діазотування нітрит-іонів (Granger et al., 1996). Як відновник використовували цинковий порошок. Для цього 2 мл води вносили у пробірки з 60 мг цинкового порошку (відновник). Вносили 2 мл 12 % розчину CH_3COOH , струшували пробірки упродовж однієї хвилини. Додавали 0,2 мл реактиву А (1 % розчин сульфанилової кислоти у 12 % розчині CH_3COOH) та витримували 30 хв у холодильнику за температури 4 °С. Додавали 0,2 мл реактиву Б (0,02 % розчин *n*-нафтилетилендіаміндихлориду у 12 % розчині CH_3COOH), струшували та визначали оптичну густину за довжини хвилі 540 нм на фотоелектроколориметрі КФК-3. Концентрацію нітрат-іонів розраховували за формулою 2.9:

$$C = \frac{E_{540} \cdot n}{K}, \quad (2.9)$$

де: C – концентрація NO_3^- , мМ;

E_{540} – показник екстинкції за довжини хвилі 540 нм;

n – розведення, разів;

K – коефіцієнт, визначений за калібрувальною кривою, $K=5,0$.

Визначення концентрації гідросульфід- і сульфід-іонів у воді. Концентрацію гідросульфід- і сульфід-іонів у пробах води визначали фотометрично за утворенням метиленової сині в результаті взаємодії гідроген сульфідіду з *n*-амінодиметиланіліндігідрохлоридом із використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=665$ нм, $l = 30$ мм). У колбу вносили 10 мл розчину цинк ацетату (5 г/л), 1,98 мл дистильованої води, 20 мкл води та 4 мл *n*-амінодиметиланіліндігідрохлориду (1,15) г/л в 4 н розчині сульфатної кислоти.

Через 5 хв додавали розчин ферум (III) хлориду (0,1 М) у 0,015 М розчині сульфатної кислоти. Через 5 хв вимірювали оптичну густину розчину за довжини хвилі 665 нм у кюветі з оптичним шляхом 30 мм (Sugiyama, 2002). Розрахунок концентрації гідросульфід- і сульфід-іонів (мМ) у досліджуваному розчині проводили за формулою 2.10:

$$C_{[\text{HS}^- + \text{S}^{2-}]} = \frac{E_{665}}{0,0895}, \quad (2.10)$$

де: $C_{[\text{HS}^- + \text{S}^{2-}]}$ – концентрація гідросульфід- і сульфід-іонів, мМ;

E_{665} – показник екстинкції за довжини хвилі 665 нм;

0,0895 – коефіцієнт перерахунку, визначений за калібрувальною кривою.

Визначення загальної мінералізації води. У попередньо прожарену, охолоджену в ексікаторі та зважену фарфорову чашку вносили точно відміряний і профільтрований об'єм води. Чашку встановлювали на водяну баню і випарювали насухо. Потім її переносили у сушильну шафу і висушували за температури 105 °С до сталої маси, охолоджуючи в ексікаторі. Вміст сухого залишку розраховували за формулою 2.11:

$$X = \frac{(m - m_0) \cdot 1000}{V}, \quad (2.11)$$

де: X – загальна мінералізація, мг/л;

m – маса фарфорової чашки із залишком, мг;

m_0 – маса порожньої фарфорової чашки, мг;

V – об'єм досліджуваної проби води, мл;

1000 – коефіцієнт для перерахунку об'єму в л.

2.2 Кількісне визначення фототрофних бактерій

Підрахунок вмісту колонієутворювальних одиниць (КУО) мікроорганізмів у 1 мл води в екосистемах проводили після спостереження їхнього росту в паралельно засіяних розведеними пробами води пробірках з рідкими поживними середовищами за таблицею Мак-Креді. Для цього готували серію десятикратних розведень води, а саме 10^{-2} – 10^{-9} . У пробірки об'ємом 20 мл вносили по 17 мл

стерильного середовища АТСС № 1449 (Гудзь та ін., 2011) без $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ та NaHCO_3 і по 1 мл відповідного розведення проб води. Кожне розведення паралельно висівали у три пробірки. Пробірки герметично закривали гумовими корками для обмеження доступу O_2 . Мікроорганізми культивували впродовж 14 діб за температури 28...30 °С та постійного освітлення інтенсивністю 200–300 лк. Культивування мікроорганізмів без внесення у середовище NaHCO_3 та $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ створює сприятливі умови для розвитку фототрофних несіркових бактерій. Для визначення чисельності фототрофних сіркових бактерій їх вирощували в середовищі ван Ніля (Гудзь та ін., 2014).

2.3 Виділення чистих культур пурпурових несіркових бактерій

Накопичувальну культуру ПНСБ вирощували у рідкому модифікованому живильному середовищі АТСС № 1449 з 0,816 г/л $\text{CH}_3\text{COONa}\times 3\text{H}_2\text{O}$ без NaHCO_3 та $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ впродовж 14 діб, освітлюючи променями видимої ділянки спектру (360–870 нм). Розвиток цих мікроорганізмів спостерігали за наявністю рожево-червоних і пурпурових пігментів (Гудзь та ін., 2011, 2014). Чисті культури ПНСБ отримували, висіваючи розведені суспензії накопичувальної культури на агаризоване середовище АТСС № 1449 без NaHCO_3 та $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$, після їхнього культивування на чашках за анаеробних умов. Чисті культури отримували за трикратного пересіву колоній мікроорганізмів, що вирости анаеробно на агаризованому модифікованому середовищі АТСС № 1449 з 0,816 г/л $\text{CH}_3\text{COONa}\times 3\text{H}_2\text{O}$ без NaHCO_3 та $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$. Бактерії вирощували на агаризованому середовищі за анаеробних умов у генбоксах за використання кисеньпоглинаючих генераторів (GENbox anaer, Франція).

Для перевірки чистоти виділених культур ПНСБ колонії, що забарвлювались у рожево-червоний колір, ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині та готували 10-кратні розведення. Потім 0,1 мл суспензії висівали на агаризоване модифіковане середовище АТСС № 1449 з 0,816 г/л $\text{CH}_3\text{COONa}\times 3\text{H}_2\text{O}$ без NaHCO_3 та Na_2S газonom на чашки Петрі й вирощували анаеробно. З метою отримання чистих культур колонії тричі реізолювали. Чистоту виділених культур перевіряли

за морфологічними характеристиками колоній, клітин і фарбуванням клітин за Грамом класичним методом (Сергійчук, 2001). Для спостережень використовували світловий мікроскоп (MICROmed XS-5520).

2.4 Визначення властивостей бактерій

Для визначення властивостей бактерій досліджували характер росту мікроорганізмів у рідкому модифікованому середовищі АТСС № 1449, фарбування за Грамом, рухливість, тип метаболізму, здатність утилізувати субстрати й ін.

Для дослідження здатності бактерій використовувати різні джерела Карбону їх вирощували у рідкому модифікованому середовищі АТСС № 1449 такого складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,6; NH_4Cl – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,320; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,336; $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,816; вітамін B_{12} – 0,00002; розчин мікроелементів – 1 мл. Розчин мікроелементів, г/л: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 (розчиняли у 43,2 мл дистильованої води і 6,8 мл 37 % HCl); $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,19; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; ZnCl_2 – 0,07; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,036; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,024; H_3BO_3 – 0,006; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,002. Як джерела Карбону в середовище вносили (в еквімолярній кількості до Карбону у складі натрій ацетату) натрій піруват, натрій лактат, натрій цитрат, натрій сукцинат, гліцерол, етанол, глюкозу, фруктозу, яблучну кислоту, пропіонову, фумарову, капронову, масляну кислоти, крохмаль, бензоат. Для доведення рН середовища до 7,0 використовували 10 н розчин NaOH . Середовище стерилізували за 1 атм упродовж 30 хв і засівали суспензією клітин (0,25 г/л). Бактерії вирощували за температури 28...30 °С упродовж 13 діб та інтенсивності освітлення 200 лк. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю-116.

Вплив натрій хлориду на ріст мікроорганізмів перевіряли, культивуючи їх у середовищі АТСС № 1449 з NaCl (1; 3 %) (Гудзь та ін., 2011).

Для дослідження здатності бактерій утворювати спори використовували метод фарбування за Пешковим (Gerhardt et al., 1994). Суспензію клітин, вирощених у середовищі АТСС № 1449, прогрівали на водяній бані за 80 °С упродовж 10 хв. Після цього 0,1 мл інокуляту висівали у рідке живильне

середовище ATCC № 1449 та культивували упродовж 13 діб (Gerhardt, Murray, Wood, & Krieg, 1994).

Здатність бактерій до аеробного чи анаеробного росту визначали, культивуючи їх на чашках Петрі з триптон-соевим агаром (ТСА) та у рідкому або на агаризованому модифікованому живильному середовищі ATCC № 1449. Анаеробні умови забезпечували кип'ятінням і швидким охолодженням середовища культивування, що спричинює зниження концентрації розчиненого кисню.

Для дослідження фізіологічних властивостей бактерій використовували системи RapID™ONE та ID32 GN. У системі RapID™ONE застосовують тести, в основі яких лежить бактерійне розщеплення відповідних субстратів. Результати тестів виявляють за допомогою різних наборів індикаторів.

Для проведення RapID™ONE тестів використовували суспензію клітин бактерій, вирощених у рідкому живильному середовищі, осаджених (2600 g, центрифуга MOO11551), відмитих і ресуспендованих у 0,9 % NaCl (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R8311006>).

Для проведення тестів з використання стріпу ID32 GN використовували суспензію клітин бактерій, вирощених на щільному живильному середовищі, ресуспендованих у 2 мл 0,9 % NaCl. Стріп ID 32 GN складався з 32 мікролунок, які містять дегідратовані субстрати. До лунок вносили суспензію мікроорганізмів на основі мінімального середовища. Після закінчення інкубації (24–48 год) проводили інтерпретацію результатів.

Планшети RapID™ ONE зі суспензією клітин інкубували за температури 35...37 °C в термостаті упродовж 4 год. Стріп ID 32 GN зі суспензією клітин інкубували за температури 35...37 °C в термостаті упродовж 48 год. Інтерпретацію результатів у планшетах RapID™ ONE та ID32 GN проводили згідно з табл. 1 і 2 (Додаток Б) та інструкцій (RapID ONE System) і (<https://bacdive.dsmz.de/api-test-finder>), відповідно.

Для дослідження впливу сульфід- і тіосульфат-іонів на ріст бактерій у модифіковане середовище ATCC № 1449 вносили різні концентрації (1,4; 2,8; 5,6 мМ) натрій сульфиду наонагідрату і натрій тіосульфату.

Для дослідження здатності використання сульфат-іонів мікроорганізмами замість $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у середовище культивування вносили 0,261 г/л магній хлориду. Щоб дослідити вплив сульфат-іонів як єдиного джерела Сульфуру на нагромадження біомаси досліджуваними мікроорганізмами, у модифіковане середовище АТСС № 1449 без $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ вносили різні концентрації (0,5; 1; 2; 2,5; 3; 4; 5 мМ) магній сульфату гептагідрату.

Для дослідження впливу нітрит-іонів на ріст бактерій і використання їх мікроорганізмами бактерії вирощували анаеробно в модифікованому середовищі АТСС № 1449 без $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ за освітлення й аеробно без освітлення. У середовище культивування вносили різні концентрації (0,7; 1,4; 2,8; 5,6 мМ) натрій нітриту.

Для дослідження впливу молібдену на використання нітрит-іонів бактеріями у середовище культивування вносили натрій молібдат за концентрації 300 нМ.

Щоб дослідити використання різних сполук Нітрогену досліджуваними мікроорганізмами замість амоній хлориду (1,9 мМ), у середовище культивування без $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ вносили натрій нітрат, сечовину в еквімолярній кількості.

Щоб перевірити здатність *R. yavorovii* ІМВ В-7620 до азотфіксації, бактерії культивували у модифікованому середовищі АТСС № 1449 без іонів амонію упродовж 19 діб. Контролем слугувало середовище з іонами амонію.

Для дослідження здатності бактерій до продукування водню мікроорганізми культивували у модифікованому середовищі АТСС № 1449 без внесення $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$. У середовище культивування вносили натрій ацетат (12; 36 мМ), малат (12; 36 мМ), сукцинат (36 мМ), глюкозу (36 мМ), крохмаль (36 мМ), натрій цитрат (60; 90 мМ). Для дослідження впливу йонів амонію на продукування водню досліджуваними бактеріями у середовище культивування не вносили йонів амонію.

Для дослідження росту бактерій у стічних водах їх вирощували анаеробно за інтенсивності освітлення 200 лк у колбах об'ємом 500 мл за температури 29...30 °С упродовж 21 доби. Як середовище культивування використовували воду фільтрату відстійника № 3 Львівського полігону твердих побутових відходів і стічну воду дріжджового заводу. Воду розводили в 10; 30; 50; 100 разів.

2.5 Ідентифікація пурпурових несіркових бактерій молекулярно-генетичними методами

16S рДНК ампліфікували зі сумарної ДНК штаму Ya-2016 за допомогою праймерів 117F (5'GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') і 1502R (5'GGCTACCTTGTTACGA3'). Амплікон очікуваного розміру (прибл. 1,5 т. п. н.) очищували за допомогою набору "QiaQuick" ("Qiagen", США) і далі секвенували методом Сенгера з використанням вищеописаних праймерів.

Виділення сумарної ДНК. Для секвенування 16S-кодувальних послідовностей ДНК виділяли з 1 мл культури. Лізис клітин проводили упродовж 5 хв за 65 °С розчином такого складу: 6 М гуанідин тіоціанат, 50 мМ натрій ацетат, 5 мМ етилендіамінтетрацетат (ЕДТА), 5 % тритон X-100. Після цього в кожен пробірку додавали 25 мкл 0,1 % силіки. Сорбент двічі відмивали розчином 70 % етанолу, висушували за 65 °С упродовж 10 хв. Надалі ДНК зі сорбенту ресуспендували в 50 мкл трис-ЕДТА буферу (рН 6,0) (Дзюблик & Горovenко, 2012).

Полімеразна ланцюгова реакція. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції готували реакційну суміш, до складу якої входили вода, буфер для ДНК-полімерази з MgCl₂, дезоксинуклеотидтрифосфати, праймери ДНК-полімераза. Суміш розділяли на кілька окремих проб, у кожен з яких додавали ДНК-матрицю. Склад реакційної суміші представлено в табл. 2.1:

Таблиця 2.1 – Склад реакційної суміші

Реагент	Кінцева концентрація/вміст
Стерильна деіонізована вода	-
10x PCR буфер	1x
2 мМ суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів	0,2 мМ
Праймер 1	0,1–1 мкл
Праймер 2	0,1–1 мкл
Полімераза	1,25 U/50 мкл
Матриця ДНК	10 пг–1 мкг

Реакції проводили на ампліфikatorах BioRad T100 й Thermo Pico24. Параметри реакції: початкову денатурацію ДНК проводили за 98 °С упродовж 30 с, потім 25 циклів із денатурацією за 98 °С упродовж 30 с, відпалом праймерів за 55 °С упродовж 15 с та полімеризації за температури 72 °С упродовж 2 хв. Наприкінці проби інкубували за 72 °С упродовж 5 хв, а потім охолоджували до 4 °С. Температуру, за якої відбувалося відпалювання праймерів до матриці, визначали з урахуванням довжини та нуклеотидного складу праймерів, тривалість полімеризації визначали залежно від довжини фрагменту, який потрібно було ампліфікувати.

Електрофорез ДНК в агарозному гелі. Реактиви: агароза; трис-ацетатний буфер, буфер для нанесення проб. Агарозу вносили в ТАЕ буфер (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЕДТА), нагрівали до повного розчинення та кип'ятили упродовж 3 хв. Коли розчин остигав до 50 °С, додавали бромистий етидій. Охолоджений розчин заливали у кювету з гребінцем для формування лунок. Між дном кювети і гребінцем залишали шар агарози товщиною 0,5–1 мм. Після полімеризації гелю гребінець виймали, а кювету з гелем поміщали в електрофоретичну камеру з трис-ацетатним буфером. У лунки вносили виділену ДНК, змішану з 6-кратним буфером для нанесення проб (0,25 % бромфеноловий синій, 40 % сахароза, бромистий етидій 0,5 мкг/мл) так, щоб об'єм буферу становив 1/6 об'єму кінцевої суміші. Електрофорез проводили за напруги 2–4 В/см упродовж 30–40 хв. Фракції ДНК реєстрували, освітлюючи гель ультрафіолетовими променями. Одержану електрофореграму фотографували. Як ДНК-стандарт у всіх випадках використовували ДНК-маркер фірми “Thermo Scientific” SM 0311.

Біоінформатичний аналіз. Пошук гомологів виконували з використанням баз даних нуклеотидних послідовностей програми BLAST, що міститься на сервері Національного інституту біотехнологічної інформації (США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Філогенетичне дерево реконструювали методом максимальної вірогідності за допомогою програмного пакету phylogeny.fr. (Dereeper et al., 2008).

2.6 Визначення пігментів *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Для отримання зразків пігментів клітини *R. yavorovii* ІМВ В-7620 культивували у модифікованому середовищі АТСС № 1449 упродовж 7 діб та відокремлювали від культуральної рідини центрифугуванням (2600 g, центрифуга МОО11551) упродовж 20 хв. Супернатант зливали, клітини ресуспендували в ацетоні та руйнували за 0 °С на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-2Т за 22 кГц упродовж 5 хв. Отриману суспензію переносили в мікропробірки типу Еппендорф об'ємом 2 мл і витримували її впродовж 24 год за температури -20 °С. Після цього екстракти клітин центрифугували упродовж 10 хв (1800 g, центрифуга МОО11551). Екстракти пігментів отримали після фільтрування відомих об'ємів супернатанту крізь мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. Усі маніпуляції виконували за кімнатної температури та без потрапляння прямого сонячного світла, щоб уникнути фотоокиснення пігментів.

Хроматографічне розділення пігментів здійснювали за допомогою системи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що складалася з двох pomp VarianProStar 210 (Agilent Technologies, Сінгапур), хроматографічної колонки Pursuits 5 C18 (Agilent Technologies, Нідерланди), 250×4,6 мм у модулі колонок Varian ProStar 500 (Agilent Technologies, Австралія), спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею VarianProStar 335 (Agilent Technologies, Австралія). Як рухоми фазу використовували два розчинники: розчинник А – суміш метанолу (Sigma-Aldrich, Франція) з 1 М розчином амоній ацетату (Fluka, Нідерланди) у воді, отриманій за допомогою системи очищення води Adrona Crystal E Bio з ультрафільтром Milipore (Adrona, Латвія), 70:30; розчинник Б – суміш метанолу з етилацетатом (Альфарус, Україна) і ацетонітрилом (Lab-Scan, Польща), 50:30:20. Хроматографічне розділення починали з 50 % розчинника Б. Розділення продовжували в лінійному градієнті від 50 до 100 % розчинника Б упродовж 40 хв, після чого систему витримували за 100 % розчинника Б упродовж наступних 18 хв. Час зрівноваження становив 5 хв. Перед наступним введенням зразка систему витримували з 50 % розчинника Б 10 хв. Потік розчинника був 0,5 мл/хв (Vogrego & Garcia-Gil, 1994). Зразок вводили в кількості 100 мкл. Хроматограми записували

за довжин хвиль 474 нм (для каротиноїдів) і 770 нм (для бактеріохлорофілів). Температура колонки становила 35 °С. Визначення пігментів здійснювали за їхніми спектрами поглинання, записаними за допомогою спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею згідно з даними літератури (Nelis & De Leenheer, 1989; Frigaard, Larsen & Cox, 1996; Borrego & Garcia-Gil, 1994).

2.7 Визначення метаболічних показників розвитку мікроорганізмів

Визначення кислотності й окисно-відновного потенціалу. Значення кислотності (рН) і окисно-відновного потенціалу (Eh) культуральної рідини аналізували потенціометричним методом з використанням рН-метра-мілівольметра рН-150 МА. Для вимірювання рН застосовували пористий скляний електрод ЭСК-10603/4, а редокс-потенціалу – вимірювальний платиновий електрод ЭПВ-1 і хлорсрібний електрод порівняння ЭВЛ-1МЗ.

Визначення біомаси клітин. Біомасу бактерій визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda=660$ нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм).

Для розрахунку використовували формулу розрахунку 2.12:

$$C = \frac{E_{660} \cdot n}{0,17}, \quad (2.12)$$

де: C – біомаса, г/л;

E_{660} – екстинкція за 660 нм;

n – розведення;

0,17 – коефіцієнт перерахунку, обчислений ваговим методом.

Визначення вмісту гідроген сульфїду. Бактерії культивували у модифікованому середовищі АТСС № 1449. Визначали концентрацію гідроген сульфїду спектрофотометрично, як описано у п. 2.1 (Sugiyama, 2002). Розрахунок вмісту HS^- та S_2^- здійснювали за формулою 2.10.

Визначення вмісту сульфат-іонів у культуральній рідині. Концентрацію сульфат-іонів у культуральній рідині бактерій визначали турбідиметрично методом, як описано у п. 2.1 (Peters et al., 1974), і розраховували за формулою 2.8.

Визначення вмісту нітрат-іонів у культуральній рідині. Концентрацію нітрат-іонів у культуральній рідині визначали спектрофотометрично методом (Granger et al., 1996), як описано у п. 2.1. Вміст нітрат-іонів у культуральній рідині розраховували за формулою 2.9.

Визначення вмісту нітрит-іонів у культуральній рідині. Вміст нітрит-іонів у культуральній рідині визначали спектрофотометричним методом після осадження клітин центрифугуванням (4000 g, 10 хв, центрифуга MOO11551) з використанням *n*-нафтилетилендіамін дигідрохлориду. Метод ґрунтується на діазотуванні сульфанілової кислоти нітритами і взаємодії утвореної солі з *n*-нафтилетилендіамін дигідрохлоридом (Granger et al., 1996). До 2 мл культуральної рідини вносили 1,2 мл 5% розчину $ZnSO_4 \times 7H_2O$ та 0,4 мл 0,5 н розчину NaOH. Отриману суміш струшували, додавали 0,2 мл реактиву А (1 % розчин сульфанілової кислоти у 12 % розчині CH_3COOH) та 0,2 мл реактиву Б (0,02% розчин *n*-нафтилетилендіамін дигідрохлориду у 12 % розчині CH_3COOH). Отриману суміш фотометрували на фотоелектроколориметрі КФК-3 через 15 хв ($\lambda=540$ нм, $l=10$ мм).

Вміст нітрит-іонів розраховували за формулою 2.13:

$$C = \frac{E_{540} \cdot n}{K}, \quad (2.13)$$

де: C – концентрація NO_2^- , мМ;

E_{540} – показник екстинкції за довжини хвилі 540 нм;

n – розведення, разів;

K – коефіцієнт, визначений за калібрувальною кривою, $K=15,03$.

Визначення хімічного споживання кисню у культуральній рідині. Визначення хімічного споживання кисню (ХСК) проводили перманганатним методом (Копілевич та ін., 2015). У мірні стакани місткістю 150 мл вносили по 20 мл досліджуваної проби. Сюди вносили 80 мл дистильованої води. До отриманого розчину додавали 5 мл розведеної сульфатної кислоти (1:3) і 10 мл 0,01 н розчину калій перманганату. Суміш доводили до кипіння. Після кип'ятіння у стакан вносили по 10–20 мл 0,01 н розчину щавлевої кислоти і спостерігали утворення прозорого розчину. Отриманий розчин титрували 0,001 н розчином калій

перманганату до зміни забарвлення із прозорого на фіолетовий. Паралельно проводили усі маніпуляції, де досліджуваним зразком була дистильована вода. Вміст XCK розраховували за формулою 2.14:

$$XCK = \frac{[(V_2 - V_1) \cdot 80]}{20}, \quad (2.14)$$

де: XCK – хімічне споживання кисню, мМ;

V_1 – об'єм розчину калій перманганату, витрачений на титрування дистильованої води до зміни забарвлення із прозорого на фіолетовий;

V_2 – об'єм розчину калій перманганату, витрачений на титрування досліджуваної проби до зміни забарвлення із прозорого на фіолетовий;

20 – об'єм проби, взятої для аналізу, мл;

80 – об'єм дистильованої води у кожній пробі, мл.

Визначення ефективності окиснення органічних сполук у культуральній рідині. Ефективність окиснення органічних сполук розраховували за формулою 2.15:

$$E = \frac{XCK_0 - XCK}{XCK_0} \cdot 100 \%, \quad (2.15)$$

де: E – ефективність окиснення органічних сполук, %;

XCK_0 – хімічне споживання кисню у пробі без внесення інокуляту;

XCK – хімічне споживання у культуральній рідині.

Визначення вмісту сірки у культуральній рідині. Досліджувані мікроорганізми культивували у модифікованому середовищі АТСС № 1449 з різними концентраціями сульфід- і тіосульфат-іонів упродовж 13 діб. Визначали біомасу клітин після культивування. Клітини зі сіркою осаджували на нітроцелюлозних фільтрах з діаметром пор 0,8 мкм, використовуючи вакуумний насос. Фільтри висушували у сушильній шафі та поміщали у хімічно чистий посуд на закрутку. Заливали 96 % етиловим спиртом так, щоб фільтр повністю занурився у спирт. Ставили у термостат на 24 год за 30 °С. Пізніше отриманий екстракт розводили у певну кількість разів. Вміст сірки визначали спектрофотометрично з використанням

УФ лампи за довжини хвилі 260 нм (Гудзь та ін., 2014). Контролем був 96 % етиловий спирт.

Вміст сірки у культуральній рідині розраховували за формулою 2.16:

$$C = \frac{E_{260} \cdot n \cdot K}{m}, \quad (2.16)$$

де: C – концентрація сірки, г/г сухої ваги клітин;

E_{260} – показник екстинкції за довжини хвилі 260 нм;

n – розведення, разів;

K – коефіцієнт, визначений за калібрувальною кривою ($K = 0,0243$);

m – вага сухих клітин.

Визначення складу газової фази та вмісту водню у ній

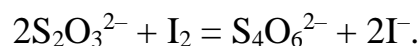
Для відбору проб газу і культуральної рідини використовували пластикові стерильні шприци (фірма “Bayer”) об’ємом 2,5; 11 і 50 мл. Проби відбирали, проколюючи голкою гумовий корок флакона. Об’єм і склад синтезованого бактеріями газу визначали на 3-тю, 7-му, 10-ту, 14-ту доби культивування. Об’єм синтезованого газу вимірювали за шкалою шприца (витіснення поршня шприца залишковим тиском газу). Склад газової фази визначали, використовуючи стандартну методику, на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД (Berezkin & Drugov, 1991). Застосовували дві сталеві колонки – перша (I) для визначення H_2 , O_2 , N_2 і CH_4 , друга (II) – для визначення CO_2 . Параметри колонок: I – $l=3$ м, $d=3$ мм, сорбент 13X (NaX); II – $l=2$ м, $d=3$ мм, сорбент Porapak-Q; температура колонок, випарника і детектора становила $+50$ °С, струм детектора – 50 мА. Газ-носій – аргон; швидкість потоку газу – 30 мл/хв.

Визначення вмісту органічних кислот у культуральній рідині. Дослідження використання натрій малату і натрій ацетату бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 проводили методом високоефективної рідинної хроматографії. Хроматографічна система складалася з двох pomp Varian ProStar 210 (Agilent Technologies, Сінгапур), хроматографічної колонки Polaris 5 C18-A (Agilent Technologies, Нідерланди), розміром $250 \times 4,6$ мм, у модулі колонок Varian ProStar 500 (Agilent Technologies,

Австралія), спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею Varian ProStar 335 (Agilent Technologies, Австралія).

Як рухомих фаз використовували два розчинники: 0,2 % розчин трифтороцтової кислоти (Fisher Scientific, HPLC grade, Великобританія) у воді (отриманій за допомогою системи очищення води Adrona Crystal E Bio з ультрафільтром Milipore (Adrona, Латвія), розчинник А) й ацетонітрил (Honeywell|Riedel-de Haen, Chromasolv for HPLC gradient grade (Німеччина), розчинник Б). Хроматографічне розділення починали з розчинника А упродовж 7 хв. Розділення продовжували в лінійному градієнті від 0 до 4 % розчинника Б упродовж наступних 3 хв і до 50 % розчинника Б упродовж наступних 20 хв. Час зрівноваження становив 5 хв, перед подальшим введенням зразка систему витримували з розчинником А 10 хв. Потік розчинника становив 1,5 мл/хв (Kerem et al., 2004), зразок вводили в кількості 20 мкл. Хроматограми записували за довжини хвилі 210 нм. Температура колонки становила 35 °С.

Визначення вмісту тіосульфат-іонів у культуральній рідині. Концентрацію тіосульфат-іонів визначали йодометричним методом, в основі якого є реакція:



Для встановлення точки еквівалентності використовували розчин крохмалю як індикатор (Peters et al., 1974). Для визначення концентрації $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ у конічну колбу вносили 10 мл культуральної рідини, 10–15 мл 2 н H_2SO_4 , 2 мл 0,05 % розчину крохмалю. Вміст колби титрували 20 % розчином КІ до постійного синього забарвлення. Концентрацію тіосульфат-іонів розраховували за формулою 2.17:

$$C = T \cdot V, \quad (2.17)$$

де: C – концентрація $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, г/л;

T – титр йоду по тіосульфату, рівний 0,002349 г/мл;

V – об'єм розчину йоду, витрачений на титрування досліджуваної проби, мл.

Визначення загального вмісту феруму (Peters et al., 1974). У мірну колбу 25 мл відбирали 20 мл досліджуваної води, пізніше вносили 1 мл HNO_3 , 4 мл KCNS , перемішували і вимірювали оптичну густину зі синім світлофільтром, КФК-3. Вміст загального феруму обчислювали за формулою 2.18:

$$C_{Fe} = \frac{C \cdot 25}{V}, \quad (2.18)$$

де C_{Fe} – концентрація загального Fe у досліджуваній пробі, мг/л
 C – концентрація Fe, визначена за калібрувальним графіком, мг/л;
 V – об'єм проби, взятої для визначення, мл;
 25 – об'єм мірної колби, мл.

2.8 Застосування *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 як анодних біокаталізаторів у мікробному паливному елементі й вимірювання сформованої сили струму

Бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 культивували в анодній камері мікробного паливного елемента (МПЕ) у рідкому модифікованому середовищі АТСС № 1449 за анаеробних умов і температури 28–30 °С упродовж 20 діб. Для досліджень генерування електричного струму в модифіковане середовище АТСС № 1449 вносили натрій цитрат у концентрації 42; 60 та 90 мМ. Також бактерії культивували у стічній воді дріжджового заводу (Одеська область), розведеної у 10 разів. Силу струму в однокамерному МПЕ визначали за допомогою амперметра М4200, а різницю потенціалів між електродами – з використанням мультиметра ДТ-830С.

Матеріалами катода й анода відповідно були нержавіюча сталь Х18Н10Т та графітні стержні, що відповідають вимогам до електродів мікробних паливних елементів: стійкі до корозії та забруднення, мають велику площу, високу провідність, є недорогими тощо. Площа поверхні анода становила 16 см². Як аноліт використовували суспензію *R. yavorovii* ІМВ В-7620 з вихідною біомасою 0,3 г/л. Католітом був 0,1 % розчин КМnО₄. Анодна та катодна камери, об'єм яких становив 0,3 л, були розділені мембраною (Millipore, Норвегія, розмір пор – 0,2 мкм), діаметром 1,5 см. Для створення напруженого опору до електродів приєднували резистор, опір якого становив 2,4 кОм.

Густина потужності однокамерного мікробного паливного елемента обчислювали за формулою 2.19:

$$W = \frac{U}{S}, \quad (2.19)$$

де U – напруга, мВт
 S – площа анода, см².

2.9 Електронно-мікроскопічні дослідження

Морфологію клітин досліджуваних бактерій визначали за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. Для цього клітини двічі відмивали фізіологічним розчином і осаджували центрифугуванням за (4000 г, 10 хв, центрифуга MOO11551). Клітини бактерій фіксували у 1,5 % розчині OsO₄ в 0,2 М какодилатному буфері (рН 7,2) упродовж 4 год за 0 °С. Зафіксовані клітини промивали тричі в цьому ж буфері. Отримані фіксовані зразки клітин зневоднювали у зростаючих концентраціях етилового спирту (25; 50; 70; 90; 96 %), кожен раз по 10 хв. Потім фіксовані зневоднені зразки клітин витримували в ацетоні двічі по 30 хв. Епоксидні смоли (Fluka) змішували у співвідношенні Ерон 812 – 4,5 мл, DDSA – 2,2 мл, MNA – 2,2 мл. Матеріал витримували в чотирьох сумішах епоксидних смол і ацетону у співвідношеннях 1:3, 1:2, 1:1 і 2:1. Останнє витримування проводили 14 год, після чого матеріал переносили в поліпропіленову капсулу у свіжу суміш епоксидних смол із каталізатором (5 крапель DMP-30 на 10 мл смол) і полімеризували в термостаті послідовно за 37 °С (12 год), а потім за 60 °С (48 год). Зрізи готували на ультрамікромтомі LKB Ultratome III за допомогою скляного ножа, переносячи їх на нікелеві сіточки. Зрізи контрастували послідовно в 2 % спиртовому розчині ураніацетату і плюмбум цитраті. Морфологію клітин досліджуваних бактерій вивчали з використанням трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ–100-01 за напруги 75 кВ і за збільшення у 3 000 та 19 000 разів (Thomas & Gemming, 2014; Goldstein et al., 2017).

2.10 Статистичне оброблення результатів

Статистичне опрацювання результатів проводили за загальноприйнятими методами. Для обробки даних використовували пакет програми MS Excel 365. Усі експерименти проводили тричі з трьома паралельними повторами дослідних і контрольних варіантів (Петровська та ін., 2022). Обчислювали основні статистичні

показники за отриманими даними (середнє значення – \bar{x} ; стандартну похибку середнього значення трьох вимірювань – SD). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних дослідних і контрольних варіантів використовували ANOVA. Достовірною вважалася різниця за показника достовірності $p \leq 0,05$ (<https://www.xlstat.com/en/>).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Фізико-хімічна характеристика води озера Яворівське та чисельність фототрофних бактерій у ній

У воді озера Яворівське (Львівська область) (рис. 3.1), що виникло на місці затопленого кар'єру сіркового родовища, безперервно тривають складні взаємоперетворення органічних і мінеральних речовин, причому мікроорганізми забезпечують циклічність і збалансованість кругообігу основних хімічних елементів, енергетичний взаємозв'язок процесів, які відбуваються у різних зонах. Шари водної товщі відрізняються за фізико-хімічними властивостями, містять неоднакову кількість поживних речовин і є складною динамічною системою. Від фізико-хімічних властивостей води (температури, рН, мінералізації) залежить токсичність багатьох розчинених у ній речовин, які згубно діють на мікроорганізми (Патика та ін., 2007).

Оскільки влітку й на початку осені кількість мікроорганізмів у водоймах є найвищою (Баран та ін., 2003; Мороз та ін., 2008), ми проводили хімічний аналіз проб води озера, відібраних у вересні 2016 р. з різних глибин (табл. 1, Додаток В). Вода мала рН від 6,6 до 7,8, що перебуває в межах норми. Загальна твердість води, або мінералізація, що характеризується сумарним числом мг-еквівалентів іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} в 1 л води, була невисокою: від 1404 на поверхні до 2678 мг-екв/л на дні, порівняно з гранично допустимою концентрацією для промислових стічних вод (Грушко, 1979) (ГДК) <7000, а отже, за цим показником була придатною як середовище існування для живих організмів.

Вміст іонів Калію на всіх глибинах перевищував ГДК, зокрема, на глибинах понад 20 м – більш ніж удвічі, і був вищим порівняно з контролем (табл. 1; Додаток В). Вміст іонів Натрію, Кальцію та Магнію був на всіх глибинах незначним і не перевищував ГДК та був вищим порівняно з контролем. Вміст HCO_3^- виявився в межах норми та незначно відрізнявся від контролю, лише на глибині 70 м незначно

перевищував ГДК. Вміст Cl^- та NO_3^- теж виявився у межах норми, проте значно відрізнявся від контролю.

Вміст P_2O_5 та NH_4^+ перевищував ГДК лише на глибинах понад 40–50 м. Вміст NH_4^+ суттєво відрізнявся від контролю на глибинах понад 30 м. На відміну від інших сполук, ситуація з вмістом сульфатів і гідроген сульфід у воді озера є критичною. На всіх глибинах концентрація SO_4^{2-} була приблизно у 4–6 разів вищою, ніж ГДК, і коливалася в межах від 913 мг/л на поверхні до 1530 мг/л на дні. Вміст сульфат-іонів та гідроген сульфід на всіх глибинах був значно вищим порівняно з контролем.

Якщо з 2001 р. по 2007 р. концентрація сульфатів у воді кар'єру (придонних шарах) зросла більш ніж удвічі, тобто від 784 до 1725 мг/л (Баран та ін., 2003; Мороз та ін., 2008), то у 2016 р. їхній вміст несуттєво знизився. Як і у попередні роки, гідроген сульфід до глибини 20 м не виявили, але вже на глибинах 30 м і нижче його концентрація у 138–170 і у 9 167–10 067 разів перевищувала ГДК та показники контролю, відповідно. З роками вміст H_2S у придонних шарах поступово зменшився: від 121 мг/л у 2001 р. (Баран та ін., 2003) і 47 мг/л у 2007 р. (Мороз та ін., 2008) до 30–34 мг/л у 2016 р.

Гідроген сульфід є надзвичайно токсичним для живих організмів, він пригнічує у них дихальні процеси, пошкоджує структуру білків, нуклеїнових кислот та інших сполук (Chou, 2003; Галушка & Гудзь, 2009). За високих концентрацій у воді гідроген сульфід впливає на чисельність мікроорганізмів, зокрема, ПНСБ і функціонування мікробіоценозу озера загалом (Баран та ін., 2003; Мороз та ін., 2008).



Рис. 3.1 – Розташування озера Яворівське на тлі ортофотокарти (<https://earth.google.com/web/data=MjYKNAoyCiAxT3BQeVFZanVfZlNtTmI2M2U1bHFRbVJnM1hfLXppTRIMCgo2YzFkMTM0N18wIAI>)

Дослідження чисельності і процесів життєдіяльності мікробіоти озера Яворівське здійснюється працівниками кафедри мікробіології ЛНУ імені Івана Франка з 2001 р. з урахуванням вертикальної зональності хімічного складу води. Найбільшу увагу приділяють дослідженню поширення у затопленому сірчаному кар'єрі, водоносний комплекс якого містить велику концентрацію розчиненого H_2S , бактерій, які забезпечують перетворення сполук Сульфуру у природі. Визначення чисельності фототрофних несіркових бактерій (ФНСБ) і фототрофних сіркових бактерій (ФСБ) важливе для комплексної оцінки внеску цих мікроорганізмів у біогеохімічні цикли Карбону, Нітрогену та Сульфуру в техногенно зміненій екосистемі.

Нами було досліджено чисельність ФНСБ і ФСБ у пробах води озера Яворівське та водойми джерельного типу заповідника Розточчя (контроль) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Чисельність фототрофних сіркових бактерій і фототрофних несіркових бактерій у воді озера Яворівське та водоймі джерельного типу заповідника Розточчя

Кількість мікроорганізмів, КУО/мл води				
Глибина відбору проб води, м				Контроль
0	30	50	70	
Фототрофні несіркові бактерії				
$(6,00 \pm 0,02) \times 10^3$	$(1,31 \pm 0,03) \times 10^5^*$	$(1,13 \pm 0,01) \times 10^5^*$	$(0,90 \pm 0,02) \times 10^4$	$(6,25 \pm 0,08) \times 10^3$
Фототрофні сіркові бактерії				
$(6,00 \pm 0,02) \times 10^1^*$	$(1,30 \pm 0,01) \times 10^3^*$	$(7,00 \pm 0,01) \times 10^4^*$	$(1,10 \pm 0,01) \times 10^5^*$	$(3,50 \pm 0,17) \times 10^2$

Примітки: ФНСБ – фототрофні несіркові бактерії; ФСБ – фототрофні сіркові бактерії ($x \pm SD$; $n=3$); * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$); контроль – проби води, відібрані з придонного шару водойми джерельного типу заповідника Розточчя

ФНСБ ростуть за умов освітлення, використовуючи H_2 , органічні сполуки, H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу (Adessi et al., 2021). У більшості випадків ФНСБ окиснюють сульфід-іони лише до молекулярної сірки, яка ніколи не відкладається у клітинах (Moroz et al., 2021).

У поверхневому шарі води озера Яворівське чисельність фототрофних несіркових бактерій не відрізнялася від такої у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя. На глибині 30 м їхня кількість виявилася найбільшою: $1,31 \times 10^5$ КУО/мл води, що у 21,8 раза більше, порівняно з контролем. Зі збільшенням глибини до 50 м чисельність ФНСБ зменшувалась і становила $1,13 \times 10^5$ КУО/мл води, що у 19,4 раза вище контролю, а на глибині 70 м була тільки в 1,7 раза більшою, ніж у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя (див. табл. 3.1).

ФСБ в анаеробній зоні водойми використовують відновлені сполуки Сульфуру і, в першу чергу, гідроген сульфід як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу (Ozaki et al., 2019; Moroz et al., 2021). Пігментний склад фотосинтезувальних сіркобактерій дає їм змогу використовувати сонячне світло у широкому спектральному діапазоні та поширюватись у різних зонах водойм. Фототрофні сіркобактерії часто вступають у синтрофні взаємовідносини зі сульфیدогенними хемотрофними бактеріями (Патика та ін., 2007; Ozaki et al., 2019). У поверхневому шарі води озера кількість фототрофних сіркобактерій є незначною – 60 КУО/мл води, що у 4,4 раза менше, порівняно з контролем. Зі збільшенням глибини їхня чисельність зростає і є найбільшою на глибинах 50 і 70 м: $7,00 \times 10^4$ та $1,10 \times 10^5$ КУО/мл води відповідно, що у 222 та 314 разів більше контролю. Значна чисельність ФСБ на цих глибинах свідчить про інтенсивну окиснювальну трансформацію сполук Сульфуру у цій зоні озера.

Таким чином, визначення чисельності фототрофних пурпурових бактерій продемонструвало, що ФНСБ найінтенсивніше розвиваються на межі оксигенної й аноксигенної зон, оскільки здатні рости як за аеробних, так і за анаеробних умов. Використовуючи кисень як кінцевий акцептор електронів, вони забезпечують кращі умови для розвитку ФСБ, чисельність яких є вищою у глибших шарах

водойми. Значне перевищення у воді озера Яворівське на деяких глибинах ГДК сульфат-іонів і гідроген сульфід-іонів, очевидно, сприяє зростанню чисельності ФНСБ і ФСБ. Висока концентрація сполук Нітрогену і Сульфуру у воді Яворівського озера та висока чисельність ФНСБ і ФСБ в ній сприяє ефективній мікробній трансформації цих сполук. Отримані результати свідчать про потенційну здатність ФНСБ і ФСБ впливати на біогеохімічні цикли Карбону, Сульфуру та Нітрогену.

3.2 Фізіолого-біохімічні властивості й ідентифікація пурпурових несіркових бактерій, виділених з озера Яворівське

Пурпурові несіркові бактерії (ПНСБ) з води озера Яворівське, яке є прикладом антропогенно трансформованої екосистеми, досліджені недостатньо, на відміну від пурпурових сіркових бактерій (ПСБ) (Кіт & Гудзь, 2007; Мороз та ін., 2017; Moroz et al., 2021).

Для виділення ПНСБ методом Столбунова–Рябова відбирали проби води озера Яворівське з різних глибин (0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 м) із використанням батометра (Антипчук & Кіреєва, 2005). Отримали нагромаджувальну культуру ПНСБ, у якій виявили значну кількість невеликих віброїдних клітин.

Чисті культури ПНСБ отримали, висіваючи накопичувальні культури на модифіковане агаризоване середовище АТСС № 1449 без NaHCO_3 та $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$. Виділили чотири штами ПНСБ, яким дали робочі назви: Y_a -2016, Y_{a1} -2016, Y_{a2} -2016, Y_{a3} -2016. Чистоту виділених культур перевіряли за морфологічними характеристиками колоній і клітин та фарбуванням бактерій за Грамом класичним методом (O'Toole, 2016).

Останнім часом більшість досліджень присвячено вивченню ПСБ, які окиснюють відновлені сполуки Сульфуру, зокрема, гідроген сульфід (Кіт & Гудзь, 2007; Dahl, 2017; Moroz et al., 2021). Проте відомо багато видів ПНСБ, здатних окиснювати гідроген сульфід, використовуючи його як донор електронів аноксигенного фотосинтезу (Dahl, 2017; Dahl, 2020). Хоча ефективність окиснення гідроген сульфідру такими мікроорганізмами нижча, порівняно з ПСБ, які здатні

рости фотолітоавтотрофно, вони також можуть впливати на біогеохімічний цикл сполук Сульфуру в екосистемах.

Дослідили використання сульфід-іонів виділеними штамами мікроорганізмів у середовищі з 0,7 мМ $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ (табл. 3.2).

Штам Ya_2 -2016 найповільніше використовує гідроген сульфід зі середовища. На 13-ту добу культивування його концентрація у середовищі культивування становила 0,5 мМ від початкової концентрації. За росту штамів Ya_1 -2016, Ya_3 -2016 у середовищі з 0,7 мМ сульфід-іонів на 13-ту добу культивування останніх залишилось 0,49 і 0,23 мМ, відповідно, тоді як бактерії штаму Ya -2016 повністю використали сульфід-іони вже на 10-ту добу культивування (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Використання $\text{HS}^- + \text{S}^{2-}$ різними штамами пурпурових несіркових бактерій ($x \pm \text{SD}$, $n=3$)

Штами	Вміст $\text{HS}^- + \text{S}^{2-}$, мМ					
	Тривалість культивування, доби					
	0	2	4	7	10	13
Ya -2016	0,7±0,01	0,38±0,05	0,12±0,01	0,02±0,01	0	0
Ya_1 -2016	0,7±0,01	0,56±0,03	0,5±0,03	0,51±0,02	0,5±0,04	0,49±0,01
Ya_2 -2016	0,7±0,02	0,59±0,02	0,57±0,01	0,56±0,03	0,55±0,02	0,55±0,03
Ya_3 -2016	0,7±0,04	0,48±0,05	0,28±0,02	0,22±0,02	0,23±0,04	0,23±0,04

Для подальших досліджень було обрано штам Ya -2016, оскільки він найшвидше використовує гідроген сульфід зі середовища (див. табл. 3.2).

Таксономічне положення штаму мікроорганізмів Ya -2016 визначали на основі сукупності результатів філогенетичного аналізу та культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей.

Виявлено, що нуклеотидна послідовність консервативної ділянки гена 16S рРНК виявляє високу подібність (99 % ідентичних залишків у попарному

вирівнюванні методом BLASTN) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) до 16S рРНК бактерій роду *Rhodopseudomonas*.

Досліджуваний нами штам на рис. 3.2 позначено як *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. Філогенетичний аналіз засвідчив, що спорідненими до *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 є бактерії *Rhodopseudomonas* sp. A7, *Rhodopseudomonas* sp. J5-3, *Rhodopseudomonas palustris* DX-1 (рис. 3.2).

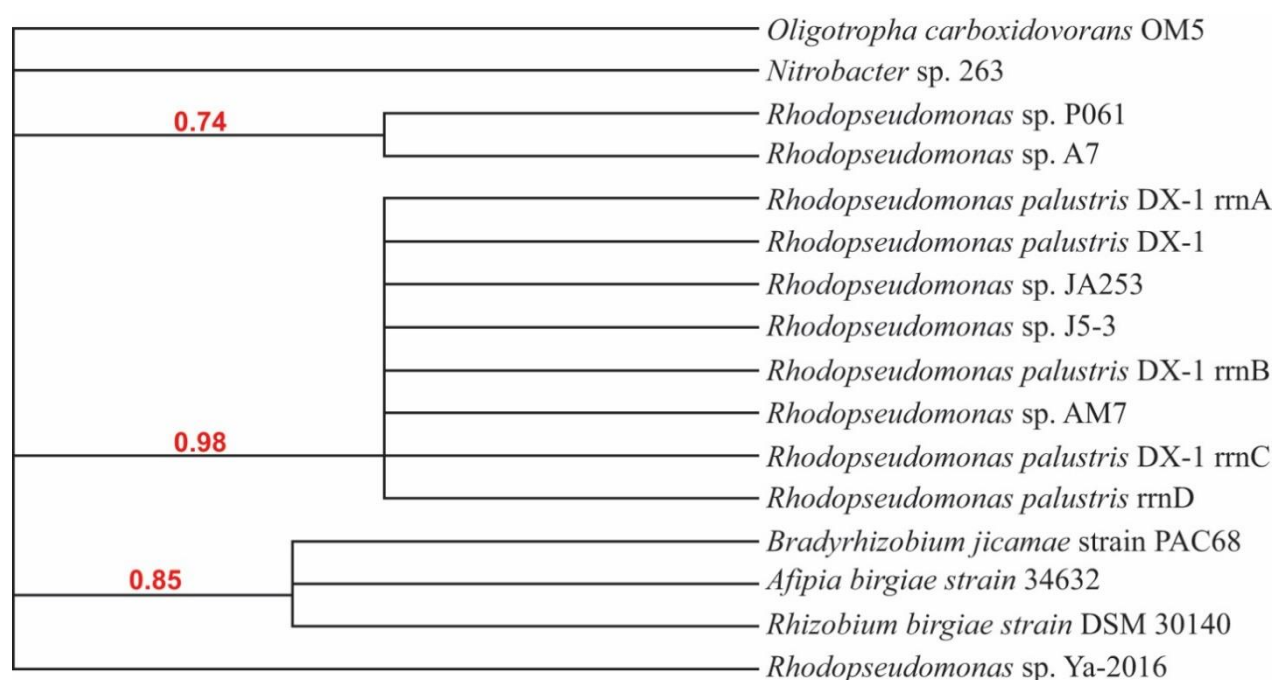


Рис. 3.2 – Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК бактерій родини *Bradyrhizobiaceae*, порядку *Rhizobiales*, класу *Alphaproteobacteria*

Дерево обчислено на основі алгоритму максимальної вірогідності на сервері phylogeny.fr. Досліджувану послідовність позначено як *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. Топологію дерева оцінено методом обчислення індексу aLRT (значення індексу наведено на кладах дерева, у частках від 1), знівельовано всі ноди зі значенням aLRT, меншим ніж 0,5.

Отже, жоден зі секвенованих на сьогодні видів цього роду не є достатньо близьким до *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 на філогенетичному дереві (не лежать на одній кладі), аби стверджувати, що *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 належить до

описаних раніше видів. Виділений штам отримав назву *Rhodopseudomonas yavorovii*.

Штам бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 депоновано в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України з наданням реєстраційного номеру ІМВ В-7620 (Тарабас та ін., 2017e).

Види роду *Rhodopseudomonas* належать до родини *Bradyrhizobiaceae*, порядку *Rhizobiales*, класу *Alphaproteobacteria*. До *Bradyrhizobiaceae*, крім *Rhodopseudomonas*, належать роди *Afipia*, *Agromonas*, *Balucimonas*, *Blastobacter*, *Rosea*, *Nitrobacler*, *Oligotropha*, *Rhodoblastus*, *Salinarimonas* і *Tardiphaga*. Таксономія в *Bradyrhizobiaceae* є досить складною і робить цю родину однією з найяскравіших з точки зору включення родів, які є досить різноманітними фенотипово і мають різні фізіологічні й екологічні характеристики. Наприклад, представники роду *Afipia* спричиняють хвороби у людей, бактерії родів *Rhodopseudomonas* і *Rhodoblastus* є фототрофами, представники роду *Rosea* – коменсали, які ростуть на бобових рослинах, представники родів *Nitrobacler* і *Oligotropha* є хемолітоавтотрофними мікроорганізмами (Brenner et al., 2005).

Види роду *Rhodopseudomonas* – фотосинтезувальні пурпурові несіркові бактерії, поширені у різноманітних природних середовищах, зокрема, у ґрунті й стічних водах (Hiraishi et al., 2020). Клітини виділених нами бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620, як і описаних різними авторами *R. faecalis* JCM 11668^T, *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T, *R. telluris* TUT3615^T, є грамнегативними, не утворюють спор, здатні рухатися за участю полярно розміщеного джгутика (табл. 3.3). Під час вирощування у рідкому середовищі культура *R. yavorovii* ІМВ В-7620 має рожево-червоне забарвлення, на відміну від червоного забарвлення описаних *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002) та *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T (Ramana et al., 2012) чи персиково-коричневого забарвлення *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura, 2017). Клітини *R. yavorovii* ІМВ В-7620 та *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002) мають вібріоїдну форму, на відміну від стрижнеподібної форми клітин *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T (Ramana et al., 2012) та *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura, 2017) (рис. 3.3, А, Б; табл. 3.3). Довжина клітин *R. yavorovii* ІМВ В-

7620, становить 1,5–1,8, а ширина – 0,4–0,5 мкм. Для *R. yavorovii* IMB B-7620, на відміну від *R. telluris* TUT3615^T(Hiraishi & Okamura, 2017), оптимальний діапазон температур і рН є 27...30 °С і 6,8–7,3, відповідно (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Порівняльна характеристика *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 та інших видів роду *Rhodopseudomonas*

Характеристики	Мікроорганізми			
	<i>R. yavorovii</i> IMB B-7620	<i>R. faecalis</i> JCM 11668 ^T (Zhang et al., 2002)	<i>R. rhenobacensis</i> DSMZ 12706 ^T (Ramana et al., 2012)	<i>R. telluris</i> TUT3615 ^T (Hiraishi & Okamura, 2017)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Місце виділення	Сульфідовмісне озеро	Курячі фекалії	Евтрофний ставок	Ґрунт рисового поля
Колір культури	Рожево-червона	Червона	Червона	Персиково-коричнева
Ріст у темряві за аеробних умов	+	–	+	+
Фототрофний ріст	+	+	+	+
Фактори росту	В ₁₂	В ₁	ПАБК	ПАБК
Фарбування за Грамом	Грамнегативні	Грамнегативні	Грамнегативні	Грамнегативні
рН: оптимум діапазон	6,8–7,3 4,5–7,8	7,0 6,5– 7,0	5,5 5,0–7,0	6,3–7,0 5,0–9,0
Температура (°С): оптимальна діапазон	27–30 25–30	30 25–35	30 25–35	30–35 25–40
Розміри клітин (мкм): довжина ширина	1,5–1,8 0,4–0,5	1,0–2,0 0,6–0,8	1,5–2,0 0,4–0,6	2,0–4,5 0,8–1,5

Закінчення табл. 3.3

1	2	3	4	5
Форма клітин	Вібриодна	Вібриодна	Стрижнеподібна	Стрижнеподібна
Використання джерел Карбону:				
Гліцерол	+	–	(+)	+
Етанол	+	–	+	(+)
Фумарат	–	(+)	+	+
Ацетат	+	+	+	+
Піруват	(+)	+	+	+
Лактат	+	+	+	(+)
Цитрат	+	–	–	(+)
Малат	+	+	+	+
Пропіонат	(+)	(+)	–	(+)
Сукцинат	(+)	+	+	+
Глюкоза	(+)	+	–	(+)
Фруктоза	(+)	нд	нд	(+)
Капронова к-та	+	нд	нд	(+)
Масляна к-та	–	нд	нд	(+)
Крохмаль	+	нд	нд	нд
Дріжджовий екстракт	+	нд	нд	+
Пептон	+	нд	нд	+
Бензоат	+	–	–	(+)

Примітка: «+» – ріст є; «–» – росту немає; (+) – незначний ріст; нд – не досліджували; ПАБК – параамінобензойна кислота

R. yavorovii IMB B-7620, як і описані різними дослідниками бактерії *R. faecalis* JCM 11668^T, *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T, *R. telluris* TUT3615^T, здатні фотометаболізувати ацетат, малат, лактат. *R. yavorovii* IMB B-7620 як і *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura, 2017), на відміну від *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002) та *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T (Ramana et al., 2012), здатні використовувати як джерело Карбону цитрат і бензоат.

Спостерігали незначне нагромадження біомаси бактеріями *R. yavorovii* IMB B-7620 за росту в середовищі з піруватом, пропіонатом, сукцинатом, глюкозою, фруктозою. *R. yavorovii* IMB B-7620, *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T (Ramana et al., 2012), *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura, 2017) для росту використовують етанол і гліцерол, на відміну від *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002).

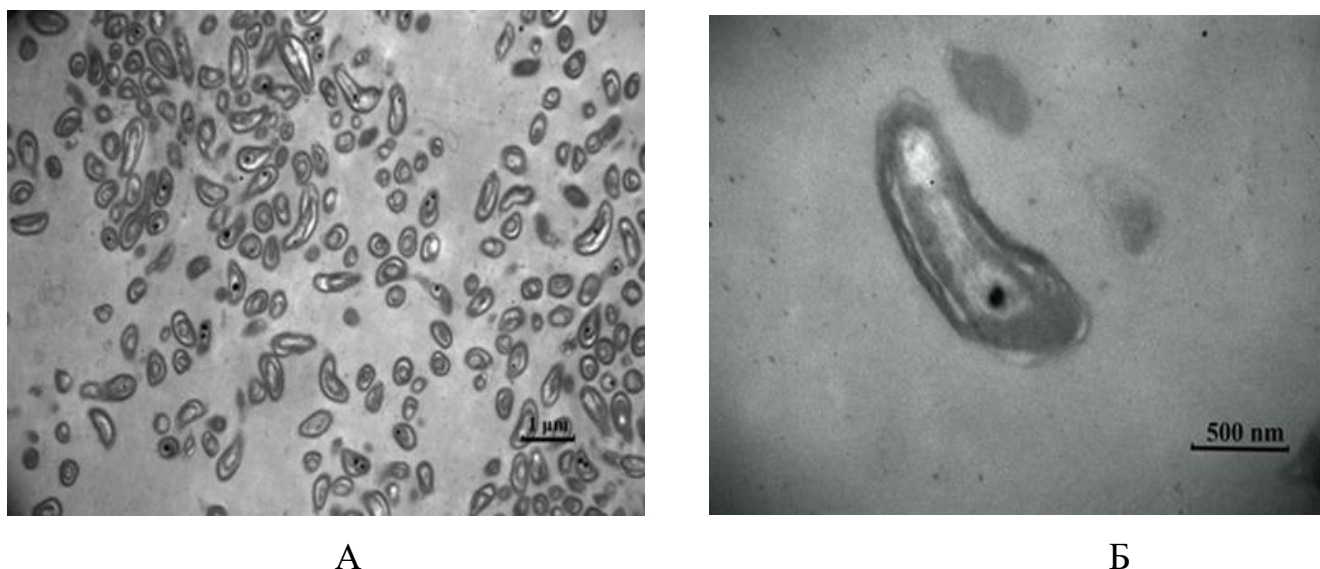


Рис. 3.3 – Клітини пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620: А – електронна мікроскопія, $\times 3\ 000$; Б – електронна мікроскопія, $\times 19\ 000$

R. yavorovii IMB B-7620, на відміну від описаних різними дослідниками бактерій *R. faecalis* JCM 11668^T, *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T, *R. telluris* TUT3615^T, не ростуть у середовищі з фумаратом. За росту в середовищі з масляною кислотою *R. yavorovii* IMB B-7620 не нагромаджують біомасу, на відміну від *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura, 2017). Однак спостерігали значне нагромадження біомаси *R. yavorovii* IMB B-7620 у середовищах із пептоном, дріжджовим екстрактом, крохмалем і капроною кислотою. Факторами росту для *R. yavorovii* IMB B-7620 є ціанокобаламін (див. табл. 3.3). Необхідно зазначити, що ріст бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 і *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T (Ramana et al., 2012) пригнічується за внесення 1 г/л NaCl. *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura,

2017), на відміну від *R. yavorovii* ІМВ В-7620, ростуть у середовищі за внесення NaCl у концентрації 0–2 %.

Деякі фізіолого-біохімічні властивості виділеного штаму досліджено за допомогою RapID ONE тестів. Встановлено, що бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 гідролізують сечовину, аргінін, аліфатичний тіол, складний ефір жирної кислоти, сорбіт, адотинол і не гідролізують орнітин, лізин, цукровий альдегід, *p*-нітрофенол- β , D-глюкуронід, σ -нітрофенол- β , D-галактозид, *p*-нітрофенол- β , D-глюкозид, *p*-нітрофенол- β , D-ксилозид, *p*-нітрофенол-*n*-ацетил- β , D-глюкозамінід, малонат, пролін- β -нафтиламін, γ -глутаміл- β -нафтиламін, піролідин- β -нафтиламін (Додаток В, табл. 3).

За допомогою тесту ID 32 GN встановлено, що бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовують L-рамнозу, N-ацетилглюкозамін, натрію малонат, натрію ацетат, молочну й ітаконову кислоти, L-аланін, глікоген, L-серин, D-маніт, D-глюкозу, L-арабінозу, деканову та валеріанову кислоти, L-гістидин, натрію цитрат 3-заміщений, L-пролін і не використовують D-рибозу, інозит, D-сахарозу, D-мальтозу, пробкову кислоту, калій-5-кетоглюконат, 3-гідроксибензойну кислоту, саліцин, D-мелібіозу, L-фукозу, D-сорбіт, кислоту пропіонову, калію 2-кетоглюконат, 4-гідроксибензойну і 3-гідроксимасяню кислоти (Додаток В, табл. 4).

Багато представників пурпурових несіркових бактерій росте у темряві за мікроаерофільних і аеробних умов, отримуючи енергію внаслідок аеробного дихання (George et al., 2020; Mothersole et al., 2018).

Досліджено здатність бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 рости аеробно за хемотрофних і анаеробно за фототрофних умов культивування, порівняно з *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002), які не здатні до аеробного росту за умов хемотрофії. *R. yavorovii* ІМВ В-7620, як і *R. rhenobacensis* DSMZ 12706^T (Ramana et al., 2012) та *R. telluris* TUT3615^T (Hiraishi & Okamura, 2017), здатні до аеробного хемотрофного росту (див. табл. 3.3).

Забарвлення культури клітин *R. yavorovii* ІМВ В-7620 було рожево-червоним за умов фототрофії, блідо-рожевим або безбарвним за аеробних умов

культивування. Припускаємо, що в досліджених бактерій кисень інгібує синтез пігментів фотосинтезу за аеробних умов росту на триптон-соевому агарі (ТСА), як це описано у *Rhodobacter sphaeroides* (Mothersole et al., 2018).

Клітини *R. yavorovii* ІМВ В-7620, вирощені хемотрофно за аеробних умов культивування, висівали у модифіковане середовище АТСС № 1449 та вирощували за освітлення в анаеробних умовах. Появу рожево-червоного забарвлення культури клітин спостерігали на 20–30 доби культивування.

Для визначення якісного складу пігментів клітини *R. yavorovii* ІМВ В-7620 вирощували у модифікованому середовищі АТСС № 1449 з 1,4 мМ $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ без NaHCO_3 за освітлення й анаеробних умов упродовж 7-ми діб. Після цього клітини осаджували центрифугуванням і використовували для отримання екстрактів пігментів. Екстракти пігментів бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 розділяли з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії. Було визначено три гомологічні форми бактеріохлорофілу *a*, які мають максимуми світлопоглинання за 361; 605; 770 нм (рис. 3.4).

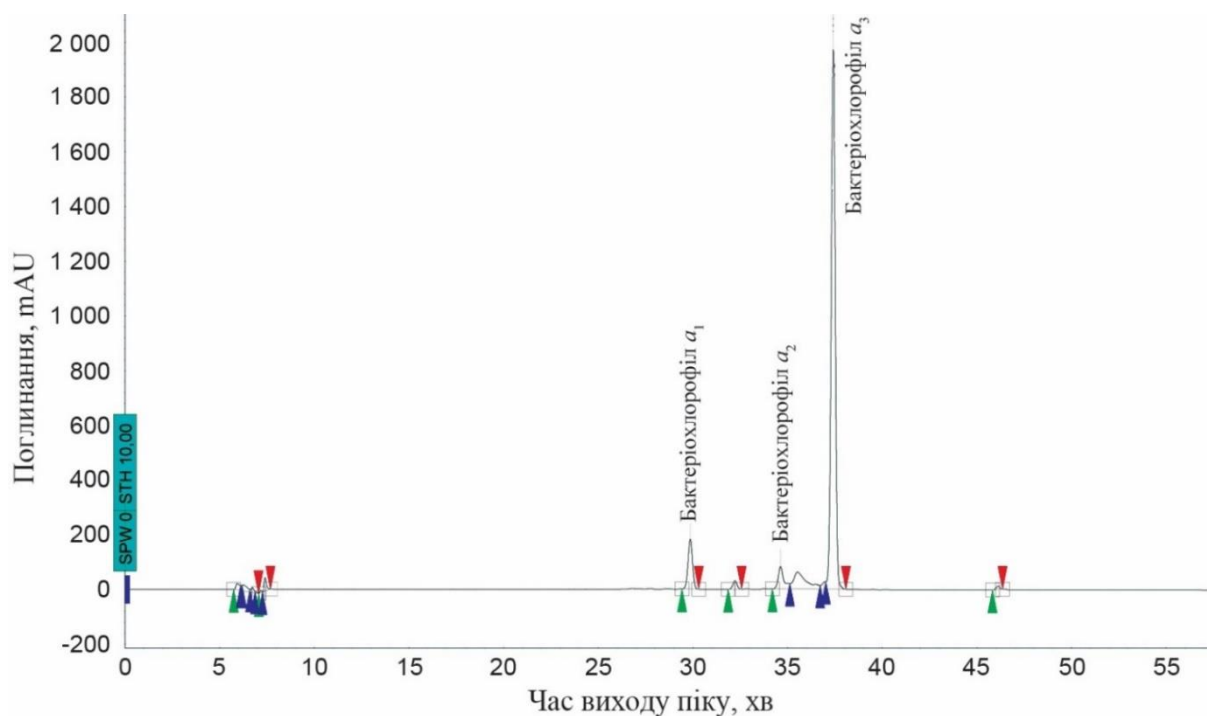


Рис. 3.4 – Гомологічні форми бактеріохлорофілу *a* *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за розділення з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії ($\lambda=770$ нм)

Гомологи бактеріохлорофілу *a* мали спектри поглинання за λ_{\max} 361; 605; 770 нм. Ці дані узгоджуються з описаними в роботі Borrego та Garcia-Gil (1994). Кількість гомологів бактеріохлорофілу може бути різною і залежить від виду пігменту, а також від таксономічної групи бактерій (Borrego & Garcia-Gil, 1994).

Фототрофні мікроорганізми містять також каротиноїди, які не лише поглинають енергію світла та передають її через бактеріохлорофіли до реакційних центрів і систем транспортування електронів, але й виконують фотопротекторну функцію (George et al., 2020; Mothersole et al., 2018). Каротиноїди є поліізопреноїдними сполуками. Їх поділяють на дві основні групи: каротини, або вуглеводневі каротиноїди, які складаються з атомів Карбону і Гідрогену; ксантофіли, які є оксигенованими вуглеводневими похідними, що містять принаймні одну оксигеновмісну функціональну групу, таку як гідроксил-, кето-, епоксид-, метокси-групи (Pérez-Gálvez et al., 2020).

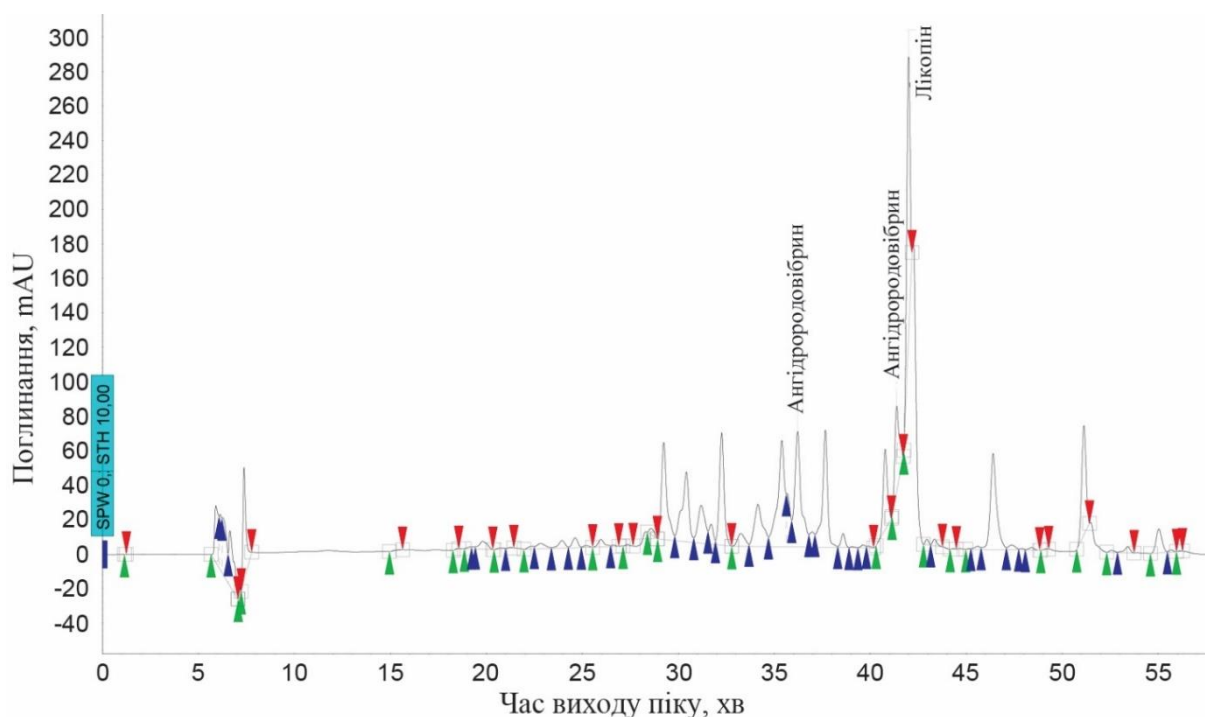


Рис. 3.5 – Каротиноїди *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620, ідентифіковані з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії ($\lambda=474$ нм)

Максимуми світлопоглинання каротиноїдів перебувають у межах 450–600 нм. Саме в цій ділянці спектра зафіксовано відмінності у спектральних властивостях екстрактів пігментів бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620. Використовуючи ВЕРХ у процесі розділення каротиноїдів, вдалось ідентифікувати лікопін за λ_{\max} 446; 473; 504 нм) і ангідрородовібрин за λ_{\max} 459; 485; 519 нм (рис. 3.5, 3.6), які належать до каротиноїдів спірилоксантинового ряду.

Спектральні властивості цих пігментів були близькими до описаних максимумів поглинання лікопіну й ангідрородовібрину, але не ідентичними. Численні інші неідентифіковані піки речовин, які, ймовірно, були пігментами, нам не вдалось ідентифікувати у досліджуваних зразках (див. рис. 3.5).

Такі ж пігменти були ідентифіковані *Rhodopseudomonas telluris* (Hiraishi & Okamura, 2017). У ПНСБ *Rhodospirillum rubrum* описано шлях біосинтезу лікопіну як проміжного каротиноїду та кінцевого спірилоксантину (Takaichi, 2009; Hiraishi & Okamura, 2017).

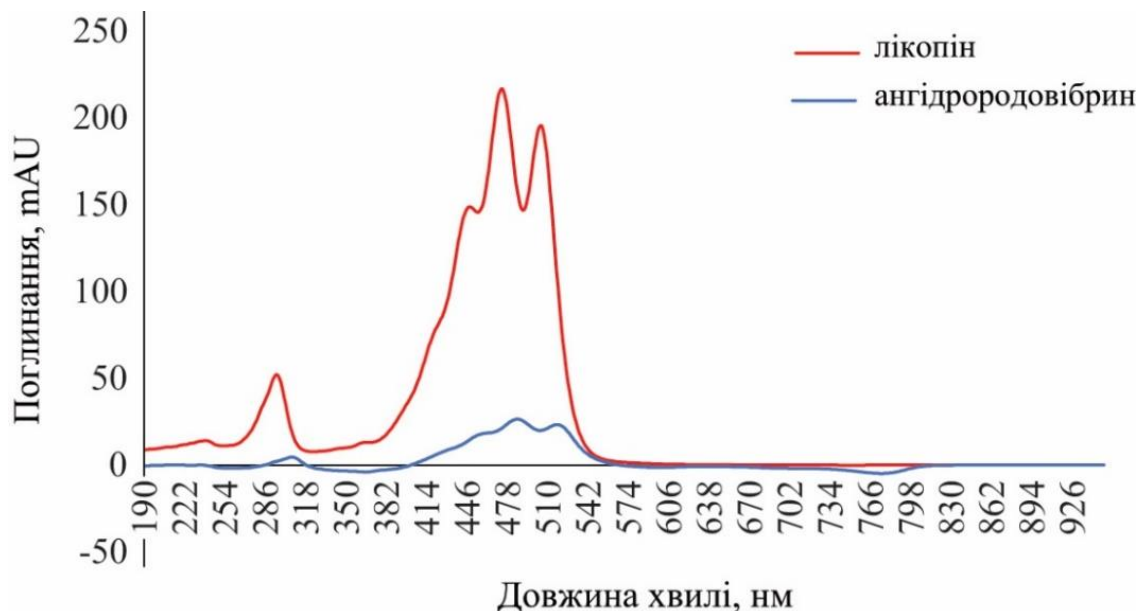


Рис. 3.6 – Спектри поглинання лікопіну й ангідрородовібрину пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Отже, бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 відрізняються за морфологічними і біохімічними характеристиками від валідно описаних видів роду *Rhodopseudomonas* у визначнику Берджі (Brenner et al., 2005) та здатні рости фототрофно або хемотрофно.

Таким чином, на основі фізіологічних, морфологічних і біохімічних властивостей, ідентифікації пігментів, а також на основі аналізу *in silico* нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК можна стверджувати, що виділена культура належить до фототрофних несіркових бактерій роду *Rhodopseudomonas*. Цей штам бактерій отримав назву *Rhodopseudomonas yavorovii* та депонований у GenBank (номер доступу: OL711631). Він зберігається в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України як *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620.

3.3 Використання сполук Сульфуру та Нітрогену бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Сульфат- чи сульфід-іони у воді й у ґрунті, а також діоксид сульфуру в атмосфері становлять більшу частину Сульфуру в природі. Меншу, але суттєву роль відіграють і полісульфіди, політіонати, тіосульфати, сульфоксиди, а також елементна сірка. Сульфур входить до складу різних органічних сполук, амінокислот, кофакторів ферментів, (полі)пептидів, сульфоліпідів, вітамінів і вуглеводів. Біологічна роль неорганічних сполук Сульфуру порівняно обмежена: вони можуть бути джерелом Сульфуру і включатись у зазначені вище органічні сполуки, а також можуть бути використані як донори або акцептори електронів у процесах отримання енергії (Dahl, 2017; Dahl, 2020). Дослідження використання сульфат-, сульфід-, тіосульфат-іонів та інших сполук Сульфуру ПНСБ дасть можливість оцінити їхню біогеохімічну роль у перетворенні цих сполук у природних екосистемах.

Щоби вивчити здатність до використання різних концентрацій сульфат-іонів *R. yavorovii*, бактерії культивували в модифікованому середовищі АТСС № 1449

без внесення натрій сульфїду нонагїдрату. Найбїльшу бїомасу (1,4 г/л) бактерїї нагромаджують на десяту добу росту в середовищі з 2,5 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (контроль). Збїльшення концентрації $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у середовищі до 3; 4; 5 мМ призводило до зниження нагромадження бїомаси бактерїями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 на 21,4; 35,7; 71,4 %, вїдповїдно. За концентрацій 0,5 та 1 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у середовищі нагромадження бїомаси бактерїями знижувалось у 2 та 2,3 рази, вїдповїдно, порївняно з контролем (рис. 3.7).

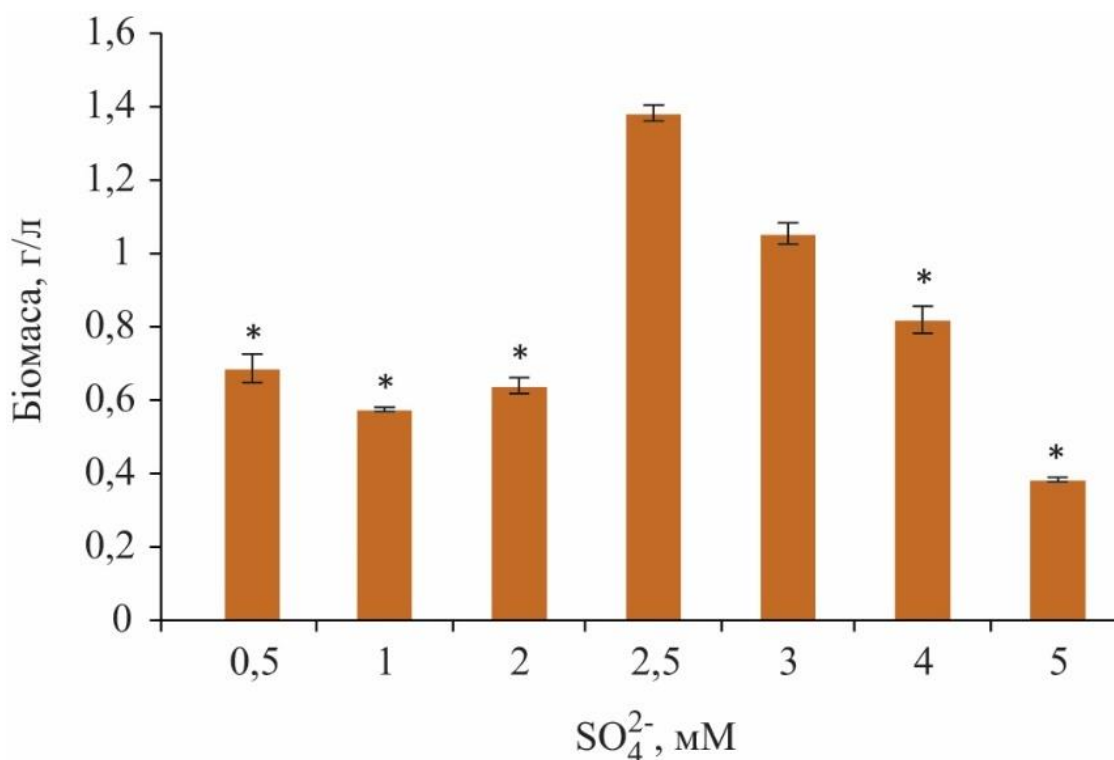


Рис. 3.7 – Нагромадження бїомаси бактерїями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 на 13-ту добу росту в середовищі з рїзним вмістом SO_4^{2-} ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$). Контроль – нагромадження бїомаси за використання 2,5 мМ SO_4^{2-} ; * – вїрогїднї змїни порївняно з контролем ($p \leq 0,05$)

За росту в середовищі з 2,5 мМ сульфат-їонїв бактерїї *R. yavorovii* ІМВ В-7620 асимїлюють 17,7 % сульфатїв на тринадцяту добу, пїсля чого завершується експоненційна фаза росту (рис. 3.8).

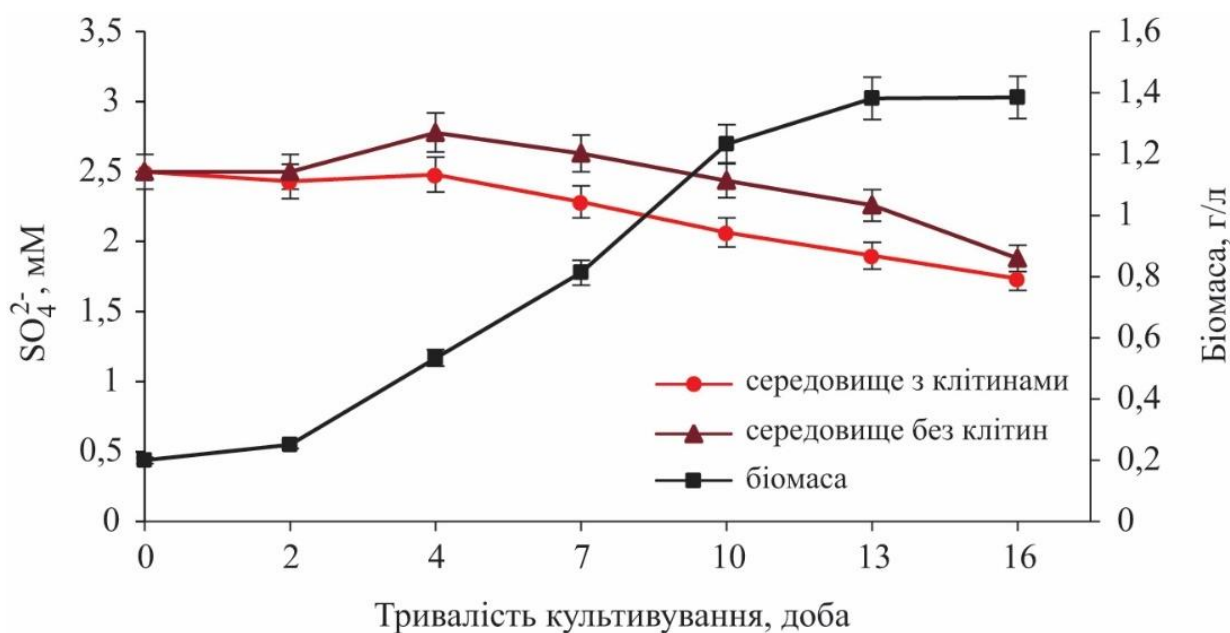


Рис. 3.8 – Асиміляція сульфат-іонів (контроль – вміст сульфат-іонів у середовищі без клітин) і нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 під час росту в середовищі з 2,5 мМ SO₄²⁻ (x±SD, n=3)

R. yavorovii IMB B-7620, як і описані різними авторами інші представники роду *Rhodopseudomonas*: *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002), *R. pentothentaxigens* JA575^T (Kumar et al., 2013), *R. thermotolerans* JA576^T (Kumar et al., 2013), *R. harwoodiae* JA531^T (Ramana et al., 2012), *R. parapalustris* JA310^T (Ramana et al., 2012), *R. globiformis* DSM161 (Imhoff et al., 1981), на відміну від *R. sulfoviridis* (Neutzling et al., 1982) і *R. julia* (Brenner et al., 2005) здатні використовувати сульфат-іони як єдине джерело Сульфуру за умов освітлення.

На відміну від асиміляції сульфуровмісних сполук представниками більшості таксономічних груп, їхня дисиміляція здійснюється прокаріотами і є процесом отримання енергії, в якому сполуки Сульфуру виступають донорами або акцепторами електронів. У багатьох фототрофних бактерій відновлені сполуки Сульфуру є донорами електронів аноксигенного фотосинтезу. *Allochrodatum vinosum* і *Chlorobaculum tepidum*, представники ПСБ і ЗСБ, відповідно, є модельними об'єктами для детального з'ясування шляхів окиснення відновлених сполук Сульфуру (Dahl, 2017).

Найбільшу біомасу (1,2 г/л) бактерії нагромаджували на 10-ту добу росту в середовищі з 1,4 мМ $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$. Збільшення концентрації сульфід-іонів у середовищі до 2,8 і 5,6 мМ зумовлювало зниження нагромадження біомаси бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620. За концентрації 5,6 мМ $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ у середовищі нагромадження біомаси бактеріями знижувалось удвічі, порівняно з контролем (рис. 3.9).

R. yavorovii ІМВ В-7620, як і *R. harwoodiae* JA531^T (Ramana et al., 2012), *R. parapalustris* JA310^T (Ramana et al., 2012), *R. globiformis* DSM161 (Imhoff et al., 1981), використовують тіосульфат-іони, на відміну від *R. faecalis* JCM 11668^T (Zhang et al., 2002). За концентрації у середовищі 1,4 мМ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ біомаса клітин *R. yavorovii* ІМВ В-7620 була 1,4 г/л. За підвищення вмісту $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ до 5,6 мМ біомаса бактерій зростала до 1,6 г/л. Максимальний приріст біомаси спостерігали на 10–13-ту доби культивування (рис. 3.10). На відміну від сульфід-іонів, тіосульфат-іони стимулювали ріст *R. yavorovii* ІМВ В-7620 (рис. 3.9; 3.10).

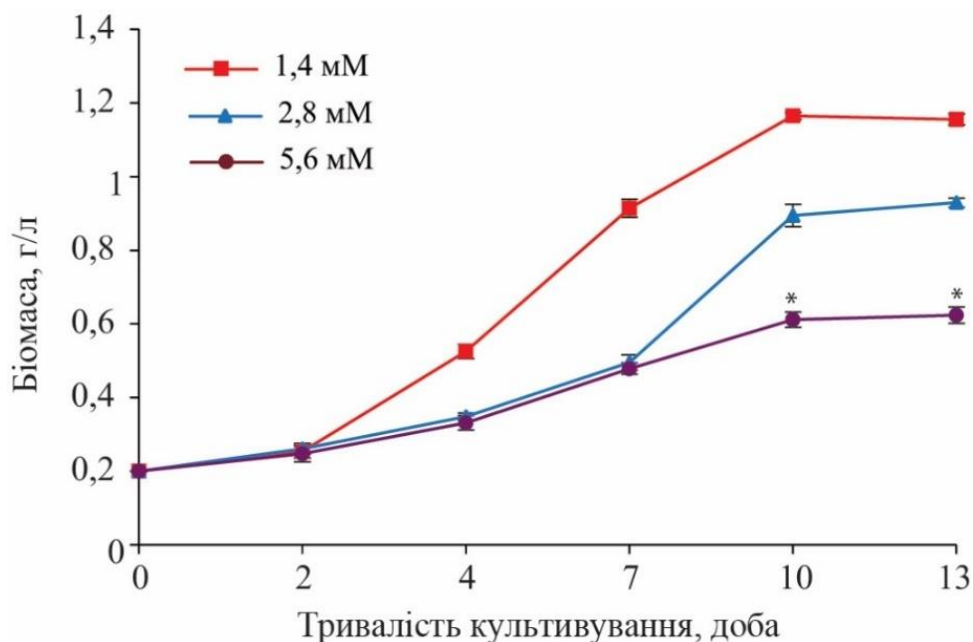


Рис. 3.9 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-2076 у середовищі з різним вмістом Na_2S ($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=3$). Контроль – нагромадження біомаси за використання 1,4 мМ $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p\leq 0,05$)

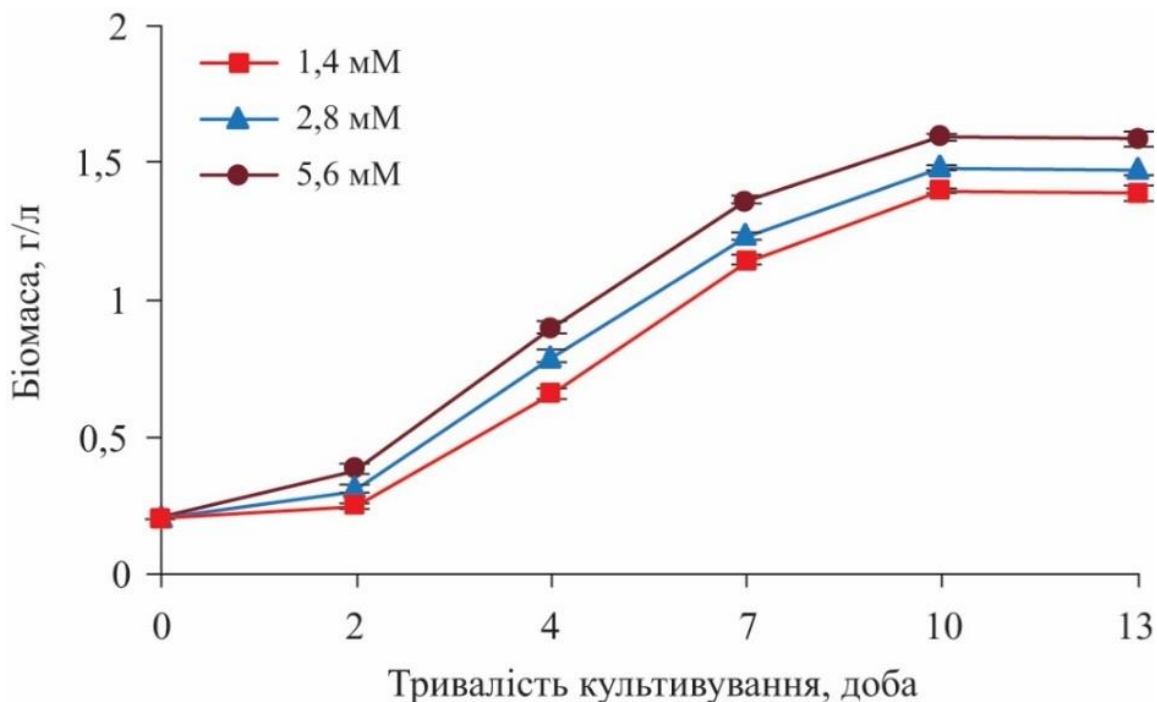


Рис. 3.10 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodospirillum rubrum* ІМВ В-2076 у середовищі з різним вмістом тіосульфат-іонів ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$). Контроль – нагромадження біомаси у середовищі з 1,4 мМ $S_2O_3^{2-}$

Бактерії *R. yavorovii* Ya-2016 у середовищі з 1,4 мМ $Na_2S \times 9H_2O$ знижують вміст сульфід-іонів на 97,4 % на тринадцяту добу культивування. Залежно від рН середовища гідроген сульфід дисоціює на йони гідросульфіду і сульфіду: $H_2S \rightarrow HS^- + H^+ \leftrightarrow S^{2-} + 2H^+$ (Набиванець та ін., 2007; Dahl, 2020). рН середовища культивування *R. yavorovii* Ya-2016 упродовж росту становило 7,0–7,9, тому вміст розчиненого гідроген сульфіду в культуральній рідині визначали як вміст HS^- . За більших концентрацій у середовищі гідроген сульфід використовується бактеріями менш інтенсивно, зокрема, за концентрації 2,8 мМ бактерії використали 42,6 % сульфідів, за концентрації 5,6 мМ – лише 18,7 % (рис. 3.11).

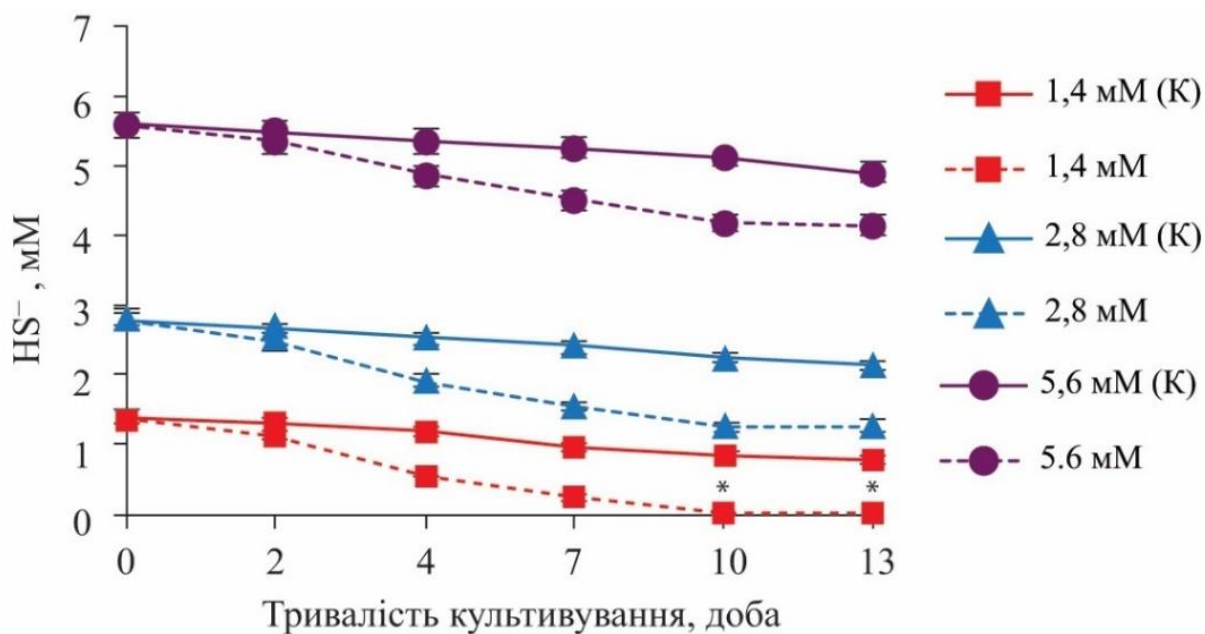


Рис. 3.11 – Використання сульфід-іонів бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 ($x \pm SD$, $n=3$). Контроль – вміст HS^- у середовищі з 1,4 мМ HS^- ; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Ймовірно, сповільнення окиснення бактеріями гідроген сульфід у високих концентраціях у середовищі відбувається внаслідок пригнічення у них фотосинтетичних і ростових процесів. Можливо, гідроген сульфід, взаємодіючи з металовмісними білками й іншими клітинними метаболітами, пошкоджує структуру та функції світлозбиральних пігментів, фотохімічних реакційних центрів і фотосинтетичних електронтранспортних систем у досліджених бактерій, як це відбувається у клітинах фототрофних бактерій (Julian et al., 2005).

У середовищі з 1,4 мМ тіосульфат-іонів бактерії знижують їхній вміст на 68,8 % на десяту добу. За більших концентрацій у середовищі бактерії використовували тіосульфат-іони менш інтенсивно, зокрема, за концентрації 2,8 мМ бактерії використали 28,0 % тіосульфат-іонів, за концентрації 5,6 мМ – лише 3,7 % (рис. 3.12).

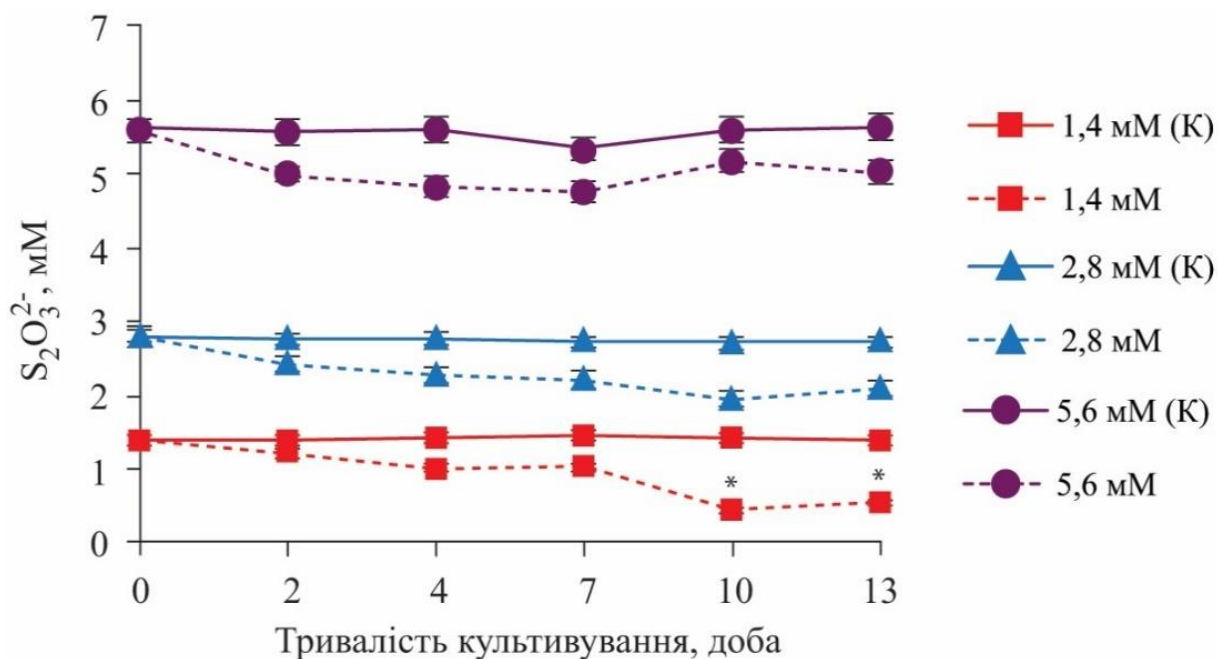


Рис. 3.12 – Використання тіосульфат-іонів бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* IMB B-7620 ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$). Контроль – вміст $S_2O_3^{2-}$ у середовищі з 1,4 мМ $S_2O_3^{2-}$; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

У результаті окиснення бактеріями гідроген сульфід у за його вмісту 1,4; 2,8 та 5,6 мМ у середовищі нагромаджувалося 0,13; 0,12 та 0,11 мМ сульфат-іонів, відповідно. Елементна сірка нагромаджувалася поза клітинами у невеликих кількостях: 0,009; 0,007 та 0,006 г/г сухої ваги клітин, відповідно, на тринадцяту добу культивування (рис. 3.13).

У результаті дослідження закономірностей використання натрій тіосульфату *R. yavorovii* IMB B-7620 встановлено, що бактерії використовують останній як донор електронів аноксигенного фотосинтезу.

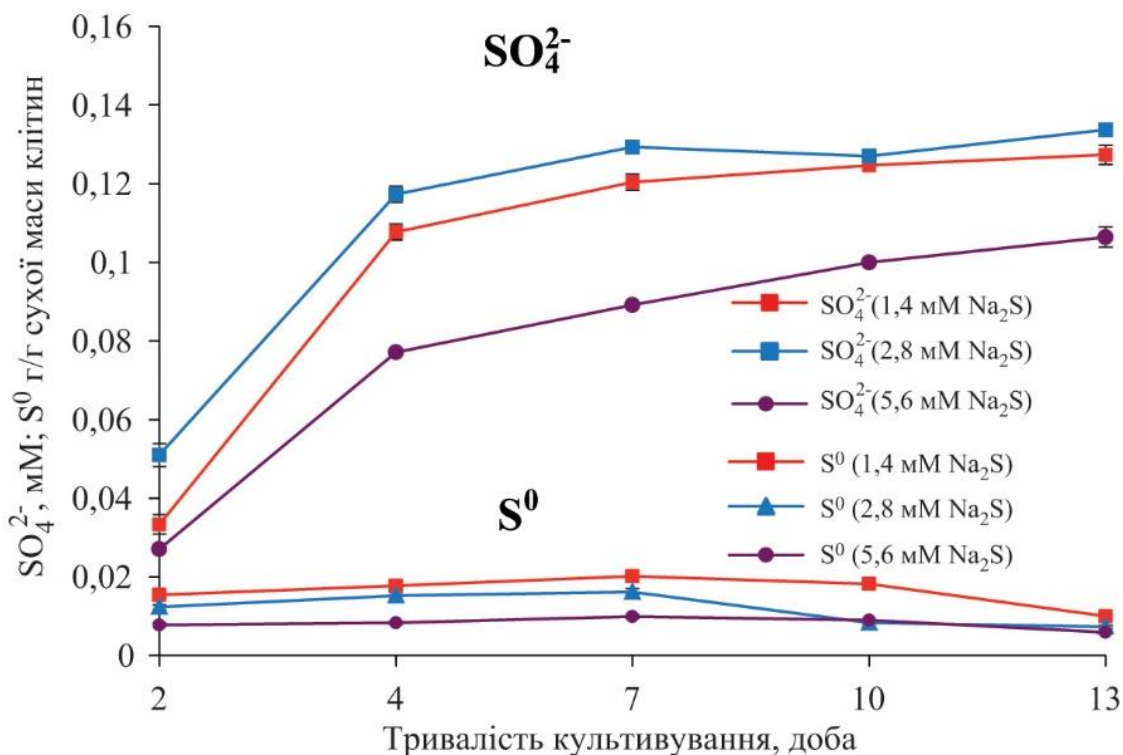


Рис. 3.13 – Утворення сульфат-іонів та елементної сірки бактеріями *Rhodospirillum rubrum* IMB B-7620 у середовищі з Na₂S ($\bar{x} \pm SD$, n=3). Контроль – вміст SO₄²⁻ та S⁰ у середовищі з 1,4 мМ HS⁻

R. yavorovii IMB B-7620 використовують сульфат-іони у процесах асиміляції, про що свідчить крива росту бактерій (див. рис. 3.8). Упродовж тринадцяти діб культивування у результаті окиснення тіосульфат-іонів за їхніх вихідних концентрацій 1,4; 2,8; 5,6 мМ у середовищі нагромаджувалися сульфат-іони, концентрація яких на десяту добу культивування становила 1,30; 0,75; 0,44 мМ, відповідно (рис. 3.14).

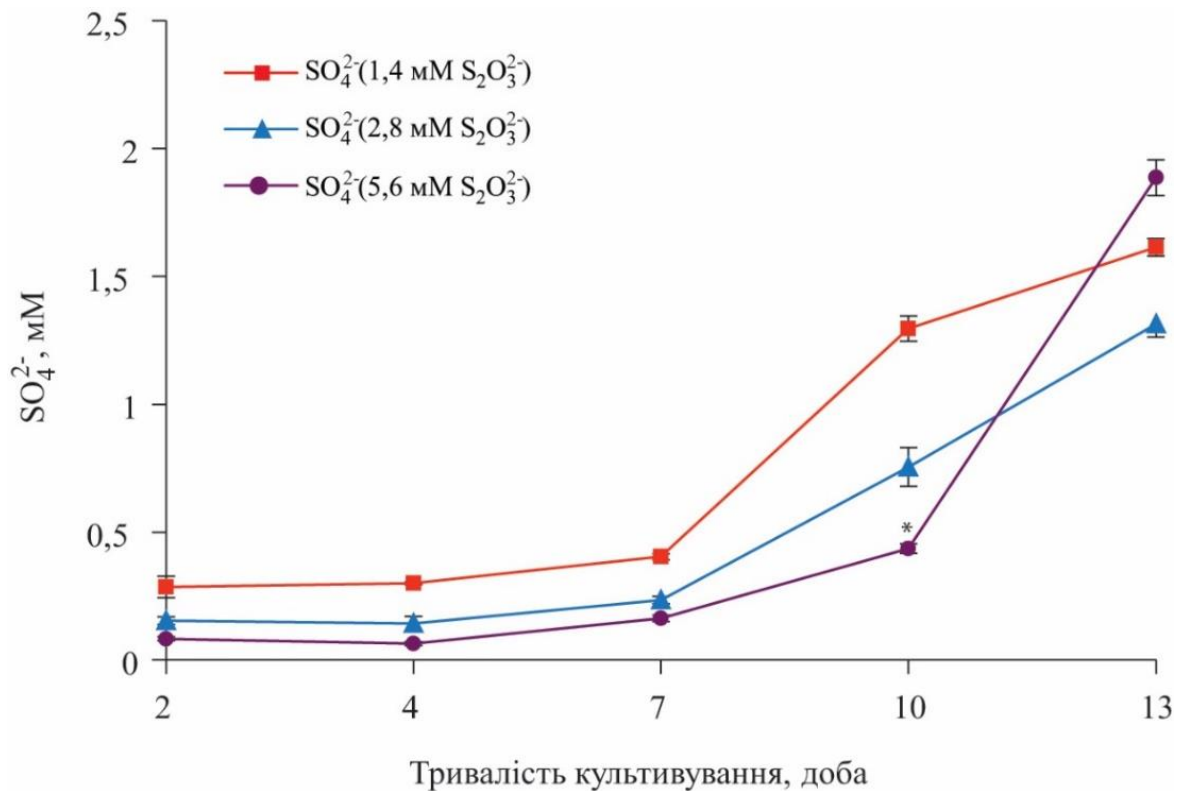


Рис. 3.14 – Утворення сульфат-іонів бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищі з Na₂S₂O₃ ($\bar{x} \pm SD$, n=3). Контроль – вміст сульфат-іонів у середовищі з 1,4 mM S₂O₃²⁻; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Нітроген у тій чи іншій формі міститься в усіх складових частинах біосфери. Хоча більша частина Нітрогену перебуває у формі газоподібного азоту в атмосфері або входить до складу осадових порід, біологічно доступним є до 2 % Нітрогену (Zhang et al., 2020). Оскільки концентрація CO₂ в атмосфері постійно підвищується, швидкість фіксації CO₂ може зрости тільки за більшої концентрації біодоступного Нітрогену в навколишньому середовищі, тому наслідки глобального потепління може зменшити лише достатній його запас (Reich, Hungate, & Luo, 2006).

Нітроген є незамінним компонентом багатьох біологічних молекул. Фототрофні бактерії використовують сполуки Нітрогену у процесах асиміляції та дисиміляції. Зазвичай іони амонію є найкращим джерелом Нітрогену для цих мікроорганізмів, проте деякі штами фототрофних бактерій використовують нітрат-

іони, якщо у середовищі немає йонів амонію (Olmo-Mira et al., 2006; Pino et al., 2006; Yang et al., 2019; Moroz et al., 2021).

Дослідили здатність *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовувати різноманітні сполуки Нітрогену як джерело цього елемента у процесах асиміляції в концентрації 1,9 мМ за інтенсивності освітлення 200 лк і анаеробних умов на 10-ту добу культивування в модифікованому середовищі АТСС № 1449. Виявили, що бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 як джерело Нітрогену використовують амоній хлорид, сечовину, натрій нітрат.

Відомо, що фототрофи безпосередньо впливають на цикл Нітрогену, беручи участь у відновних процесах, зокрема, у фіксації азоту, асиміляції та диханні. За участю цих бактерій також відбувається окиснення нітрит-іонів за анаеробних умов. Цей процес може конкурувати з іншими процесами циклу Нітрогену, зокрема, денітрифікацією, аеробною нітрифікацією або анамокс-реакцією (Yang et al., 2019).

R. yavorovii ІМВ В-7620, подібно до інших видів роду, використовують іони амонію як джерело Нітрогену. *R. yavorovii* ІМВ В-7620 як і *R. harwoodiae* JA531^T (Ramana et al., 2012), *R. cryptolactis* (Brenner et al., 2005) ростуть у середовищі зі сечовиною. *R. yavorovii* ІМВ В-7620, як і інші представники роду *Rhodopseudomonas*: *R. parapalustris* JA310^T (Ramana et al., 2012), *R. pentothentaxigens* JA575^T (Kumar et al., 2013), *R. thermotolerans* (Kumar et al., 2013), *R. palustris* (Brenner et al., 2005), *R. telluris* (Hiraishi & Okamura, 2017), на відміну від *R. julia* (Brenner et al., 2005) та *R. harwoodiae* JA531^T (Ramana et al., 2012), використовують нітрат-іони за фототрофних умов росту.

Сполуки Сульфуру, зокрема, сульфіді, тіосульфати, тетратіонати й інші добре вивчені як донори електронів аноксигенного фотосинтезу (Dahl, 2017; Imhoff, 2017; Moroz et al., 2021). Процеси окиснення відновлених сполук Нітрогену під час аноксигенного фотосинтезу маловідомі. Тому досліджували вплив нітрит-іонів на нагромадження біомаси бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620. Бактерії не росли у модифікованому середовищі АТСС № 1449 з NaNO_2 без внесення натрій

молібдату. Тому подальші дослідження впливу нітрит-іонів на бактерії проводили у середовищі, яке містило Na_2MoO_4 .

За концентрації у середовищі 2,8 мМ NO_2^- біомаса *R. yavorovii* ІМВ В-7620 на 13-ту добу культивування була у 2,6 раза вищою, порівняно з біомасою в середовищі із 0,7 мМ NO_2^- . За підвищення вмісту NO_2^- до 5,6 мМ біомаса бактерій знижувалася на 74,8 % (рис. 3.15).

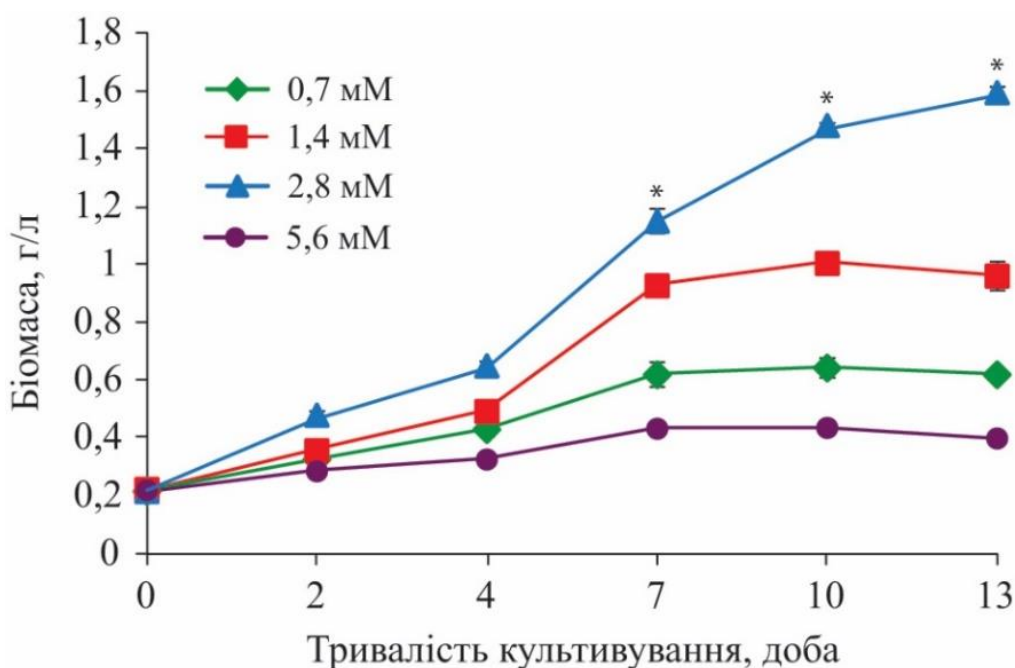


Рис. 3.15 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за росту в середовищі з різним вмістом NO_2^- ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$). Контроль – нагромадження біомаси у середовищі з 0,7 мМ NO_2^- ; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

У середовищі з 0,7 мМ нітрит-іонів бактерії використовують їх на 100 %, а за збільшення концентрації до 1,4 мМ – на 93,67 % на 10-ту добу культивування (рис. 3.16). Бактерії окиснюють нітрит-іони упродовж 13-ти днів культивування за їхньої вихідної концентрації 2,8 мМ на 86,13 % (див. рис. 3.16).

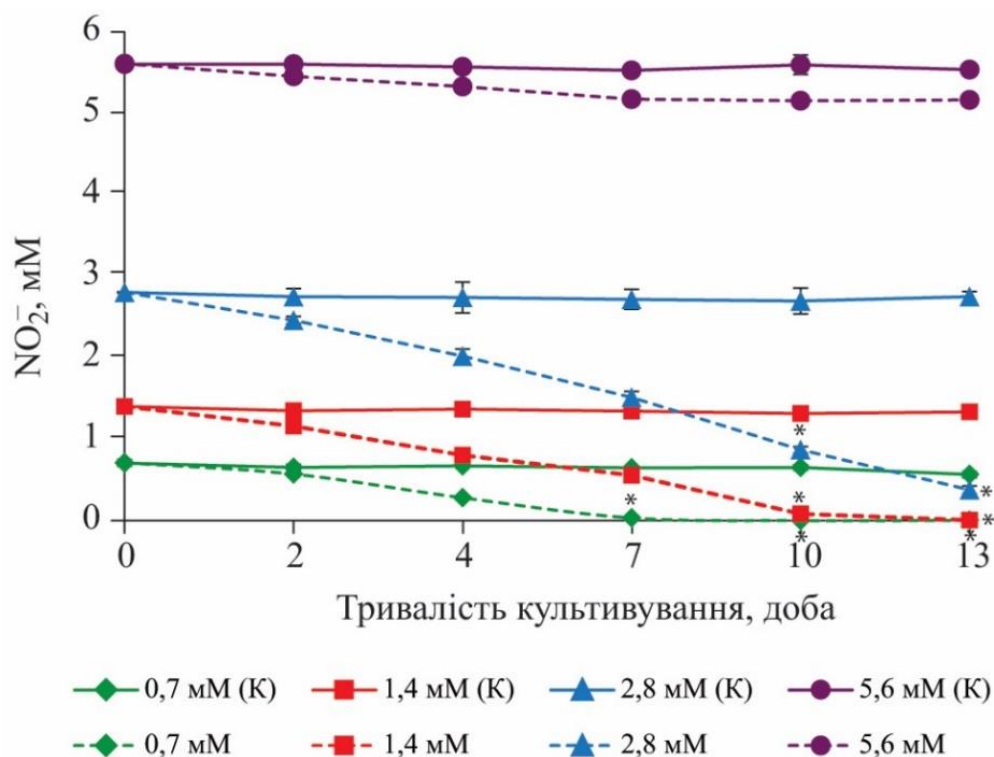


Рис. 3.16 – Використання NO_2^- бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за росту в середовищі з різним вмістом NaNO_2 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$). Контроль – середовище без клітин з 0,7 мМ NO_2^- ; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 окиснювали нітрит-іони упродовж 13 діб культивування за початкової концентрації останніх у середовищі 2,8 мМ. Досліджувані мікроорганізми використали 86,13 % нітрит-іонів на 13-ту добу культивування (див. рис. 3.16). За більших концентрацій у середовищі бактерії використовують нітрит-іони дуже повільно. Зокрема, за концентрації 5,6 мМ *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використали тільки 6,7 % нітрит-іонів (див. рис. 3.16). Ймовірно, сповільнення окиснення бактеріями нітрит-іонів за високих концентрацій у середовищі відбувається внаслідок пригнічення в них фотосинтетичних і ростових процесів, що відображається під час нагромадження біомаси (див. рис. 3.15). Припускаємо, що *R. yavorovii* ІМВ В-7620, так як і *Thiocapsa* sp. штам KS1 та *Rhodospseudomonas* sp. штам LQ17 (Schott et al., 2010;

Ненр et al., 2016), використовують нітрит-іони як донори електронів аноксигенного фотосинтезу.

Упродовж тринадцяти діб культивування у результаті окиснення нітрит-іонів за їхньої вихідної концентрації 0,7; 1,4; 2,8; 5,6 мМ у середовищі на десяту добу культивування нагромаджувалися нітрат-іони, концентрація яких була, відповідно, 0,19; 0,64; 0,84; 0,03 мМ (рис. 3.17).

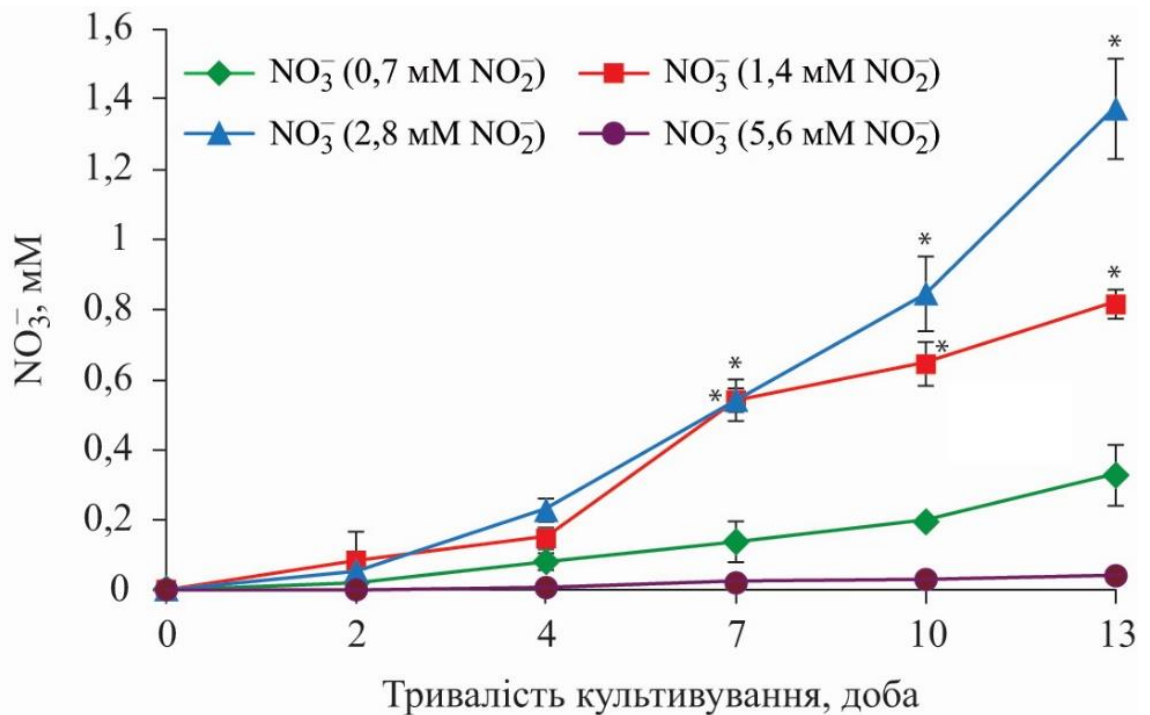


Рис. 3.17 – Утворення нітрат-іонів бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищах із різним вмістом NaNO₂ (x±SD, n=3). Контроль – вміст нітрат-іонів у середовищі з 0,7 мМ NO₂⁻; * – вірогідні зміни порівняно з контролем (p≤0,05)

Нітрит-іони бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 окиснювали до нітрат-іонів лише за освітлення й анаеробних умов росту. У середовищі без клітин (контроль) не відбувалось окиснення нітрит-іонів до нітрат-іонів за умов освітлення. За аеробних хемотрофних умов росту окиснення нітрит-іонів бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 не було.

Дослідження росту бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 у середовищах із натрій нітритом за внесення натрій молібдату і без його внесення проведено для того, щоб з'ясувати, чи бере молібден участь у процесі окиснення нітрит-іонів, оскільки всі нітратредуктази, що каталізують відновлення йонів нітрату до нітриту, мають молібденовмісний кофактор (Stolz & Basu, 2002). Встановлено, що бактерії нагромаджують біомасу й окиснюють нітрит-іони лише за внесення молібдену в середовище культивування. Тому припускаємо, що фермент, який каталізує окиснення нітритів у бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620, містить молібдоптериновий кофактор.

Оскільки фіксація молекулярного азоту є дуже поширеним процесом серед більшості фототрофних бактерій (George et al., 2020), перевірили здатність *R. yavorovii* IMB B-7620 до азотофіксації. У разі культивування в модифікованому живильному середовищі ATCC № 1449 без додавання амоній хлориду як джерела Нітрогену бактерії нагромаджують біомасу 0,72 г/л на 16-ту добу культивування (рис. 3.18).

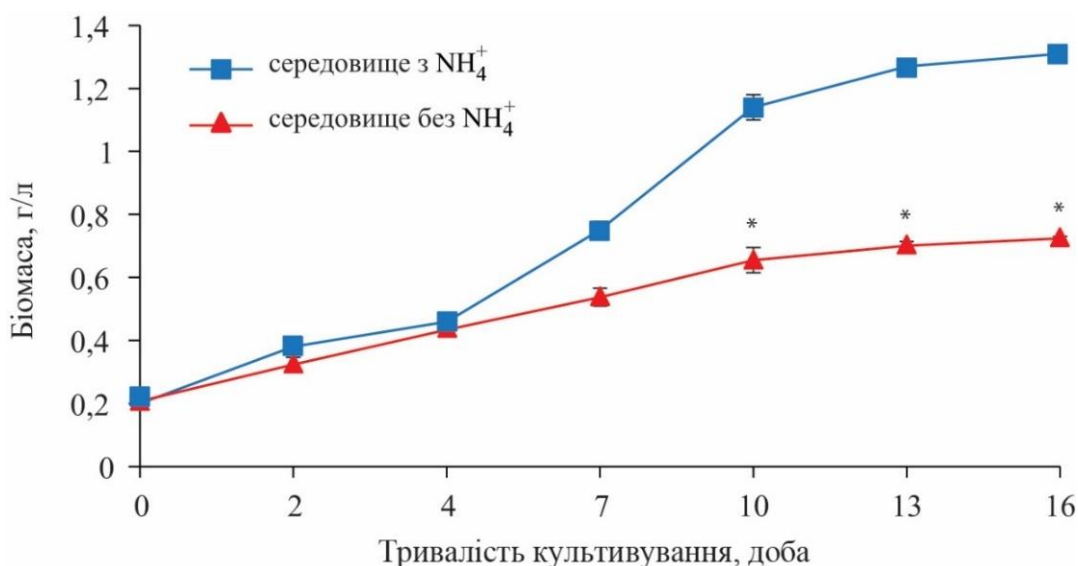


Рис. 3.18 – Біомаса пурпурових несіркових бактерій *Rhodospseudomonas yavorovii* IMB B-7620 за росту в модифікованому середовищі ATCC № 1449 без додавання NH₄Cl. Контроль – біомаса бактерій у модифікованому середовищі ATCC № 1449 з NH₄Cl ($\bar{x} \pm SD$, n=3); * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Очевидно, що *R. yavorovii* ІМВ В-7620 здатні до азотофіксації, так як і *R. palustris*, *R. rhenobacensis*, *R. cryptolactis* (Brenner et al., 2005). Зниження вмісту азоту у складі газової фази також свідчить про азотофіксувальну здатність досліджуваних мікроорганізмів (рис. 3. 22; 3.23).

Отже, досліджувані мікроорганізми здатні використовувати сульфат-іони як джерело Сульфуру за фототрофного росту. Зниження вмісту сульфід- і тіосульфат-іонів та нагромадження сульфат-іонів у середовищі культивування свідчить, що досліджувані мікроорганізми здатні використовувати останні як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу. У середовищі з 1,4 мМ сульфід-іонів *R. yavorovii* ІМВ В-7620 знижують їхній вміст на 97,4 %. У результаті окиснення бактеріями гідроген сульфід у елементарна сірка є проміжним метаболітом. Під час росту досліджуваних мікроорганізмів у середовищі з 1,4 мМ тіосульфат-іонів відбувалося зниження їхнього вмісту на 68,8 %.

Крім того, встановлено закономірності використання нітрит-іонів як донорів електронів бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 за анаеробних фототрофних умов культивування під час аноксигенного фотосинтезу. Оптимальна концентрація нітрит-іонів для пурпурових сіркових бактерій *Thiocapsa* sp. strain KS1 становить 1-2 мМ, а для пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. штам LQ17 – 1 мМ (Schott et al., 2010; Nemp et al., 2016). Для *R. yavorovii* ІМВ В-7620 оптимальна концентрація нітрит-іонів – 2,8 мМ у модельному середовищі, що є більшою, порівняно з вищезгаданими штамми. *R. yavorovii* ІМВ В-7620, на відміну від *Rhodopseudomonas* sp. штам LQ17, витримують і окиснюють утричі вищу концентрацію сульфід-іонів.

Таким чином, встановлені нами закономірності використання сульфід-, тіосульфат-, нітрит-іонів *R. yavorovii* ІМВ В-7620 як донорів електронів аноксигенного фотосинтезу за анаеробних фототрофних умов культивування доповнюють і розширюють розуміння ролі окиснення сполук Сульфуру та Нітрогену в екосистемах за участю ПНСБ.

3.4 Продукування водню бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Ефективність перетворення енергії світла й оптимальне джерело Карбону є ключовими факторами для отримання водню в біологічних системах (Basak & Das, 2007; Brar et al., 2020).

ПНСБ здійснюють фотоферментацію органічних кислот як джерел Карбону та донорів електронів, використовуючи світло як джерело енергії (Basak & Das, 2007; Adessi et al., 2021). Тому перевіряли здатність досліджуваних мікроорганізмів продукувати водень у модифікованому середовищі АТСС № 1449 без внесення $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ за наявності натрій ацетату і малату в концентрації 12 мМ.

Спершу за допомогою ВЕРХ визначили особливості використання натрій ацетату і малату як джерел Карбону та донорів електронів. Аналіз культуральної рідини на вміст органічних кислот проводили до початку культивування та на 3-тю, 7-му, 10-ту і 14-ту доби культивування бактерій. У середовищі перед початком культивування бактерій було $0,81 \pm 0,04$ г/л ацетату і $1,03 \pm 0,01$ г/л малату. Хроматографічний аналіз культуральної рідини після вирощування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищі з ацетатом показав, що бактерії повністю його використовують на 14-ту добу культивування. За цих умов росту мікроорганізми нагромаджують у незначних кількостях сукцинат зі супутнім використанням останнього (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Використання ацетату бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, n=3)

Доба	Натрій ацетат, г/л		Продукти ферментації натрій ацетату, г/л	
	До культивування	Після культивування		
1	2	3	4	5
0	$0,81 \pm 0,04$			

Закінчення табл. 3.4

1	2	3	4	5
3	0,85±0,01	0,51±0,02	Сукцинат	0,08±0,02
7	0,82±0,03	0,27±0,05	Лактат Сукцинат	0,02±0,01 0,07±0,04
10	0,79±0,05	0,19±0,03	Сукцинат	0,05 ±0,02
14	0,81±0,02	0	Сукцинат	0,03 ±0,01

За внесення у середовище культивування малату виявлено зменшення його концентрації у культуральній рідині з $1,03 \pm 0,01$ до $0,02 \pm 0,02$ г/л на нульову та 14-ту доби культивування, відповідно (табл. 3.5). За цих умов проміжними продуктами метаболізму був невеликий вміст фумарату на 7-му добу культивування й ізоцитрату на 10-ту добу культивування. На 14-ту добу культивування у культуральній рідині виявили невеликий вміст сукцинату (див. табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Використання малату бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 ($x \pm SD$, $n=3$)

Доба	Малат, г/л		Продукти ферментації малату, г/л	
	до культивування	після культивування		
0	$1,03 \pm 0,01$			
3	$1,02 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,04$	Оцтова кислота	$0,02 \pm 0,01$
7	$1,00 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,04$	Фумарат	$0,004 \pm 0,0001$
10	$0,99 \pm 0,06$	$0,03 \pm 0,01$	Ізоцитрат	$0,51 \pm 0,01$
14	$0,98 \pm 0,07$	$0,02 \pm 0,02$	Сукцинат	$0,05 \pm 0,03$

R. yavorovii ІМВ В-7620 під час росту в середовищі з натрій ацетатом за концентрації 12 мМ не продукували молекулярного водню (рис. 3.19).

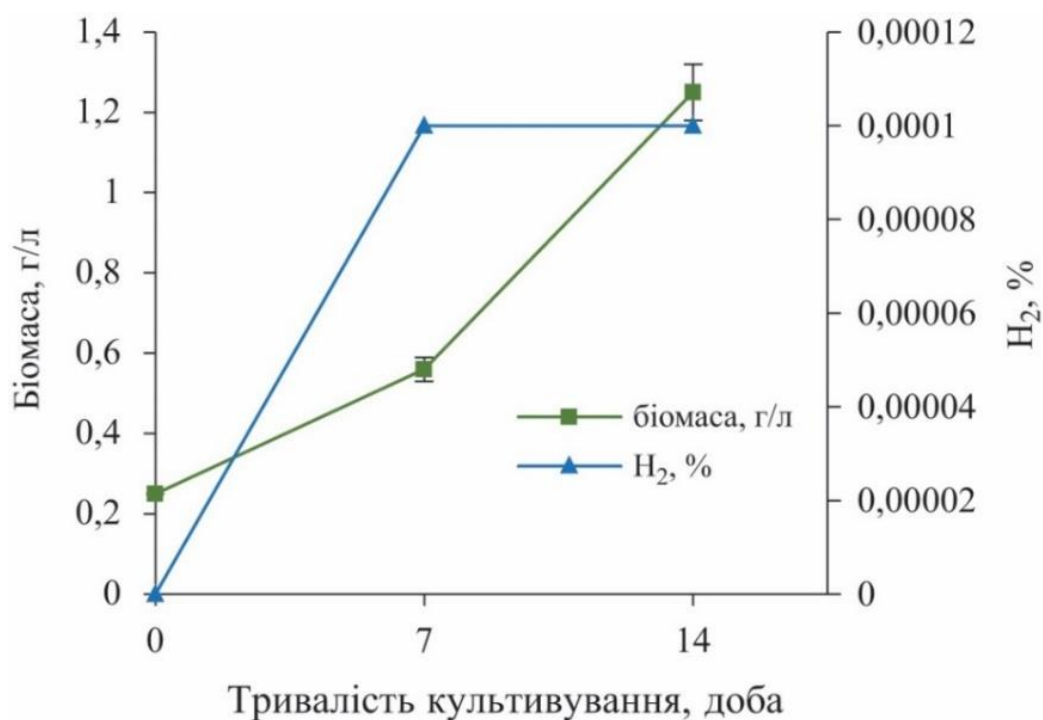


Рис. 3.19 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 та вміст H₂ у складі газової фази за внесення у середовище культивування 12 мМ натрій ацетату ($\bar{x} \pm SD$, n=3)

За внесення в середовище культивування малату за концентрації 12 мМ упродовж 14-ти діб культивування відбувалося збільшення концентрації водню зі супутнім нагромадженням біомаси досліджуваними мікроорганізмами (рис 3. 20) . За росту бактерій у середовищі, де вміст малату був 12 мМ, бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 нагромаджують біомасу в 1,5 раза більшу, ніж за росту в середовищі з натрій ацетатом (див. рис. 3.19, 3.20). На сьому та чотирнадцяту доби культивування в середовищі з малатом (12 мМ) концентрація водню становила 0,15 та 1,5 %, відповідно (рис. 3.20).

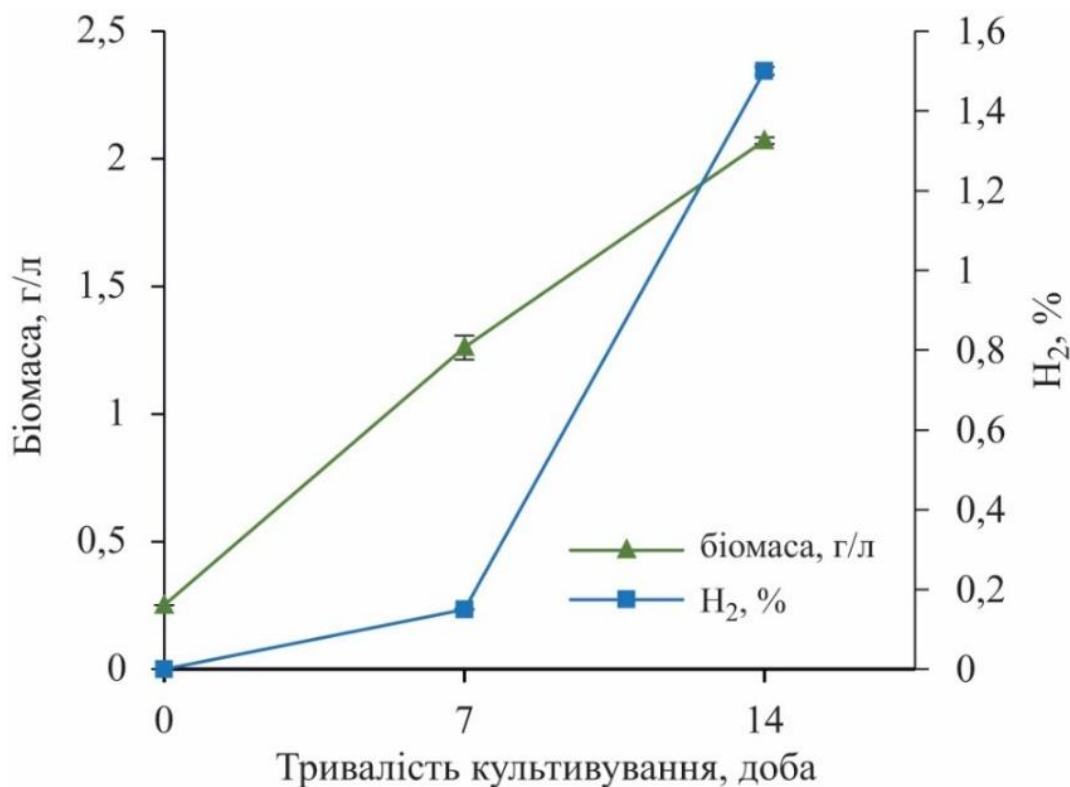


Рис. 3.20 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 та вміст H₂ у складі газової фази за внесення у середовище культивування 12 мМ малату ($x \pm SD$, $n=3$)

Збільшення концентрації субстрату (малату) до 36 мМ спричиняло збільшення продукування водню (7,64 %) та нагромадження біомаси *R. yavorovii* ІМВ В-7620 на чотирнадцяту добу культивування (табл. 3.6). Збільшення концентрації натрій ацетату до 36 мМ не призводило до продукування водню досліджуваними мікроорганізмами (див. табл. 3.7). За росту бактерій у середовищі, де вміст малату був 36 мМ, бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 нагромаджують біомасу в 1,6 раза більшу, ніж за росту в середовищі з натрій ацетатом (див. табл. 3.6).

Досліджено кінетику росту бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620, що продукують водень, у середовищах з іншими джерелами Карбону та донорами електронів (глюкоза, крохмаль, натрій цитрат і сукцинат (36 мМ)). За росту в середовищах з натрій цитратом і крохмалем бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 нагромаджують

біомасу 2,06 та 1,04 г/л, відповідно, на чотирнадцяту добу культивування. За росту в середовищах зі сукцинатом і глюкозою спостерігали незначне нагромадження біомаси (див. табл. 3.6). За фотоферментації крохмалю (високомолекулярного субстрату) і малату концентрація водню у складі газової фази на чотирнадцяту добу культивування становила 13,87 і 7,64 %, відповідно (див. табл. 3.6).

Таблиця 3.6 – Продукування водню бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за використання різних джерел Карбону та донорів електронів ($x \pm SD$, $n=3$)

Джерело Карбону (36 мМ)		Ацетат натрію	Малат	Сукцинат	Глюкоза	Крохмаль	Натрій цитрат	
Біомаса, г/л	Тривалість культивування, доби	7	0,77±0,03	1,12±0,03	0,44±0,02	0,70±0,08	1,06±0,08	0,96±0,02
		14	1,59±0,07	2,6±0,04	0,66±0,03	0,80±0,03	1,04±0,01	2,06±0,02
H ₂ , %		7	0,001±0,0001	2,15±0,03	0,008±0,0001	3,31±0,01	10,10±0,01	6,02±0,01
		14	0	7,64±0,04	0,002±0,0001	1,92±0,01	13,87±0,06	21,26±0,08
рН		7	7,01	6,22±0,01	5,31±0,01	4,68±0,04	5,1±0,03	6,91±0,02
		14	7,6	5,87±0,01	5,28±0,02	4,53±0,03	4,97±0,04	6,68±0,03
Еh, мВ		7	+39	+127±0,07	+263±0,05	+240±0,04	-160±0,03	-79±0,05
		14	+68	+173±0,08	+250±0,06	+230±0,09	+340±0,06	+230±0,04

рН середовища є одним із важливих факторів, що впливають на клітинний метаболізм, ферментативну активність і ріст клітин мікроорганізмів (Baker et al., 1982). У разі використання середовищ із різними органічними кислотами ми зіткнулися з проблемою значного зниження рН до 4,53 (див. табл. 3.6). Очевидно, багато органічних кислот є побічними продуктами метаболізму за використання мікроорганізмами глюкози та крохмалю, що призвело до значного зниження рН і, зрештою, до дисбалансу між виробничим рівнем і рівнем споживання летких

жирних кислот. Проте за росту бактерій у середовищі з натрій цитратом рН коливалось у межах 6,91–6,68 (див. табл. 3.6).

Процес окиснення органічних сполук супроводжується утворенням водню. Максимальну концентрацію водню у складі газової фази (21,26 %) визначили на чотирнадцяту добу культивування в середовищі з натрій цитратом (36 мМ) (див. табл. 3.6).

Тому натрій цитрат було обрано для подальших досліджень продукування водню досліджуваними мікроорганізмами за його вищих концентрацій у середовищі.

Вихід водню у процесі фотоферментації за участю пурпурових бактерій залежить від багатьох факторів, зокрема, значно знижують вихід водню мала інтенсивність світла, надмірна або замала концентрація субстрату, наявність іонів амонію (Basak & Das, 2007; Adessi et al., 2021).

Дослідили вплив натрій цитрату за різних концентрацій (60; 90 мМ) у середовищі з NH_4^+ на нагромадження біомаси бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 і продукування ними водню.

На чотирнадцяту добу культивування у середовищі з натрій цитратом за концентрацій 60 і 90 мМ та NH_4^+ бактерії нагромаджують біомасу 3,98 та 3,66 г/л, відповідно (див. рис. 3.21).

За росту бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищах з 60 та 90 мМ натрій цитрату і з NH_4^+ редокс-потенціал на третю, сьому, десяту і чотирнадцяту доби знижувався до -98; -105; -198; -153 та -79; -98; -179; -146, відповідно. Низьке значення E_h є необхідною умовою для росту анаеробних воденьутворювальних бактерій, оптимальний діапазон для яких становить -150...-340 мВ (Prytula & Tashyrev, 2013). Значення рН на третю, сьому, десяту і чотирнадцяту доби становило: у середовищі з 60 мМ натрій цитрату і з NH_4^+ , відповідно, 6,90; 6,99; 7,01; 6,99, а у середовищі з 90 мМ натрій цитрату і з NH_4^+ , відповідно, 7,0; 7,02; 6,99; 7,01.

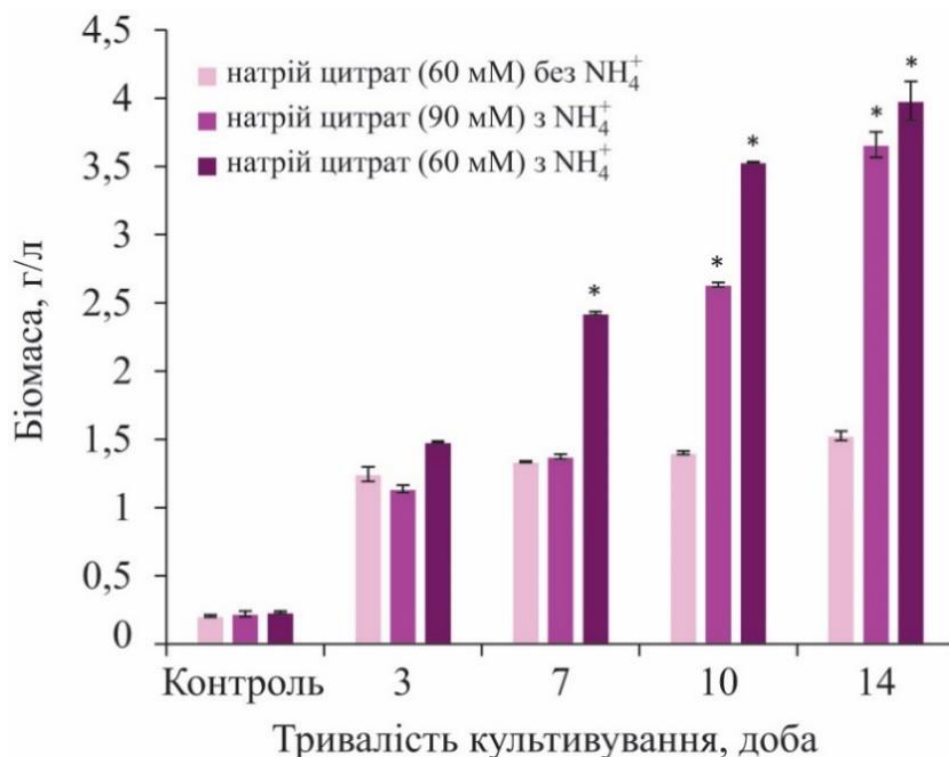


Рис. 3.21 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищі з різним вмістом натрій цитрату і NH₄⁺ та у середовищі з 60 мМ натрій цитратом без NH₄⁺. Контроль – біомаса клітин до початку культивування (x±SD, n=3); * – вірогідні зміни порівняно з контролем (p≤0,05)

Спостерігали значне зниження вмісту O₂ у складі газової фази за росту бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищах із натрій цитратом за концентрацій 60 і 90 мМ і з NH₄⁺. На третю добу культивування концентрація O₂ знижувалася з 21 % до 4,11 та 3,94 %, відповідно (рис. 3.22, 3.23). На сьому добу культивування O₂ у середовищах із різним вмістом натрій цитрату виявлено не було (див. рис. 3.22, 3.23). Максимальний вміст H₂ за росту бактерій у середовищі з натрій цитратом за концентрації 60 мМ і з NH₄⁺ на сьому добу культивування становила 27,83 % (див. рис. 3.22) та 35,69 % за росту в середовищі з натрій цитратом за концентрації 90 мМ і з NH₄⁺ на десяту добу культивування (див. рис. 3.23).

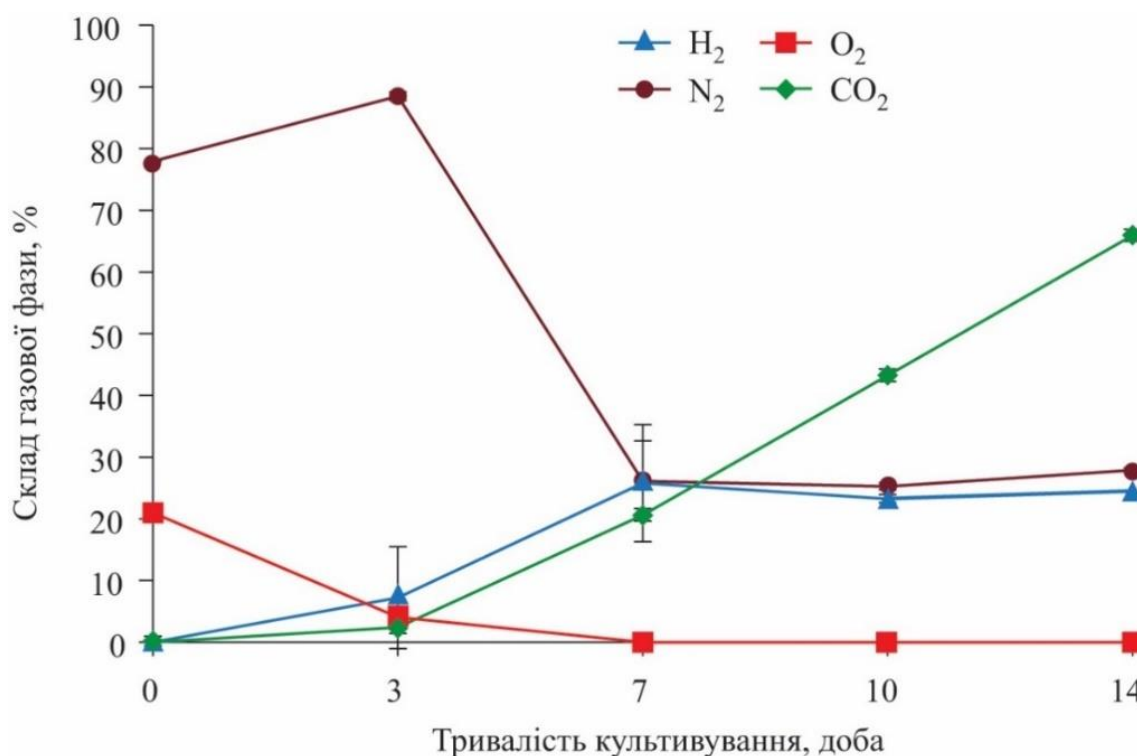


Рис. 3.22 – Склад газової фази за фотоферментації бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 натрій цитрату за концентрації 60 мМ у середовищі з NH₄⁺ (x±SD, n=3)

За росту в середовищах з 60 та 90 мМ натрій цитрату і NH₄⁺ на третю добу не спостерігали утворення залишкового об'єму газу (рис. 3.24). Утворення газу фіксували на сьому добу культивування *R. yavorovii* ІМВ В-7620, об'єм синтезованого газу на сьому добу становив 8,14 мл у середовищі з 90 мМ натрій цитрату та NH₄⁺ і 7,96 мл у середовищі з 60 мМ натрій цитрату та NH₄⁺ (див. рис. 3.24).

Максимальний об'єм утвореного газу становив 7,37 і 10,61 мл на десяту добу культивування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 (див. рис. 3.24) у середовищах з 60 та 90 мМ натрій цитрату і NH₄⁺, відповідно.

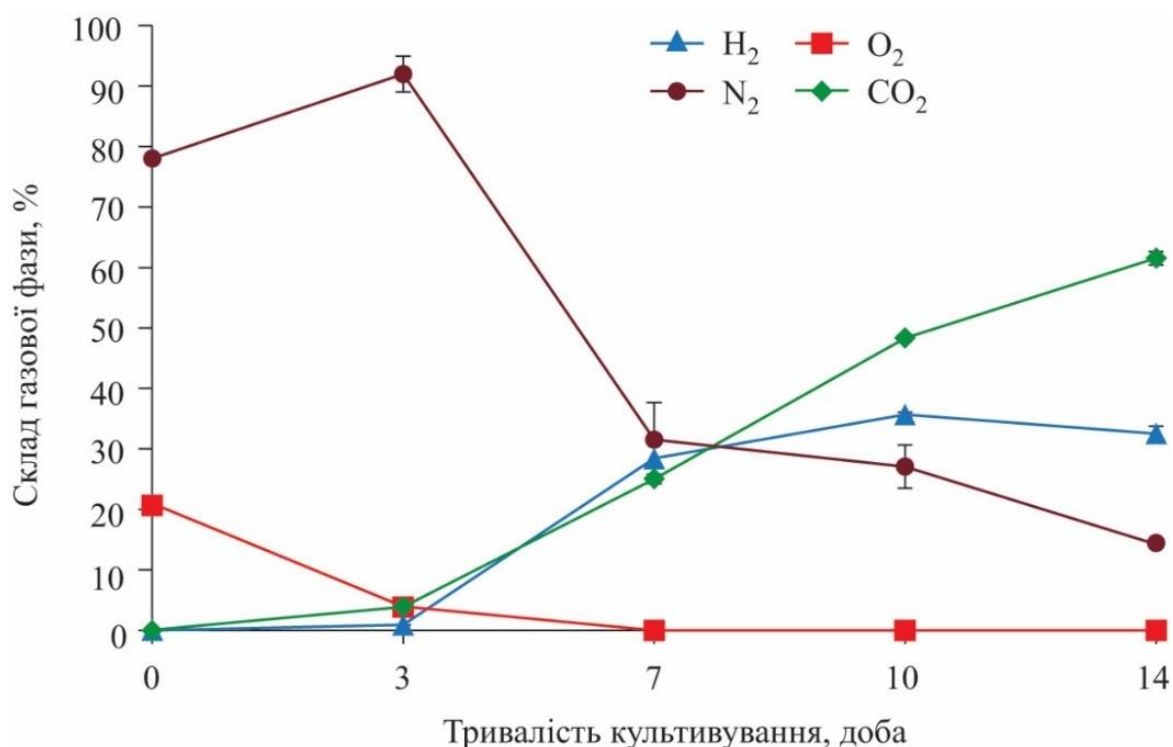


Рис. 3.23 – Склад газової фази за фотоферментації бактеріями *Rhodospirillum rubrum* IMB V-7620 натрій цитрату за концентрації 90 мМ у середовищі з NH₄⁺ ($\bar{x} \pm SD$, n=3)

Визначення мас-балансу фотоферментації натрій цитрату дає змогу розраховувати вихід H₂. Сумарний об'єм водню за росту досліджуваних мікроорганізмів у середовищі з 90 мМ натрій цитрату та NH₄⁺ становив 25,54 мл H₂ і виявився у 1,5 раза більшим від об'єму утвореного H₂ за росту бактерій у середовищі з 60 мМ натрій цитрату з NH₄⁺ (див. рис. 3.24). Отже, максимальний вихід водню спостерігали за росту *R. yavorovii* IMB V-7620 у разі додавання натрій цитрату за концентрації 90 мМ та NH₄⁺ у середовище культивування (див. рис. 3.24).

Біологічна фіксація Нітрогену є одним із основних шляхів продукування водню пурпуровими фотосинтезувальними бактеріями, в яких нітрогеназа каталізує відновлення азоту до аміаку зі супутнім утворенням водню. Проте це досить неефективний процес, оскільки близько 75 % відновника, окисненого нітрогеназою, використовується для утворення аміаку.

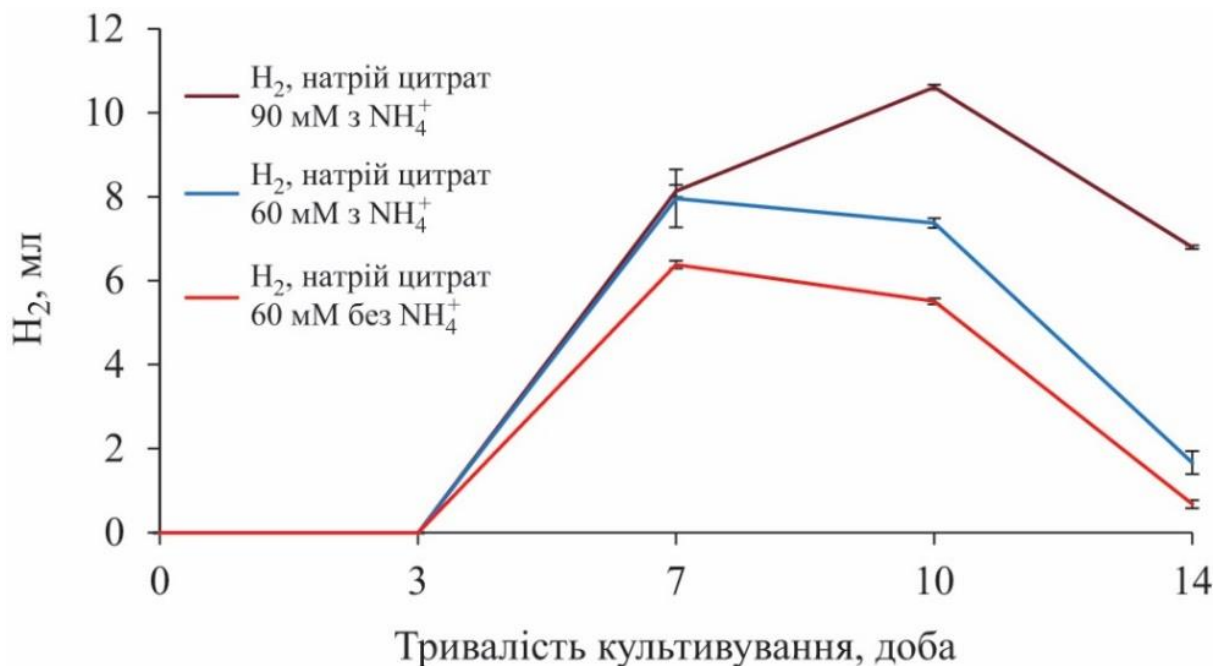


Рис. 3.24 – Утворення водню під час фотоферментації бактеріями *Rhodospseudomonas yavorovii* IMB B-7620 60 і 90 мМ натрій цитрату в середовищі з NH₄⁺ та 60 мМ натрій цитрату у середовищі без NH₄⁺ (x±SD, n=3)

Однак у бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 продукування біогазу не залежить від фіксації азоту. *R. yavorovii* IMB B-7620, як і мутанти *Rhodospseudomonas palustris* (Oda et al., 2003; Rey, Heiniger, & Harwood, 2007), здатні продукувати водень конститутивно, навіть за наявності NH₄⁺ у середовищі культивування. Варто відзначити, що клітини дикого типу *Rhodospseudomonas palustris* не продукують водень за наявності аміаку (Oda et al., 2003; Rey et al., 2007). За росту в середовищі з 60 мМ натрій цитрату без NH₄⁺ (див. рис. 3.24) бактерії *R. yavorovii* IMB B-7620 продукували в 1,4 раза менше водню, порівняно зі середовищем з 60 мМ натрій цитрату та NH₄⁺ (див. рис. 3.24). Біомаса бактерій під час культивування у середовищі з 60 мМ натрій цитрату без NH₄⁺ становила 1,52 г/л на чотирнадцяту добу культивування і виявилась у 2,6 раза меншою, ніж у середовищі культивування з 60 мМ натрій цитрату і NH₄⁺ (див. рис. 3.21).

Отже, збільшення концентрації субстрату, зокрема, натрій цитрату, до 90 мМ призводило до незначного зниження нагромадження біомаси та збільшення продукування водню бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620.

Різні види мікроорганізмів демонструють значні відмінності в утилізації органічних субстратів порівняно з *R. yavorovii* ІМВ В-7620. Наприклад, високий вихід водню спостерігали у *Rhodospirillum rubrum* (Tanisho, 1996) та *Rhodobacter* sp. штаб ККУ-PS1 (Assawamongkholisiri & Reungsang, 2015) (табл. 2, Додаток В). *R. yavorovii* ІМВ В-7620, як і *Rhodopseudomonas* sp. (Singh et al., 1994), *Rhodopseudomonas capsulatus* (Fascetti et al., 1998), *Rhodobacter sphaeroides* (Fascetti et al., 1998), фотоферментують органічні субстрати зі супутнім нагромадженням водню та біомаси (див. табл. 2, Додаток В).

Виділення та вивчення типових штамів H_2 -утворювальних фототрофних бактерій є необхідним для спрямованої регуляції утворення H_2 у технологічних процесах за комбінації нефотосинтезувальних і фотосинтезувальних бактерій у гібридній системі, що може збільшити вихід водню (Basak & Das, 2007).

Оскільки ПНСБ здійснюють фотоферментацію органічних кислот як джерел Карбону та донорів електронів, зокрема, натрій ацетату, малату, сукцинату, глюкози, крохмалю, натрій цитрату (див. табл. 3.6), то метою подальших досліджень стала перевірка здатності *R. yavorovii* ІМВ В-7620 до росту, продукування водню та генерування електричного струму за використання комплексу органічних і неорганічних забруднювачів, наявних у стічних водах, з одночасним очищенням їх.

3.5 Біоремедіація стічних вод за використання фототрофних несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Забруднення ґрунтів і підземних вод відходами вже давно є серйозною проблемою для охорони навколишнього середовища та громадського здоров'я. Очищення довкілля від забруднювачів біологічними методами за використання

метаболической активности микроорганизмов является эффективной, экономичной, рентабельной та универсальной альтернативой физико-химическим методам.

Відомо, що очищення стічних вод є можливим за участі фототрофних бактерій (Frigaard, 2016; Costa et al., 2017; Merugu et al., 2014; Merugu et al., 2017; Yang et al., 2019). Види ПНСБ, що належать до родів *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*, мінералізують органічні відходи (Merugu et al., 2014). Використання промислових, сільськогосподарських і комунальних відходів для отримання біомаси ПНСБ є економічно вигідним (Chandaravithoon et al., 2018). Досліджено вплив стічної води дріжджового заводу та води фільтрату відстійника № 3 Львівського полігону твердих побутових відходів (ЛПТПВ) на нагромадження біомаси ПНСБ *R. yavorovii* ІМВ В-7620 та зміни складу цих вод у процесі культивування названих бактерій.

Стічні води дріжджового заводу (табл. 3.7) та фільтрату відстійника № 3 ЛПТПВ (табл. 3.8) характеризуються значним вмістом загального феруму, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , HS^- , що в десятки і навіть у тисячі разів перевищують ГДК. Це може бути однією з причин, чому саме *R. yavorovii* ІМВ В-7620 не росли на цих стічних водах без розведення.

Для дослідження нагромадження біомаси *R. yavorovii* ІМВ В-7620 забруднені води дріжджового заводу та фільтрату відстійника ЛПТПВ № 3 розводили у 10, 30, 50, 100 разів. Найбільшу біомасу бактерії нагромаджують під час росту в стічній воді дріжджового заводу, розведеної у 10 разів. До чотирнадцятої доби культивування біомаса бактерій становила 2,2 г/л та в подальшому залишалася незмінною. Збільшення розведення стічної води до 30; 50 і 100 разів зумовлювало зниження нагромадження біомаси бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 на 30,5; 29,6; 69,1 %, відповідно на двадцять першу добу культивування (рис. 3.25; 3.26).

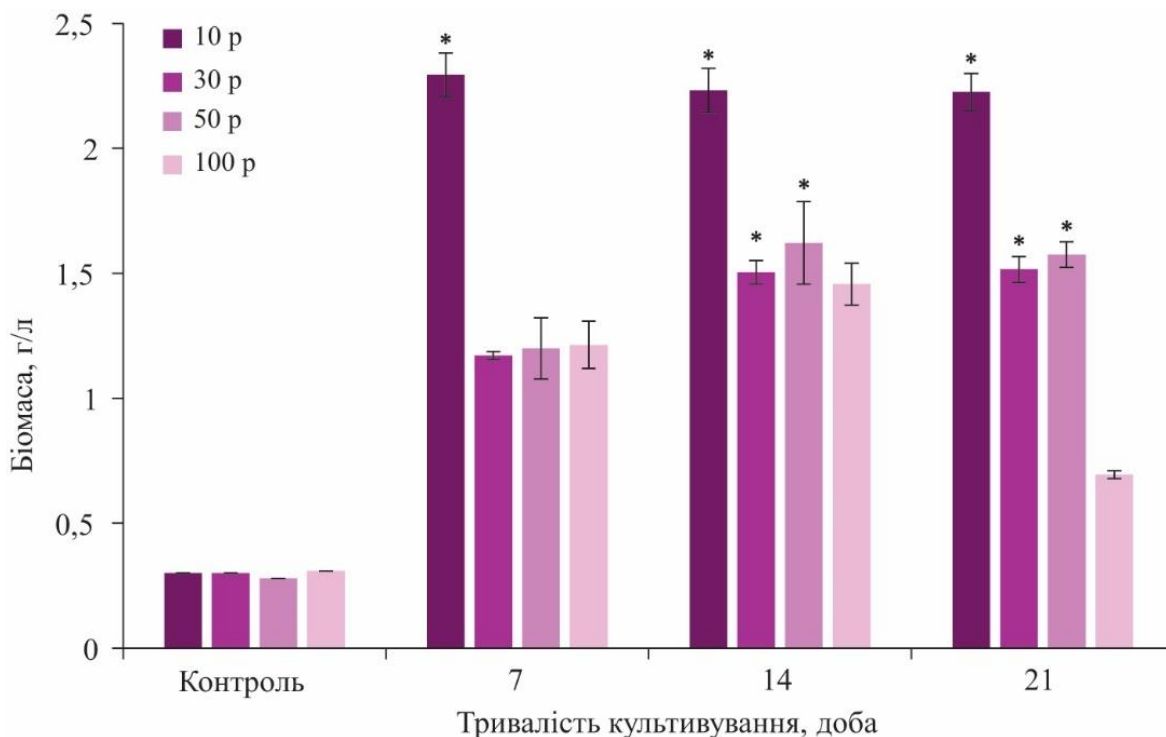


Рис. 3.25 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 під час росту у стічній воді дріжджового заводу. Контроль – біомаса клітин до початку культивування ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$); * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

На чотирнадцяту добу культивування бактерій у воді фільтрату відстійника № 3 ЛПТПВ, розведеної у 10 разів, біомаса *R. yavorovii* ІМВ В-7620 сягала 1,1 г/л і була на 26,4 % більшою, ніж біомаса бактерій, культивованих у цій воді, яку розвели у 30 разів (рис. 3.26). Збільшення розведення води до 50 і 100 разів спричиняло зниження нагромадження біомаси досліджуваними мікроорганізмами (див. рис. 3.26).

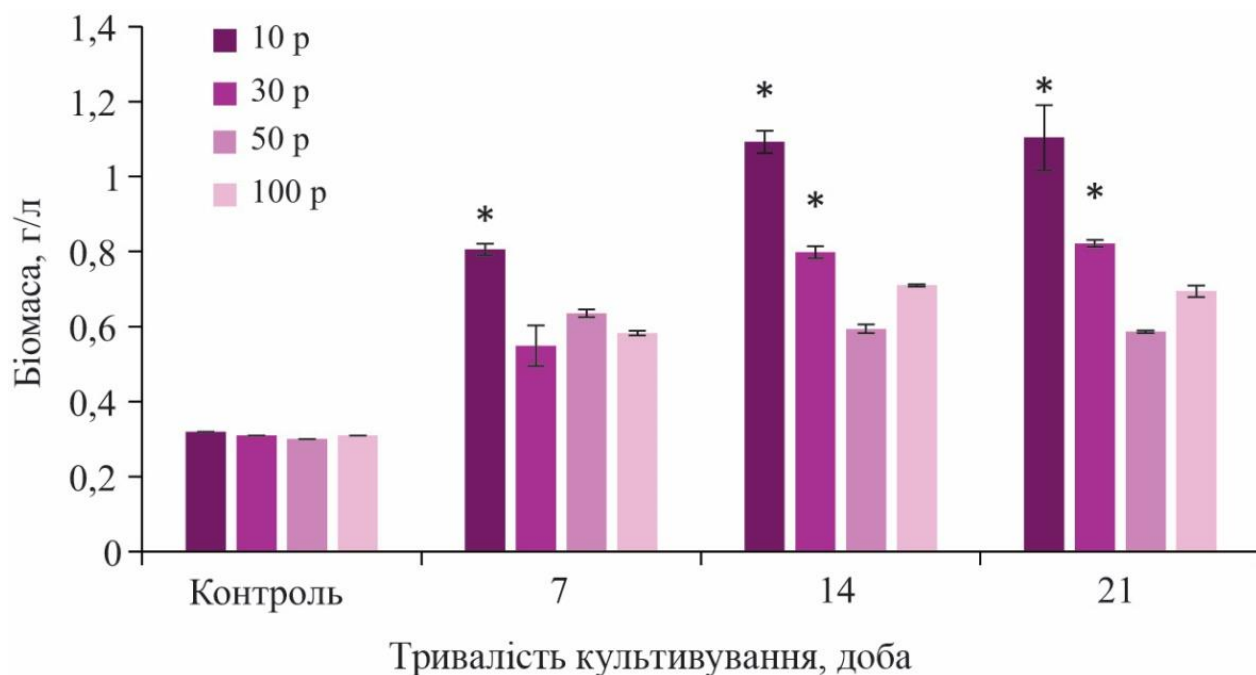


Рис. 3.26 – Нагромадження біомаси бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за росту у воді фільтрату відстійника № 3 Львівського полігону твердих побутових відходів. Контроль – біомаса клітин до початку культивування ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$); * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Отже, бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 найкраще нагромаджували біомасу в досліджених стічних водах, розведених у 10 разів.

Значення рН води залежить від багатьох факторів, насамперед від вмісту в ній органічних речовин (Зеркалов, 2007). Для більшості мешканців водних екосистем оптимальне значення рН не повинно значно відхилятися від нейтрального. Розведена стічна вода дріжджового заводу (контроль) мала рН 7,0, що перебуває в межах норми (табл. 3.7). На двадцять першу добу культивування бактерій у стічній воді рН зросло до 8,0. Культивування бактерій у цій воді спричиняло зменшення вмісту Ca^{2+} та Mg^{2+} упродовж двадцять першої доби (див. табл. 3.7). Mg^{2+} *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовували більш інтенсивно, можливо, через те, що він входить до складу пігментів фототрофних бактерій (Гудзь та ін., 2011).

Різні сполуки нітрогену можуть трансформуватися з однієї форми в іншу, головню, у процесі життєдіяльності живих організмів. Високий вміст нітрогену призводить до евтрофікації водних екосистем. Під час культивування бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у стічній воді дріжджового заводу вміст нітрит- і нітрат-іонів знижувався на 52,7 і 52,7 %, відповідно, на двадцять першу добу. Спостерігали також зниження вмісту сульфат-іонів на 67,0 %. Крім того, на двадцять першу добу культивування бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 вміст Cl^- зменшився на 40,1 % (див. табл. 3.7).

Бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовують гідросульфід-іони як донори електронів аноксигенного фотосинтезу. Концентрація гідросульфід-іонів знизилася на 94,7 % за росту досліджуваних мікроорганізмів у стічній воді дріжджового заводу (див. табл. 3.7).

Органічне забруднення води є особливо небезпечним. Органічні речовини, які осідають на дно, вбивають донні мікроорганізми, що беруть участь у процесі самоочищення. У подальшому відбувається загибель фіто- і зоопланктону, виділяються шкідливі сполуки, у т. ч. сірководень, які отруюють усе живе. Різке зростання хімічного споживання кисню (ХСК) води свідчить про її забруднення і потребує застосування відповідних заходів для очищення (Зеркалов, 2007; Kurwadkar, 2019; Yang et al., 2019; Копанчук, 2020; Li et al., 2021). За значеннями ХСК розведеної стічної води дріжджового заводу перед і після культивування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 визначено, що ефективність окиснення органічних сполук у ній бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 становила 42,3 % на двадцять першу добу (див. табл. 3.7).

Таблиця 3.7 – Зміни хімічного складу стічної води дріжджового заводу під час культивування *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Показник	Вміст, мг/л				
	ГДК**	Контроль	Контроль + <i>R. yavorovii</i> ІМВ В-7620		
			Час культивування, доба		
			7	14	21
pH	6,5-9,0	7,00±0,10	7,30±0,01	7,70±0,01	8,00±0,02
Fe заг.	0,5	67,0±0,05	52,0±0,01	37,20±0,02	14,20±0,04*
Ca ²⁺	46,0	6012,0±0,04	5980,0±0,01	5210,40±0,06	5020,80±0,03
Mg ²⁺	50,0	7291,20±0,04	4131,70±0,05*	1944,30±0,04*	243,0±0,02*
NO ₃ ⁻	12,5	2711,30±0,04	1484,60±0,05*	1345,20±0,03*	1282,50±0,04*
NO ₂ ⁻	1,5	2011,60±0,05	1101,50±0,01*	998,10±0,02*	951,50±0,02*
SO ₄ ²⁻	500,0	3334,20±0,02	1927,90±0,04*	1570,40±0,03*	1100,10±0,03*
Cl ⁻	300,0	10344,80±0,01	8620,70±0,03	6896,50±0,04	6200,0±0,04
HS ⁻	1,0	21473,30±0,02	12266,30±0,02*	2851,90±0,05*	1138,80±0,03*
ХСК	500,0	5200,0±0,03	4000,0±0,02	3800,0±0,01*	3000,0±0,01

Примітки: $x \pm SD$, $n=3$; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$); контроль – розведена у 10 разів стічна вода; ** – <https://omr.gov.ua/ua/projects/3776>

Під час культивування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у воді фільтрату відстійника № 3 ЛПТПВ, розведеної у 10 разів, біомаса бактерій становила 1,1 г/л на двадцять першу добу культивування (див. рис. 3.26). Показник pH змінювався від 7,00 до 6,50 (табл. 3.8). У процесі життєдіяльності мікроорганізмів відбувалося зниження вмісту загального Fe, Ca²⁺, Mg²⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, HS⁻ у воді фільтрату на 100,0; 97,1; 99,7; 100,0; 100,0; 99,8; 98,1 %, відповідно (див. табл. 3.8), на двадцять першу добу культивування. Ефективність окиснення органічних сполук розведеної води фільтрату відстійника № 3 ЛПТПВ становила 65,6 % на двадцять першу добу культивування (див. табл. 3.8).

Таблиця 3.8 – Зміни хімічного складу фільтрату відстійника № 3 Львівського полігону твердих побутових відходів під час культивування бактерій

Rhodopseudomonas yavorovii ІМВ В-7620

Показник	Вміст, мг/л				
	ГДК**	Контроль	Контроль + <i>R. yavorovii</i> ІМВ В-7620		
			Доба культивування		
			7	14	21
pH	6,5-9,0	7,00±0,01	6,95±0,01	6,75±0,01	6,50±0,02
Fe загальний	0,5	2,40±0,01	1,40±0,01	1,20±0,02*	0*
Ca ²⁺	46,0	480,0±0,04	320,0±0,01	102,40±0,06*	13,80±0,03
Mg ²⁺	50,0	315,20±0,04	125,70±0,05*	75,30±0,04	1,0±0,02*
NO ₃ ⁻	12,5	1,20±0,04	0,50±0,05*	0,00±0,02*	0*
NO ₂ ⁻	1,5	0,34±0,05	0*	0*	0*
SO ₄ ²⁻	500,0	160,0±0,02	92,0±0,04	23,0±0,03*	0,30±0,03*
Cl ⁻	300,0	549,40±0,01	311,20±0,03	101,40±0,04*	10,20±0,04*
HS ⁻	1,0	81,0±0,02	25,30±0,02*	7,90±0,05*	0,80±0,03
XCK	500,0	800,00±0,03	500,0±0,02	350,0±0,01*	275,0±0,01*

Примітки: $x \pm SD$, $n=3$; * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$); контроль – розведений у 10 разів фільтрат; ** – <https://omr.gov.ua/ua/projects/3776>

Нагромадження біомаси мікроорганізмами, а також зменшення вмісту забруднюючих речовин у стічних водах за їхньою участю, – це дуже важливі показники, які свідчать про перспективу розроблення біотехнологій на їхній основі для очищення забруднених вод. Встановлена нами можливість впливу бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 на зменшення вмісту загального Fe, Ca²⁺, Mg²⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, HS⁻ у стічних водах доповнює та розширює розуміння ролі пурпурових несіркових бактерій в екосистемах, які можуть суттєво впливати на біогеохімічні цикли цих сполук у природі. Отримані результати можуть стати основою для розроблення ефективних біотехнологій очищення стічних вод від сполук Хлору,

Феруму, Нітрогену, Сульфуру й органічних речовин за участю цих мікроорганізмів.

3.6 Екзоелектрогенні властивості *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Очищення навколишнього середовища за допомогою біоелектрохімічних систем становить значний інтерес в аспекті його практичного застосування. Нові мікробні електрохімічні системи розглядають як ефективний підхід, за допомогою якого можна використовувати мікроорганізми для трансформування забруднюючих речовин у процесі виробництва електроенергії.

У мікробних паливних елементах (МПЕ) екзоелектрогенні бактерії окиснюють органічні речовини і переносять електрони на анод, звідки вони прямують на катод, взаємодіють із протонами та киснем з утворенням води (Gadkari et al., 2019). *Shewanella oneidensis* MR-1 та *Geobacter sulfurreducens* PCA – металовідновлювальні бактерії, що генерують електроенергію, є модельними об'єктами для вивчення механізмів екзоклітинного перенесення електронів.

Відомі моделі біоелектрохімічних систем з використанням представників *Alphaproteobacteria* (Xing et al., 2008; Zuo et al., 2008), *Betaproteobacteria* (Chaudhuri, & Lovley, 2003), *Gammaaproteobacteria* (Kim et al., 1999), *Deltaproteobacteria* (Stöckl et al., 2019), здатних генерувати електричний струм у МПЕ внаслідок окиснення як простих органічних сполук, так і ксенобіотиків органічної природи, зокрема, вуглеводнів нафти. Вважають, що МПЕ будуть використовувати для отримання електроенергії за одночасного очищення різних типів стічних вод (Choudhury et al., 2020).

Бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 можуть використовувати як джерела Карбону і донори електронів цитрат, малат, сукцинат, глюкозу, крохмаль (розділ 3.4.), тому було досліджено їхню здатність генерувати електричний струм.

Для оптимізації роботи МПЕ з використанням *R. yavorovii* ІМВ В-7620 слід було підібрати оптимальну концентрацію донора електронів. Тому досліджували здатність бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 генерувати електричний струм у МПЕ за використання модельного субстрату натрій цитрату (42; 60; 90 мМ), оскільки

досліджувані мікроорганізми, як показали результати наших попередніх досліджень, нагромаджують біомасу та продукують водень (див. рис. 3.21-3.23) за використання натрій цитрату. За внесення в анодну камеру натрій цитрату (42 мМ) початкова густина потужності становила 350 мВт/м² (рис. 3.27). Найвище значення густини потужності (1039 мВт/м²) за цих умов культивування було отримано на 32-гу годину культивування. На 40-ву годину культивування густина потужності становила 946 мВт/м². Зі збільшенням тривалості культивування бактерій густина потужності поступово знижувалась (див. рис. 3.27).

Максимальну різницю потенціалів у МПЕ, яка може бути отримана лише за рахунок самовільних хімічних перетворень, не пов'язаних із біологічними процесами (рис. 3.27, Б). Максимальне значення густини потужності контрольного дослідження в однокамерному МПЕ без внесення інокуляту було 50 мВт/м². Без внесення інокуляту генерування електричної енергії відбувається за рахунок самовільних електрохімічних процесів перетворення субстрату.

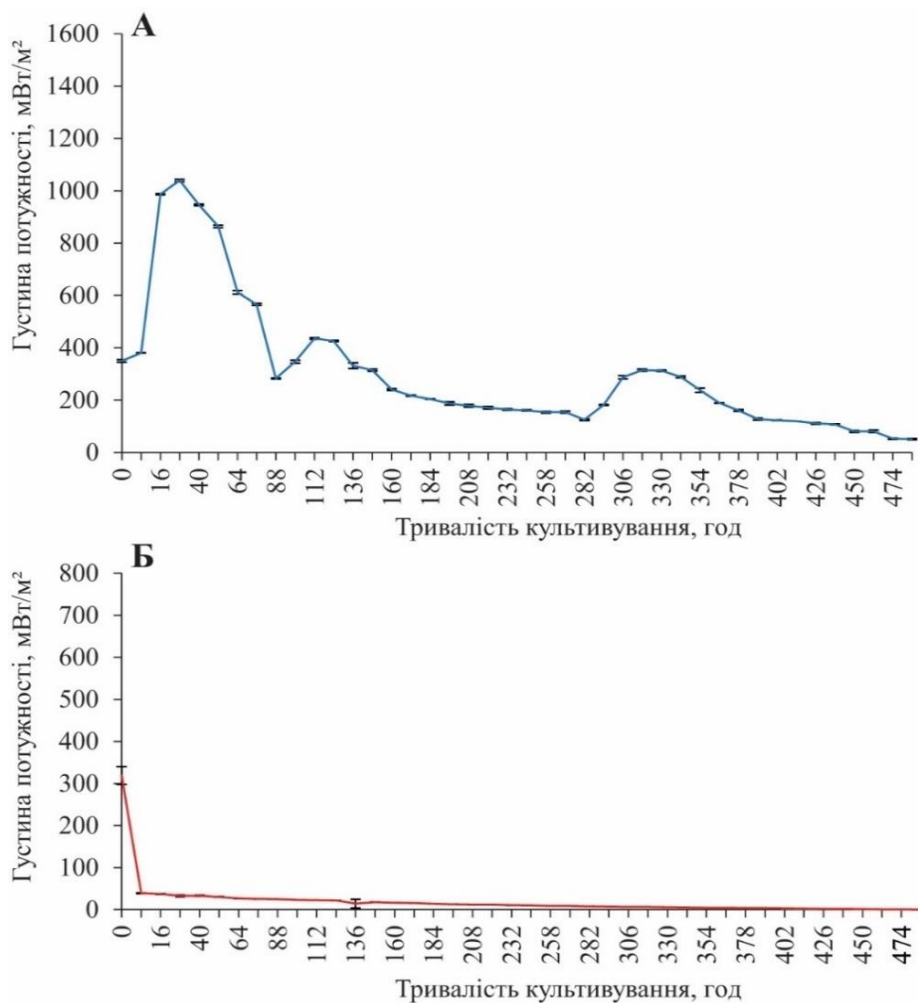


Рис. 3.27 – Густина потужності мікробного паливного елемента: А – упродовж культивування *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за внесення натрій цитрату (42 мМ) в анодну камеру з урахуванням густини потужності контрольного досліду ($x \pm SD$, $n=3$); Б – за внесення натрій цитрату (42 мМ) в анодну камеру за відсутності бактерій ($x \pm SD$, $n=3$)

Під час вирощування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищі з натрій цитратом (60 мМ) початкова густина потужності становила 267 мВт/м² (рис. 3.28). Найвищу густину потужності МПЕ (1149 мВт/м²) зафіксовано на 8-му год вирощування бактерій (див. рис. 3.28).

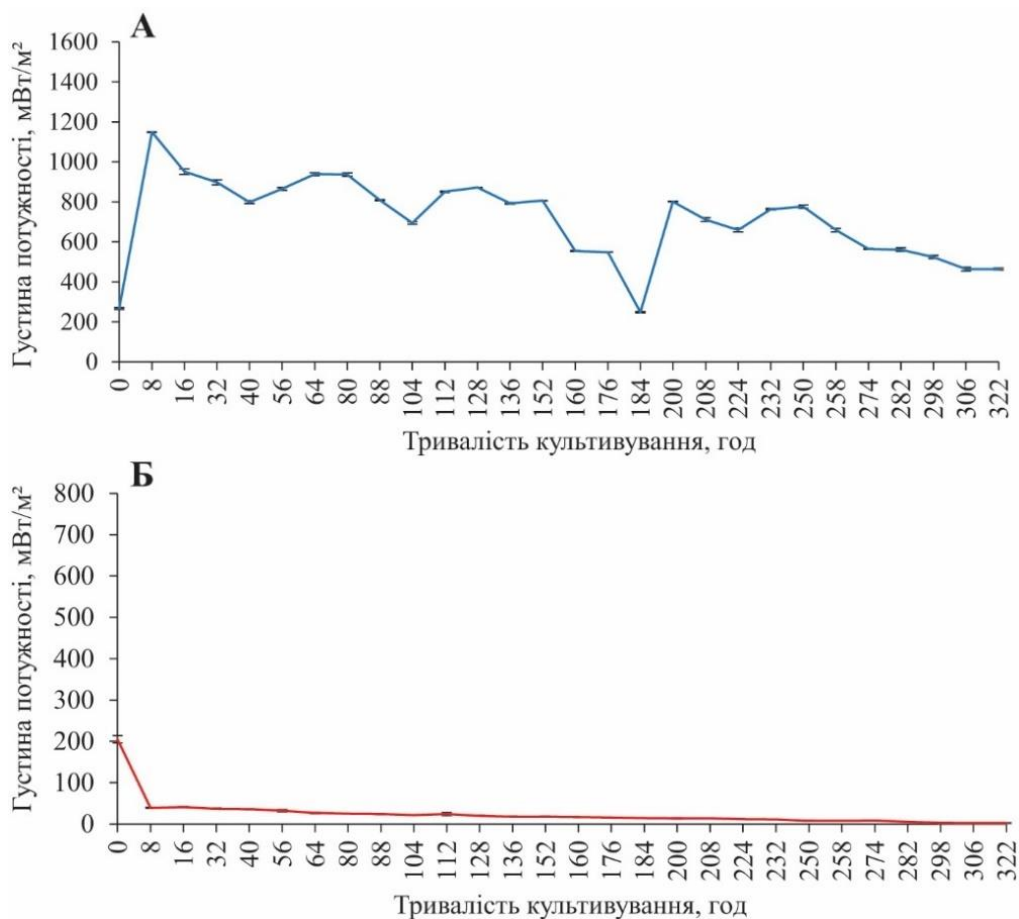


Рис. 3.28 – Густина потужності мікробного паливного елемента: А – упродовж культивування *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за внесення натрій цитрату (60 мМ) в анодну камеру з урахуванням густини потужності контрольного дослідження ($x \pm SD$, $n=3$); Б – за внесення натрій цитрату (60 мМ) в анодну камеру за відсутності бактерій ($x \pm SD$, $n=3$)

На 88-му год вирощування досліджуваних бактерій було проведено заміну 0,1 % розчину $KMnO_4$ у зв'язку з його відновленням та, відповідно, знебарвленням. Максимальне генерування електричного струму спостерігали у період з 8-ї до 80-ї год культивування досліджуваних бактерій. На 88-му год культивування густина потужності поступово знижувалася зі зростанням тривалості вирощування бактерій в МПЕ, що зумовило поступове зростання густини потужності й повторне відновлення католіту на 184-ту год культивування. Тому повторно проводили заміну католіту і спостерігали підвищення густини потужності (див. рис. 3.28).

Очевидно, використання бактеріями цитрату як єдиного донора електронів в анодній камері МПЕ зумовлює його інтенсивне окиснення та генерування електричного струму.

Найвище значення густини потужності (1039 мВт/м^2) спостерігали на 32-гу год культивування *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищі з 90 мМ цитрату. Зі збільшенням тривалості культивування бактерій до 322-ї год густина потужності знижувалась (рис. 3.29).

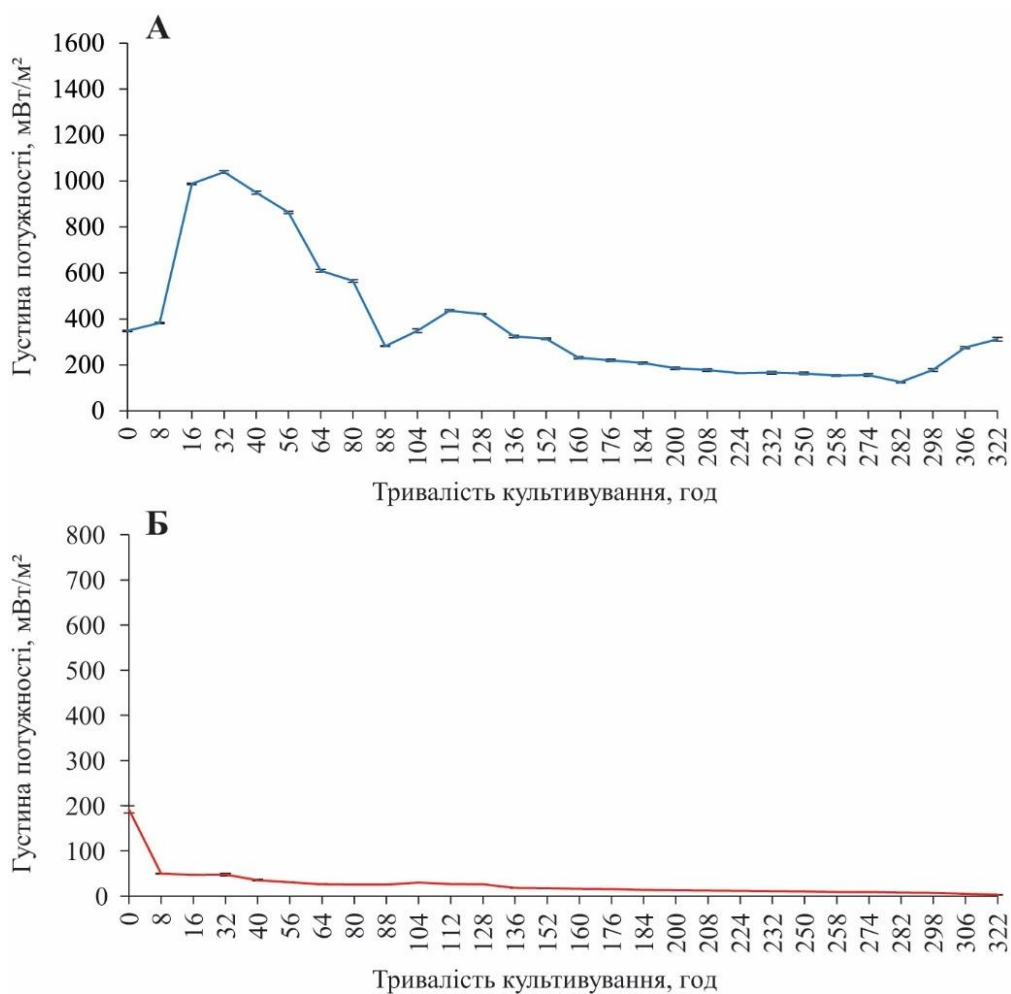


Рис. 3.29 – Густина потужності мікробного паливного елемента: А – упродовж культивування *Rhodospseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 за внесення натрій цитрату (90 мМ) в анодну камеру з урахуванням густини потужності контрольного досліду ($x \pm SD$, $n=3$); Б – за внесення натрій цитрату (90 мМ) в анодну камеру за відсутності бактерій ($x \pm SD$, $n=3$)

Отже, *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовують цитрат як донор електронів у процесі формування електричного струму. Найвищу густину потужності серед досліджених концентрацій натрій цитрату зафіксовано за внесення в анодну камеру натрій цитрату за концентрації 60 мМ (див. рис. 3.28).

Бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 нагромаджують найвищу біомасу за росту в розведеній у 10 разів стічній воді дріжджового заводу (див. рис. 3.25) та здатні рости у середовищах із різними органічними речовинами (див. табл. 3.6). Тому розведену стічну воду дріжджового заводу з клітинами вносили в анодну камеру для перевірки здатності генерування електричного струму досліджуваними бактеріями. За цих умов культивування початкова густина потужності МПЕ була 303 мВт/м². Після 48 год культивування спостерігали підвищення густини потужності до 1098 мВт/м². Максимальну густину потужності (1463 мВт/м²) реєстрували на 96-ту год культивування *R. yavorovii* ІМВ В-7620, що є в 1,6 раза вищим, ніж за використання натрій цитрату як модельного субстрату (рис. 3.30).

Видам роду *Rhodopseudomonas* притаманна виняткова здатність до росту в середовищах із різноманітними органічними та неорганічними сполуками: ароматичними сполуками (Dutton & Evans, 1969; Gibson & Harwood, 1995; Austin et al., 2015), гетероциклічними, хлоровмісними (McGrath & Harfoot, 1997), важкими металами й іншими групами ксенобіотиків, наприклад, фенольними сполуками (Mehrabi et al., 2001).

R. yavorovii ІМВ В-7620, як і *Rhodopseudomonas palustris* штам RP2 (Venkidusamy & Megharaj, 2016) та *Rhodopseudomonas palustris* DX-1 (Xing et al., 2008), генерують електричний струм. Густина потужності електричного струму, генерованого *R. yavorovii* ІМВ В-7620, виявилася в 11 разів вищою, порівняно з густиною потужності струму, утвореного *R. palustris* штамом RP2, та в 1,9 раза нижчою, ніж густина потужності струму, генерованого *R. palustris* DX-1 (табл. 3.9). Однак ми не вносили дріжджовий екстракт у середовище культивування, як це описано для *R. palustris* DX-1 (Xing et al., 2008).

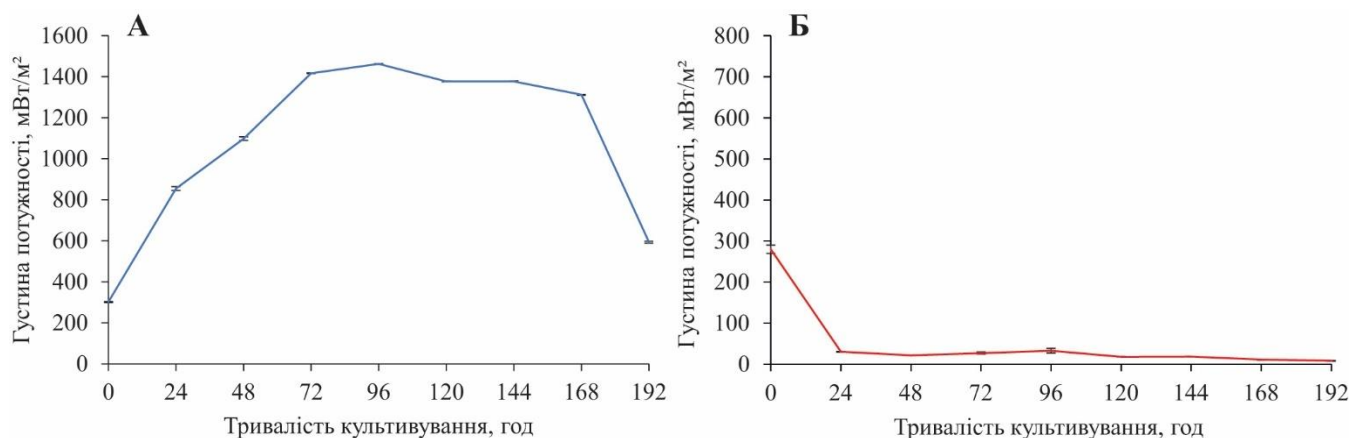


Рис. 3.30 – Густина потужності мікробного паливного елемента: А – упродовж культивування *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 за внесення розведеної в 10 разів стічної води дріжджового заводу в анодну камеру з урахуванням густини потужності контрольного дослідю ($x \pm SD$, $n=3$); Б – за внесення розведеної в 10 разів стічної води дріжджового заводу в анодну камеру за відсутності бактерій ($x \pm SD$, $n=3$)

Таблиця 3.14 – Генерування електричного струму різними видами роду *Rhodopseudomonas* ($x \pm SD$, $n=3$)

Мікроорганізми	Середовище культивування	Густина потужності електричного струму, мВт/м ²
<i>R. yavorovii</i> IMB B-7620	Розведена стічна вода дріжджового заводу	1463
<i>R. yavorovii</i> IMB B-7620	Середовище з цитратом (60 мМ)	1149
<i>R. palustris</i> штаб RP2 (Venkidusamy & Megharaj, 2016)	Середовище з ацетатом	132
<i>R. palustris</i> штаб DX-1 (Xing et al., 2008)	Середовище з ацетатом і дріжджовим екстрактом	2720

Отже, штаб IMB B-7620 використовує натрій цитрат і органічні речовини стічної води дріжджового заводу для генерування електричного струму, що робить його перспективним для вивчення й оптимізації роботи МПЕ за умов використання низки органічних сполук.

Отримані результати демонструють, що бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 можуть ефективно генерувати електричний струм в однокамерному МПЕ за росту як на модельному субстраті, так і на стічних водах із комплексним забрудненням.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Яворівське державне гірничо-хімічне підприємство “Сірка” площею 74 км² у 1993 р. припинило промислову діяльність. Відкритий спосіб видобутку сірчаної руди у 70-ті роки ХХ ст. спричинив утворення одного з найбільших у світі кар’єру площею 1080 га. З 1998 р. значна територія родовища, а власне центральний зумпф і прилеглі рукави кар’єру, затоплювалися водою. У результаті утворилося озеро Яворівське площею понад 700 га та завглибшки понад 90 м (Патика та ін., 2007; Тарабас та ін., 2017а).

Унаслідок видобутку сірки відкритим способом компоненти природного еволюційно сформованого біогеоценозу зруйнувалися. Утворився техногенний ландшафт, рекультивация якого супроводжувалася формуванням якісно нових біогеоценозів, зокрема, мікробоценозів. Їхні компоненти постійно вступають у тісну взаємодію між собою і з породою, винесеною на поверхню з недоступної раніше глибини. Формуються нові гідрогеологічні та гідрологічні умови, нові угруповання мікроорганізмів, яким може не бути аналогів у природі (Баран та ін., 2003; Тарабас та ін., 2017а).

Досліджено хімічний склад води озера Яворівське на різних глибинах (0–70 м). Кислотність, мінералізація та вміст Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- і NO_3^- на всіх глибинах озера, K^+ , P_2O_5 та NH_4^+ на глибинах до 20–50 м виявилися незначними і не перевищували гранично допустимих концентрацій (ГДК). На всіх глибинах вміст SO_4^{2-} (913–1530 мг/л) і на глибинах понад 30 м вміст H_2S (30–34 мг/л) значно перевищували ГДК (Тарабас та ін., 2017а).

Сірководень, сульфати, нітрати, нітроти, важкі метали – це надзвичайно небезпечні забруднювачі. Значна частина з них не включається у природний кругообіг, накопичується в біосфері та спричиняє негативний вплив на навколишнє середовище. Потрапляння забруднювачів у високих концентраціях в екосистеми спричиняє стресові умови, до яких, у першу чергу, адаптуються мікроорганізми. Дослідження й опис мікроорганізмів із такого техногенного середовища, зокрема, фототрофних бактерій, адаптованих до цих умов, є надзвичайно важливими як з теоретичної, так і з практичної точок зору. Фототрофні бактерії, зокрема, пурпурові

несіркові бактерії, забезпечують трансформацію неорганічних і органічних сполук у біогеоценозах зі значним антропогенним навантаженням і здатні метаболізувати широкий спектр забруднювачів (Griffin et al., 2007; Adessi et al., 2021). Дослідження їхніх фізіолого-біохімічних властивостей важливе не лише для визначення ролі цих мікроорганізмів у функціонуванні водного мікробіоценозу Яворівського озера, але й для пошуку перспектив застосування останніх в очищенні стічних вод, для виробництва водню та генерування електричного струму.

ФНСБ здатні рости як за аеробних, так і за анаеробних умов. Використовуючи кисень як кінцевий акцептор електронів, вони забезпечують кращі умови для розвитку ФСБ, чисельність яких є вищою у більш глибоких шарах водойми. ФСБ використовують гідроген сульфід, зменшуючи проникнення останнього у розміщені вище водні шари, де розвиваються ФНСБ (Тарабас та ін., 2017а).

Подальші наші дослідження стосувалися виділення й ідентифікації фотосинтезувальних пурпурових несіркових бактерій, які беруть участь у перетворенні енергії світла на енергію хімічних зв'язків, зокрема, у процесі фотофосфорилування (Adessi et al., 2021). Використання органічних сполук одночасно як джерел Карбону та донорів електронів створює селективні умови для розвитку ПНСБ. Тому з метою виділення ПНСБ з води озера у середовище культивування вносили натрій ацетат. Було виділено 4 штами ПНСБ (Ya-2016, Ya₁-2016, Ya₂-2016, Ya₃-2016), які росли у середовищі з гідроген сульфідом. Для досліджень було обрано штаму Ya-2016, який найшвидше використовував гідроген сульфід зі середовища культивування (Тарабас та ін., 2017б).

Суспензія виділеного штаму бактерій має рожево-червоний колір. Вібріодні клітини грамнегативні, рухливі та не здатні утворювати спори. Ці бактерії використовують низку органічних сполук як субстрати для фототрофного росту. Вітамін B₁₂ необхідний їм як фактор росту (Тарабас та ін., 2017б).

У досліджених бактерій визначено три гомологічні форми бактеріохлорофілу *a* (BChl *a*₁, BChl *a*₂, BChl *a*₃). Лікопін і ангідрородовібрин були ідентифіковані як основні каротиноїди у штаму Ya-2016 (Тарабас та ін., 2018).

Таксономічне положення штаму Ya-2016 визначено на основі сукупності його культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей та результатів філогенетичного аналізу. Встановлено, що нуклеотидна послідовність консервативної ділянки гена 16S рРНК демонструє високу подібність (99 % ідентичних залишків за попарного вирівнювання методом BLASTN) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) до гена 16S рРНК бактерій роду *Rhodopseudomonas*. Виділений штам бактерій назвали *R. yavorovii* IMB B-7620 (Тарабас та ін., 2017б).

Використання відновлених сполук Сульфуру (гідроген сульфід, тіосульфату тощо) та Нітрогену (нітритів) як донорів електронів фототрофними пурпуровими несірковими бактеріями, виділеними з води Яворівського озера, раніше не досліджували.

Сірководень – найбільш відновлена форма сірки, що є токсичною. Він добре розчинний у воді, де може дисоціювати на іони гідросульфід (HS^-)/сульфід (S^{2-}). Концентрація сульфід-іонів (S^{2-}) є незначною та може зростати за високих значень рН (Dahl, 2020). Сірководень бактерії використовують тіосульфат-іони як донори електронів, оскільки він хімічно стабільний у нейтральному та лужному середовищах і нетоксичний (Dahl, 2020). У пропонованій роботі вперше показано, що *R. yavorovii* IMB B-7620 використовують відновлені сполуки Сульфуру та Нітрогену як донори електронів. Зниження вмісту сульфід- і тіосульфат-іонів у середовищі культивування свідчить, що виділені та досліджені нами бактерії *R. yavorovii* IMB B-7620 використовують останні як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу (Тарабас та ін., 2017г). Процес окиснення сульфідів і тіосульфатів пурпуровими несірковими бактеріями супроводжується утворенням невеликих кількостей сульфатів та елементної сірки або лише сульфат-іонів, відповідно. Можна припустити, що бактерії *R. yavorovii* IMB B-7620 використовують Sox мультиензимний комплекс для фотоокиснення тіосульфатів до сульфатів (Friedrich et al., 2001; Dahl, 2017). Можливо, *R. yavorovii* IMB B-7620 окиснюють сульфід за участю сульфід:хінон оксидоредуктази (SQR), або

флавоцитохром *c* сульфід дегідрогенази (FccAB) (Meyer & Cusanovich, 2003; Dahl, 2017), або ферментів Sox системи (Appia-Ayme et al., 2001) в периплазмі клітини.

R. yavorovii ІМВ В-7620 використовують сульфат-іони у процесі асиміляційної сульфат редукції як джерело Сульфуру (Тарабас та ін., 2017г). Відповідно до отриманих у ході експериментальних досліджень результатів можна припустити, що у воді озера Яворівське, крім ПСБ (Мороз та ін., 2017), також ПНСБ, зокрема, *R. yavorovii* ІМВ В-7620, забезпечують циклічність процесу перетворення сполук Сульфуру.

Цикл Сульфуру має спільне з циклом Нітрогену. У результаті відновлення сульфат-іонів мікроорганізмами утворюються сульфід-іони як проміжний продукт, а результатом відновлення нітрат-іонів є нітрит-іони як проміжний продукт. Відновлення як сульфід-іонів, так і нітрит-іонів здійснюється у результаті перенесення шести електронів у електронтранспортному ланцюгу (Einsle, 2011).

Нітрит-іони як проміжний продукт є акцептором електронів анаеробного дихання під час дисиміляційного відновлення нітрат-іонів до аміаку, денітрифікації до азоту і анамокс-реакції, які характерні для різних груп мікроорганізмів (Moroz et al., 2021). Відомо про процес аеробної нітрифікації, під час якого донором електронів є нітрит-іони, а кінцевим акцептором – кисень (Nemp et al., 2016; Moroz et al., 2021). Анаеробне окиснення нітрит-іонів відбувається лише за участю фототрофів. Описано здатність ПСБ та ПНСБ окиснювати нітрит-іони за анаеробних умов і освітлення, що супроводжується утворенням нітрат-іонів (Schott et al., 2010; Nemp et al., 2016; Moroz et al., 2021).

Тому виділений нами штам тестували на здатність до анаеробного фототрофного окиснення нітрит-іонів. Встановлено, що бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 окиснювали нітрит-іони за освітлення й анаеробних умов, а отже, використовували останні як донор електронів аноксигенного фотосинтезу. Окиснення нітрит-іонів у середовищі без клітин за умов освітлення не відбувалося, що виключає його хімічне окиснення. Досліджувані мікроорганізми не окиснювали нітрит-іони у темряві (Tarabas et al., 2019).

У процесі окиснення йонів нітриту аеробними бактеріями задіяний нітритоокиснювальний фермент, у якому молібден є компонентом молібдоптерину (Kroneck & Abt, 2002; Moroz et al., 2021). Крім того, майже всі нітратредуктази, які каталізують зворотну реакцію перетворення нітрат-іонів до нітрит-іонів, містять молібденовий кофактор (Stolz & Basu, 2002). Бактерії *R. yavorovii* IMB В-7620 також нагромаджують біомасу й окиснюють нітрит-іони тільки за внесення у середовище культивування амонію молібденовокислого (Tarabas et al., 2019).

Зниження вмісту нітрит-іонів за концентрації 0,7; 1,4; 2,8 мМ і утворення нітрат-іонів зі супутнім нагромадженням біомаси свідчить, що нітрит-іони окиснюються бактеріями до нітрат-іонів у процесі аноксигенного фотосинтезу. За внесення вищих концентрацій нітрит-іонів у середовище культивування використання нітрит-іонів бактеріями *R. yavorovii* IMB В-7620 та утворення нітрат-іонів було неповним (Tarabas et al., 2019). Можливо, це пов'язано з тим, що досліджувані мікроорганізми використовують нітрат-іони як джерело Нітрогену за умов освітлення.

Порівняно з іншими донорами електронів, які використовують бактерії під час аноксигенного фотосинтезу (органічні сполуки, HS^- , H_2 або Fe^{2+}), пара $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ зі стандартним окисно-відновним потенціалом (ОВП) +0,43 В, теоретично може віддавати електрони в реакційний центр хінонового типу в пурпурових сіркових бактерій, де первинний донор бактеріохлорофіл має середній ОВП +0,49 В (Schott et al., 2010; Hemp et al., 2016).

Найбільш імовірно, що *R. yavorovii* IMB В-7620 тісно споріднені з аеробними окиснювачами нітрит-іонів, такими як *Nitrobacter* sp., про що свідчить філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК (Тарабас та ін., 2017б). Таким чином, фототрофні та хемотрофні бактерії здатні окиснювати нітрит-іони.

Подальші дослідження стосувалися вивчення здатності бактерій *R. yavorovii* IMB В-7620 рости у різних стічних водах. Встановлено, що досліджувані мікроорганізми найкраще нагромаджували біомасу за росту в розведеній у 10 разів стічній воді дріжджового заводу (Тарабас та ін., 2019). Одночасне використання

різних донорів електронів, зокрема, сульфід- і нітрит-іонів за росту бактерій у розведених стічних водах, дає підстави припустити, що *R. yavorovii* IMB B-7620 використовують нітрити, котрі є донорами електронів аноксигенного фотосинтезу, як і сульфіди. Проте для встановлення закономірностей окиснення нітрит-іонів у природному середовищі необхідні подальші дослідження.

Крім того, у багатьох природних середовищах за нітрит-іони можуть конкурувати бактерії, які здійснюють денітрифікацію, анамокс-реакції, аеробну нітрифікацію, окиснення нітриту за умов хемотрофії. За стабільних і незмінних умов навколишнього середовища, швидше за все, одна еколого-трофічна група буде витіснити всі інші, але такі умови рідко трапляються у природі. Середовища існування фототрофних нітрит-окиснювальних пурпурових бактерій, зокрема, відкладення солоних і прісних водойм, характеризуються змінами, наприклад, різними світловими режимами, зміною температури або вмісту кисню, різним вмістом альтернативних донорів електронів. Усі ці фактори суттєво впливають на метаболізм ПНСБ у природних середовищах, що створює труднощі у процесі оцінки впливу нітрит-окиснювальних фототрофів на цикл Нітрогену.

Вплив фототрофних пурпурових нітрит-окиснювальних бактерій на цикл Нітрогену в навколишньому середовищі чітко визначити неможливо. Можливо, нітрит-окиснювальні фототрофи будуть реокиснювати нітрит-іони, що утворюються денітрифікаторами, або можуть частково замінювати нітрифікувальні бактерії в нітрифікувальних бактерійних агрегатах.

R. yavorovii IMB B-7620 належать до родини *Bradyrhizobiaceae*. У межах цієї родини можемо спостерігати різноманітність фенотипових, метаболічних і екологічних особливостей серед її представників (Brenner et al., 2005). Їхня участь у біогеохімічних циклах має надзвичайно важливе значення. Біологічна фіксація азоту (діазотрофія) є однією з найважливіших екологічних властивостей мікроорганізмів, що потенційно застосовується у сільському господарстві. Цей процес характерний для більшості представників *Bradyrhizobiaceae*. *R. yavorovii* IMB B-7620 нагромаджують біомасу в середовищі без внесення йонів амонію. Імовірно, зниження вмісту азоту у складі газової фази під час росту в середовищі

культивування з натрій цитратом також дає підстави стверджувати, що досліджувані мікроорганізми є азотофіксаторами (Tarabas et al., 2021).

Біологічна фіксація азоту є одним із основних шляхів продукування водню пурпуровими фотосинтезувальними бактеріями. У цих бактерій нітрогеназа каталізує відновлення азоту до аміаку зі супутнім продукуванням водню (Rey et al., 2007).

Можна припустити, що у досліджуваних мікроорганізмів продукування біогазу не залежить від фіксації азоту, оскільки *R. yavorovii* ІМВ В-7620, як і мутанти *Rhodopseudomonas palustris* (Rey et al., 2007), продукували водень навіть за наявності NH_4^+ у середовищі культивування. Клітини дикого типу *Rhodopseudomonas palustris* не продукують водень за наявності йонів амонію (Rey et al., 2007).

У багатьох дослідженнях повідомлялося, що ацетат є оптимальним джерелом Карбону для продукування водню ПНСБ (Wang et al., 2010; Tao et al., 2008; Laurinavichene & Tsygankov, 2018), однак ми не спостерігали цього у *R. yavorovii* ІМВ В-7620. Під час окиснення натрій цитрату досліджуваними мікроорганізмами спостерігали утворення CO_2 та H_2 у складі газової фази (Tarabas et al., 2021). Очевидно, що *R. yavorovii* ІМВ В-7620 певну частину субстрату (натрій цитрату) конвертували у CO_2 , про що свідчило збільшення концентрації останнього у складі газової фази. Також можна припустити, що продукування H_2 бактеріями є одним зі способів підтримання окисно-відновного балансу, як описано (McKinlay & Harwood, 2010). Ймовірно, органічні сполуки окиснюються досліджуваними мікроорганізмами до CO_2 , а електрони переносяться назад у реакційні центри та, зрештою, до молекул НАДН, які необхідні для фіксації CO_2 . У результаті циклічного перенесення збуджених фотонами електронів утворюється градієнт протонів, необхідний для синтезу в кінцевому результаті достатнього для клітин вмісту АТФ. Основна частина органічних сполук є фотоасимільованими безпосередньо для анаболічних реакцій (McKinlay & Harwood, 2010).

Досліджена концентрація водню під час росту бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у середовищі з натрій цитратом за концентрації 90 мМ з NH_4^+ у складі газової фази є високою ($21,26 \pm 0,08$ %) (Tarabas et al., 2021).

R. yavorovii ІМВ В-7620 використовують низку органічних речовин одночасно як донори електронів і джерела Карбону для продукування водню, так як і інші ПНСБ (Ghosh et al., 2017; Adessi et al., 2021). Ці мікроорганізми у середовищі з натрій цитратом використовують його одночасно як донор електронів і джерело Карбону. Можливо, *R. yavorovii* ІМВ В-7620, як і інші ПНСБ, фіксують CO_2 у циклі Кальвіна (Adessi et al., 2021). *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовували багато органічних та неорганічних сполук за анаеробних фототрофних умов росту й однаково добре росли також аеробно в темряві, як і *Rhodobacter capsulatus* (Costa et al., 2017).

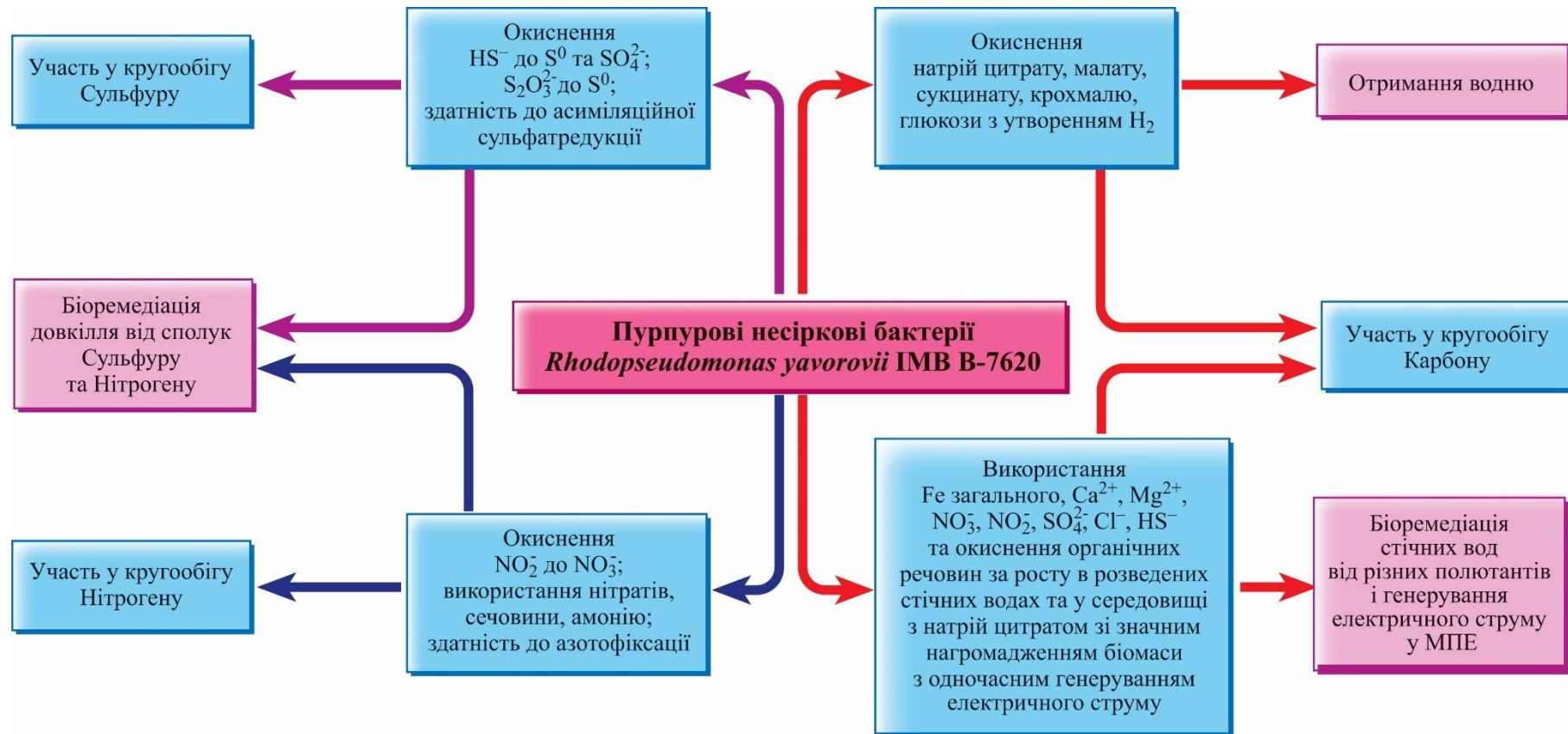
Бактерії, що генерують електричний струм в МПЕ, зацікавили велике коло науковців. У даній роботі ми повідомляємо про те, що фототрофні пурпурові несіркові бактерії *R. yavorovii* ІМВ В-7620 використовують натрій цитрат за концентрацій 42; 60; 90 мМ, а це робить їх дуже перспективними для вивчення генерування електроенергії в МПЕ. За росту *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у модельних середовищах із нітрит- і сульфід-іонами бактерії незначно нагромаджують біомасу. Найбільше нагромадження біомаси досліджуваними мікроорганізмами й активне використання низки неорганічних і органічних субстратів виявили у розведеній стічній воді дріжджового заводу. Тому здатність до генерування електроенергії досліджуваними мікроорганізмами вивчали у процесі росту в цій воді.

R. yavorovii ІМВ В-7620 генерували електроенергію з максимальною густиною потужності (1463 мВт/м^2) у процесі росту в розведеній стічній воді дріжджового заводу. Ці результати показують, що ПНСБ можуть ефективно генерувати електроенергію у МПЕ.

На основі одержаних експериментальних даних пропонуємо узагальнену схему, яка відображає деякі фізіолого-біохімічні властивості *R. yavorovii* ІМВ В-7620 та можливість використання їх у біотехнологіях очищення стічних вод від органічних і неорганічних сполук, а також перспективи використання цих

мікроорганізмів для продукування водню, генерування електроенергії, а також як джерело протеїнів і пігментів (див. рисунок).

Фізіолого-біохімічні властивості *R. yavorovii* ІМВ В-7620 та можливість їхнього використання у біотехнологіях очищення стічних вод, для продукування водню і генерування електроенергії



ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено закономірності використання сульфід-, тіосульфат- і нітрит-іонів у модельному середовищі та сульфід- і нітрит-іонів у стічних водах фототрофними пурпуровими несірковими бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620, виділеними з техногенно створеного озера Яворівське, та встановлено здатність цих бактерій генерувати електричний струм і продукувати водень за різних умов культивування. Основні результати проведених досліджень представлено у таких висновках:

1. Визначення чисельності фототрофних пурпурових бактерій продемонструвало, що фотосинтезувальні несіркові бактерії найінтенсивніше розвиваються на межі оксигенної й аноксигенної зон, оскільки здатні рости як за аеробних, так і за анаеробних умов. Використовуючи кисень як кінцевий акцептор електронів, вони забезпечують кращі умови для розвитку фотосинтезувальних сіркових бактерій, чисельність яких є вищою у більш глибоких шарах водойми. Значне перевищення у воді озера Яворівське на деяких глибинах ГДК сульфат-іонів і гідроген сульфід-іонів сприяє росту чисельності фототрофних пурпурових бактерій.
2. За морфологічними, фізіологічними, біохімічними властивостями, пігментним складом і за результатами секвенування нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК виділений із мікробного угруповання води озера Яворівське штам пурпурових несіркових бактерій ідентифіковано як *R. yavorovii* ІМВ В-7620.
3. Експериментально підтверджено здатність до використання сульфід-, тіосульфат- і нітрит-іонів бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у модельних середовищах та стічних водах. Встановлення здатності до використання нітрит-іонів як донорів електронів аноксигенного фотосинтезу дає змогу зробити висновок про ймовірний вплив фотоокиснення нітрит-іонів на глобальний цикл Нітрогену.
4. Встановлено метаболічну здатність до продукування водню бактеріями *R. yavorovii* ІМВ В-7620 за використання сукцинату, натрій цитрату, малату, глюкози, крохмалю як джерел Карбону й енергії. На основі отриманих кількісних

параметрів утворення газу розраховано, що цей мікроорганізм протягом 7 діб утворює 1,1 л H_2 за фотоферментації 1 кг сухої маси натрій цитрату.

5. Найбільшу біомасу *R. yavorovii* ІМВ В-7620 нагромаджують за росту у стічних водах. Встановлено здатність бактерій *R. yavorovii* генерувати електричний струм. За таких умов культивування максимальна густина потужності МПЕ є в 1,6 рази вищою, ніж за росту *R. yavorovii* ІМВ В-7620 у модельних середовищах із натрій цитратом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антипчук, А. Ф., & Кіреєва, І. Ю. (2005). *Водна мікробіологія*. Київ: Кондор.
2. Баран, І. М., Подопригора, О. І., Грищук, Г. В., Бондар, Л. С., Кіт, Л. Я., Клим, І. Р., Гнатуш, С. О., & Гудзь, С. П. та ін. (2003). Екологічний моніторинг водойм Яворівського сіркового родовища; мікробіологічний контроль. *Довкілля та здоров'я*, 4, 55–58.
3. Галушка, А. А., & Гудзь, С. П. (2009). Структурно-функціональні зміни в клітинах мікроорганізмів при дії гідроген сульфіді. *Біологічні студії*, 3(2), 141–148.
4. Грушко, Я. М. (1979). *Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах*. Ленинград: Химия.
5. Гудзь, С. П., Гнатуш, С. О., Яворська, Г. В., Білінська, І. С., & Борсукевич Б. М. (2014). *Практикум з мікробіології. Підручник*. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка.
6. Гудзь, С. П., Горішний, М. Б., & Гнатуш, С.О. (2011). *Бактеріальний фотосинтез. Навчальний посібник*. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка.
7. Дзюблик, І. В., & Горовенко, Н. Г. (2012). *Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб. Навчально-методичний посібник*. Київ: НМАПО.
8. ДСТУ ISO 6058:2003 Якість води. Визначання вмісту кальцію. Титрометричний метод із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти.
9. ДСТУ ISO 6059:2003 Якість води. Визначання сумарного вмісту кальцію та магнію. Титрометричний метод із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти.
10. Зеркалов, Д. В. (2007). *Екологічна безпека: управління, моніторинг, контроль. Посібник*. Київ: КНТ, Дакор, Основа.
11. Зінчук, В. К, Кузьма, Ю. Б, Веремчук, Т. А. (1997). *Методичні вказівки до вивчення основ сучасного методу аналітичної хімії. Полуменова фотометрія. Для*

студ. 2-го курсу хім. факультету. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка

12. Кіт, Л. Я., & Гудзь, С. П. (2007). Пурпурові сіркобактерії з водойм Яворівського родовища сірки. *Мікробіологічний журнал*, 69(1), 12–19.

13. Копанчук, В. О. (2020). Екологічна безпека як складова національної безпеки України: сучасні концепції та підходи. *Вісник Національної академії державного управління при Президентові України*, (2), 97.

14. Копілевич, В. А., Лаврик, Р. В., & Галімова, В. М. (2015). Спецпрактикум «Стічні води, очищення та утилізація і знешкодження осадів» для студентів факультету захисту рослин, біотехнологій та екології. *Практикум*. Київ: ДДП «Експо-Друк».

15. Мороз, О., Гнатуш, С., Богославець, Х, Яворська, Г, Звір, Г., & Борсукевич, Б. (2017). Вплив калій біхромату на деякі фізіологічні особливості бактерій циклу сульфуру озера Яворівське. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (75), 127–139.

16. Мороз, О. М., Колісник, Я. І., Подопригора, О. І., Клим, І. Р., Гудзь, С. П., Борсукевич, Б. М., & Гнатуш, С. О. (2008). Мікрофлора води озера “Яворівське”. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологічна*, (24), 131–138.

17. Набиванець, Б. Й., Осадчий, В. І., Осадча, Н. М., & Набиванець, Ю. Б. (2007). *Аналітична хімія поверхневих вод*. Київ: Наукова думка.

18. Патица, В. П., Омельянець, Т. Г., Гриник, І. В., & Петриченко, В. Ф. (2007). *Екологія мікроорганізмів*. Київ: Основа.

19. Петровська, І., Салига, Ю., Вудмаска, І. (2022). *Статистичні методи в біологічних дослідженнях. Навчально-методичний посібник*. Київ: Аграрна наука.

20. Сергійчук, М. Г. (2001). *Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження*. Київ: Фітосоціоцентр.

21. Тарабас, О., Гнатуш, С., Осташ, Б., Мутенко, Г., & Кошла, О. (2017б). Ідентифікація пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (75), 140–145.
<http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.75.15>

22. Тарабас, О., Мороз, О., Гнатуш, С., Яворська, Г., Звір, Г., & Ковальчук, М. (2017a). Еколого-трофічні групи мікроорганізмів води озера Яворівське. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (76), 166–178. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.76.21>
23. Тарабас, О. В., Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Василечко, В. О., Гришук, Г. В., Звір, Г. І., & Комплікевич, С. Я. (2017г). Використання сульфід- та тіосульфат-іонів пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii*. *Biosystems Diversity*, 25(3), 181–185. <https://doi.org/10.15421/011727>
24. Тарабас, О. В., Гнатуш, С. О., Галушка, А. А., & Мороз, О. М. (2018). Пігменти *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620. *Мікробіологія і біотехнологія*, 1(41), 57–65. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).120468](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).120468)
25. Тарабас, О. В., Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., & Осташ, Б. О. (2017в). Свідोцтво про депонування штаму бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016 у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України з наданням реєстраційного номеру ІМВ В-7620
26. Тарабас, О. В., Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Ковальчук, М. М. (2019). Біоремедіація стічних вод за використання фототрофних несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620. *Екологія та ноосферологія*, 30(2), 63–67. <https://doi.org/10.15421/03193002>
27. Шевченко, А. Ю. (2008). *Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу „Інженерна екологія”*. Донецьк: Видавничий центр Донецького НТУ.
28. Adessi, A., Corneli, E., & De Philippis, R. (2017). Photosynthetic purple non sulfur bacteria in hydrogen producing systems: new approaches in the use of well known and innovative substrates. In *Modern topics in the phototrophic prokaryotes* (pp. 321–350). Springer, Cham.
29. Adessi, A., La Cava, E., & De Philippis, R. (2021). Purple Bacteria: Electron Acceptors and Donors. In *Encyclopedia of Biological Chemistry (3rd Ed., pp. 305–314)*. Jez Joseph. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00016-5>

30. Alsiyabi, A., Immethun, C. M., & Saha, R. (2019). Modeling the Interplay between Photosynthesis, CO₂ Fixation, and the Quinone Pool in a Purple Non-Sulfur Bacterium. *Scientific reports*, 9(1), 12638. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49079-z>
31. Appia-Ayme, C., Little, P. J., Matsumoto, Y., Leech, A. P., & Berks, B. C. (2001). Cytochrome complex essential for photosynthetic oxidation of both thiosulfate and sulfide in *Rhodovulum sulfidophilum*. *Journal of bacteriology*, 183(20), 6107–6118. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.6107-6118.2001>
32. Assawamongkholsiri, T., & Reungsang, A. (2015). Photo-fermentational hydrogen production of *Rhodobacter* sp. KKU-PS1 isolated from an UASB reactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 221–230.
33. Austin, S., Kontur, W. S., Ulbrich, A., Oshlag, J. Z., Zhang, W., Higbee, A., Zhang, Y., Coon, J. J., Hodge, D. B., Donohue, T. J., & Noguera, D. R. (2015). Metabolism of Multiple Aromatic Compounds in Corn Stover Hydrolysate by *Rhodopseudomonas palustris*. *Environmental science & technology*, 49(14), 8914–8922. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02062>
34. Baker, M. D., Inniss, W. E., Mayfield, C. I., & Wong, P. T. S. (1982). Effect of pH on the growth and activity of heterotrophic sediment microorganisms. *Chemosphere*, 11(10), 973–983.
35. Basak, N., & Das, D. (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 31–42. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>
36. Bellini, M. I., Gutiérrez, L., Tarlera, S., & Scavino, A. F. (2013). Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification. *Systematic and applied microbiology*, 36(7), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.07.001>
37. Berezkin, V. G., & Drugov, Y. S. (1991). *Gas chromatography in air pollution analysis*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-0-08-085856-2.
38. Bergaust, L. L., Hartsock, A., Liu, B., Bakken, L. R., & Shapleigh, J. P. (2014). Role of norEF in denitrification, elucidated by physiological experiments with

Rhodobacter sphaeroides. *Journal of bacteriology*, 196(12), 2190–2200.
<https://doi.org/10.1128/JB.00003-14>

39. Borrego, C. M., & Garcia-Gil, L. J. (1994). Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynthesis research*, 41(1), 157–164. <https://doi.org/10.1007/BF02184156>

40. Brar, K. K., Cortez, A. A., Pellegrini, V. O., Amulya, K., Polikarpov, I., Magdouli, S., Kumar, M., Yang, Y. H., Bhatia, S. K., & Brar, S. K. (2022). An overview on progress, advances, and future outlook for biohydrogen production technology. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(88), 37264–37281. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.01.156>

41. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2: The Proteobacteria*. New York: Springer.

42. Brinkmann, H., Göker, M., Koblížek, M., Wagner-Döbler, I., & Petersen, J. (2018). Horizontal operon transfer, plasmids, and the evolution of photosynthesis in *Rhodobacteraceae*. *The ISME journal*, 12(8), 1994–2010. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0150-9>

43. Bryantseva, I., Gorlenko, V. M., Kompantseva, E. I., Imhoff, J. F., & Süling, J. (1999). *Thiorhodospira sibirica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium from a Siberian soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 697–703. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-697>

44. Cabello, P., Pino, C., Olmo-Mira, M. F., Castillo, F., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2004). Hydroxylamine assimilation by *Rhodobacter capsulatus* E1F1: requirement of the hcp gene (hybrid cluster protein) located in the nitrate assimilation nas gene region for hydroxylamine reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45485–45494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404417200>

45. Caldwell, D. E., & Tiedje, J. M. (1975). The structure of anaerobic bacterial communities in the hypolimnia of several Michigan lakes. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(3), 377–385. <https://doi.org/10.1139/m75-052>

46. Chandaravithoon, P., Nakphet, S., & Ritchie, R. J. (2018). Oxygenic and anoxygenic photosynthesis in a sewage pond. *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3089–3102. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1432-3>
47. Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1229–1232. <https://doi.org/10.1038/nbt867>
48. Chou, C. H., & World Health Organization (2003). *Hydrogen sulfide: human health aspects*. Geneva, World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>.
49. Choudhury, P., Ray, R. N., Bandyopadhyay, T. K., & Bhunia, B. (2020). Fed batch approach for stable generation of power from dairy wastewater using microbial fuel cell and its kinetic study. *Fuel*, 266, 117–173. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117073>
50. Codgell, R. J., Southall, J., Gardiner, A. T., Law, C. J., Gall, A., Roszak, A. W., & Isaacs, N. W. (2006). How purple photosynthetic bacteria harvest solar energy. *Comptes Rendus Chimie*, 9(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.03.035>
51. Cooper, D. E., Rands, M. B., & Woo, C. P. (1975). Sulfide reduction in fellmongery effluent by red sulfur bacteria. *Journal – Water Pollution Control Federation*, 47(8), 2088–2100.
52. Costa, S., Ganzerli, S., Rugiero, I., Pellizzari, S., Pedrini, P., & Tamburini, E. (2017). Potential of *Rhodobacter capsulatus* grown in anaerobic-light or aerobic-dark conditions as bioremediation agent for biological wastewater treatments. *Water*, 9(2), 108. <https://doi.org/10.3390/w9020108>
53. Cui, M., Ma, A., Qi, H., Zhuang, X., & Zhuang, G. (2015). Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. *Microbiology Open*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.232>
54. Dahl C. (1996). Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. *Microbiology (Reading, England)*, 142(12), 3363–3372. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3363>

55. Dahl, C. (2017). Sulfur metabolism in phototrophic bacteria. In *Hallenbeck, P. (eds) Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51365-2_2
56. Dahl, C. (2020). A biochemical view on the biological sulfur cycle. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineering*, 2, 55–96. https://doi.org/10.2166/9781789060966_0055
57. Dahl, C., Franz, B., Hensen, D., Kesselheim, A., & Zigann, R. (2013). Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process. *Microbiology (Reading, England)*, 159(12), 2626–2638. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071019-0>
58. Denkmann, K., Grein, F., Zigann, R., Siemen, A., Bergmann, J., van Helmont, S., Nicolai, A., Pereira, I. A., & Dahl, C. (2012). Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic c-type cytochrome. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2673–2688. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02820.x>
59. Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36, 65–469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
60. Dhillon, A., Goswami, S., Riley, M., Teske, A., & Sogin, M. (2005). Domain evolution and functional diversification of sulfite reductases. *Astrobiology*, 5(1), 18–29. <https://doi.org/10.1089/ast.2005.5.18>
61. Dunstan, R. H., Kelley, B. C., & Nicholas, D. J. (1982). Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans. *Journal of Bacteriology*, 150(1), 100–104. <https://doi.org/10.1128/jb.150.1.100-104.1982>
62. Dutton, P. L., & Evans, W. C. (1969). The metabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris*. A new, reductive, method of aromatic ring metabolism. *The Biochemical journal*, 113(3), 525–536. <https://doi.org/10.1042/bj1130525>

63. Einsle O. (2011). Structure and function of formate-dependent cytochrome c nitrite reductase, NrfA. *Methods in enzymology*, 496, 399–422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00016-6>
64. Ermler, U., Fritsch, G., Buchanan, S. K., & Michel, H. (1994). Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions. *Structure*, 2(10), 925–936. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(94\)00094-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(94)00094-8)
65. Fascetti, E., D'addario, E., Todini, O., & Robertiello, A. (1998). Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(9), 753–760.
66. Fixen, K. R., Oda, Y., & Harwood, C. S. (2019). Redox regulation of a light-harvesting antenna complex in an anoxygenic phototroph. *MBio*, 10(6), e02838-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02838-19>
67. Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., & Fischer, J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2873–2882. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2873-2882.2001>
68. Frigaard N. U. (2016). Biotechnology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Advances in biochemical engineering biotechnology*, 156, 139–154. https://doi.org/10.1007/10_2015_5006
69. Frigaard, N. U., & Dahl, C. (2009). Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Advances in microbial physiology*, 54, 103–200. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00002-7)
70. Frigaard, N. U., Larsen, K. L., & Cox, R. P. (1996). Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs. *FEMS microbiology ecology*, 20(2), 69–77.
71. Gabrielyan, L., Sargsyan, H., & Trchounian, A. (2016). Biohydrogen production by purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: Effect of low-intensity

- electromagnetic irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology. B: Biology*, 162, 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.039>
72. Gadkari, S., Shemfe, M., & Sadhukhan, J. (2019). Microbial fuel cells: a fast converging dynamic model for assessing system performance based on bioanode kinetics. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(29), 15377–15386. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.065>
73. George, D. M., Vincent, A. S., & Mackey, H. R. (2020). An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable Resource recovery. *Biotechnology reports*, 28, e00563. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00563>
74. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., & Krieg, N. R. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology.
75. Ghosh, S., Dairkee, U. K., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2017). Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using purple non-sulfur bacteria (PNSB) – a review. *Energy Conversion and Management*, 141, 299–314.
76. Gibson, J., & Harwood, C. S. (1995). Degradation of aromatic compounds by nonsulfur purple bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (pp. 991–1003). Springer, Dordrecht.
77. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2017). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer.
78. Granger, D. L., Taintor, R. R., Boockvar, K. S., & Hibbs, J. B., Jr (1996). Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods in enzymology*, 268, 142–151. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)68016-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)68016-1)
79. Grattieri, M. (2020). Purple bacteria photo-bioelectrochemistry: enthralling challenges and opportunities. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19, 424–435. <https://doi.org/10.1039/c9pp00470j>
80. Griffin, B. M., Schott, J., & Schink, B. (2007). Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis. *Science*, 316 (5833), 1870. <https://doi.org/10.1126/science.1139478>

81. Guo, W. Q., Ren, N. Q., Wang, X. J., Xiang, W. S., Meng, Z. H., Ding, J., ... & Zhang, L. S. (2008). Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4981–4988.
82. Hansen, T. A., & van Gemerden, H. (1972). Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 86(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/BF00412399>
83. Hemp, J., Lücker, S., Schott, J., Pace, L. A., Johnson, J. E., Schink, B., Daims, H., & Fischer, W. W. (2016). Genomics of a phototrophic nitrite oxidizer: insights into the evolution of photosynthesis and nitrification. *The ISME journal*, 10(11), 2669–2678. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.56>
84. Hensen, D., Sperling, D., Trüper, H. G., Brune, D. C., & Dahl, C. (2006). Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Molecular microbiology*, 62(3), 794–810. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05408.x>
85. Hiraishi, A., & Okamura, K. (2017). *Rhodopseudomonas telluris* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from paddy soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(9), 3369–3374. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002120>
86. Hiraishi, A., & Ueda, Y. (1994). *Rhodoplanes* gen. nov., a New Genus of Phototrophic Bacteria Including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 665–673. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-665>
87. Hiraishi, A., Nagao, N., Yonekawa, C., Umekage, S., Kikuchi, Y., Eki, T., & Hirose, Y. (2020). Distribution of phototrophic purple nonsulfur bacteria in massive blooms in coastal and wastewater ditch environments. *Microorganisms*, 8(2), 150. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020150>
88. Huang, J. J., Heiniger, E. K., McKinlay, J. B., & Harwood, C. S. (2010). Production of hydrogen gas from light and the inorganic electron donor thiosulfate by *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and environmental microbiology*, 76(23), 7717–7722. <https://doi.org/10.1128/AEM.01143-10>

89. Hubas, C., Boeuf, D., Jesus, B., Thiney, N., Bozec, Y., & Jeanthon, C. (2017). A Nanoscale Study of Carbon and Nitrogen Fluxes in Mats of Purple Sulfur Bacteria: Implications for Carbon Cycling at the Surface of Coastal Sediments. *Frontiers in microbiology*, 8, 1995. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01995>
90. Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., & Beatty, J. T. (Eds.). (2009). *The purple phototrophic bacteria*, 28 (3). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
91. Imhoff, J. F. (2001). True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. *Archives of microbiology*, 176, 243–254. <https://doi.org/10.1007/s002030100326>
92. Imhoff, J. F. (2014). “The family chromatiaceae”. In *The Prokaryotes*, eds E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (pp. 151–178). Berlin: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_295
93. Imhoff, J. F. (2017). Diversity of anaerobic anoxygenic phototrophic purple bacteria. In *Modern topics in the phototrophic prokaryotes* (pp. 47–85). Springer, Cham.
94. Imhoff, J. F., Rahn, T., Künzel, S., & Neulinger, S. C. (2019). Phylogeny of Anoxygenic Photosynthesis Based on Sequences of Photosynthetic Reaction Center Proteins and a Key Enzyme in Bacteriochlorophyll Biosynthesis, the Chlorophyllide Reductase. *Microorganisms*, 7(11), 576. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110576>
95. Imhoff, J. F., Then, J., Hashwa, F., & Trüper, H. G. (1981). Sulfate assimilation in *Rhodopseudomonas globiformis*. *Archives of Microbiology*, 130(3), 234–237. <https://doi.org/10.1007/BF00459525>
96. Julian, D., April, K. L., Patel, S., Stein, J. R., & Wohlgenuth, S. E. (2005). Mitochondrial depolarization following hydrogen sulfide exposure in erythrocytes from a sulfide-tolerant marine invertebrate. *Journal of Experimental Biology*, 208(21), 4109–4122. <https://doi.org/10.1242/jeb.01867>
97. Karr, E. A., Sattley, W. M., Jung, D. O., Madigan, M. T., & Achenbach, L. A. (2003). Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen Antarctic lake. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4910–4914. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4910-4914.2003>

98. Keppen, O. I., Krasil'nikova, E. N., Lebedeva, N. V., & Ivanovskii, R. N. (2013). Comparative study of metabolism of the purple photosynthetic bacteria grown in the light and in the dark under anaerobic and aerobic conditions. *Microbiology*, 82(5), 534–541.
99. Kerem, Z., Bravdo, B. A., Shoseyov, O., & Tugendhaft, Y. (2004). Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography A*, 1052(1-2), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.105>.
100. Kim, B. H., Kim, H. J., Hyun, M. S., & Park, D. H. (1999). Direct electrode reaction of Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 127–131.
101. Kimble-Long, L. K., & Madigan, M. T. (2002). Irradiance effects on growth and bacteriochlorophyll content of phototrophic heliobacteria, purple and green photosynthetic bacteria. *Photosynthetica*, 40(4), 629–632.
102. Kis, M., Asztalos, E., Sipka, G., & Maróti, P. (2014). Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells. *Photosynthesis research*, 122(3), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0026-4>
103. Klamt, S., Grammel, H., Straube, R., Ghosh, R., & Gilles, E. D. (2008). Modeling the electron transport chain of purple non-sulfur bacteria. *Molecular systems biology*, 4, 156. <https://doi.org/10.1038/msb4100191>
104. Kraft, B. (2014). *Competition in nitrate-reducing microbial communities* (Doctoral dissertation, University of Bremen, Germany).
105. Kramer, D. M., Nitschke, W., & Cooley, J. W. (2009). The cytochrome *bc*₁ and related bc complexes: The Rieske/cytochrome *b* complex as the functional core of a central electron/proton transfer complex. In *The purple phototrophic bacteria* (pp. 451–473). Springer, Dordrecht.
106. Kroneck, P. M., & Abt, D. J. (2002). Molybdenum in nitrate reductase and nitrite oxidoreductase. *Metal ions in biological systems*, 39, 369–403.

107. Kulichevskaya, I. S., Guzev, V. S., Gorlenko, V. M., Liesack, W., & Dedysh, S. N. (2006). *Rhodoblastus sphagnicola* sp. nov., a novel acidophilic purple non-sulfur bacterium from Sphagnum peat bog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6), 1397–1402. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63962-0>
108. Kumar, B. V., Ramprasad, E. V. V., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2013). *Rhodopseudomonas pentothentexigens* sp. nov. and *Rhodopseudomonas thermotolerans* sp. nov., isolated from paddy soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 200–207. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038620-0>
109. Kurwadkar S. (2019). Occurrence and distribution of organic and inorganic pollutants in groundwater. *Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation*, 91(10), 1001–1008. <https://doi.org/10.1002/wer.1166>
110. Laurinavichene, T., & Tsygankov, A. (2018). Inoculum density and buffer capacity are crucial for H₂ photoproduction from acetate by purple bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(41), 18873–18882.
111. Li, P., Karunanidhi, D., Subramani, T., & Srinivasamoorthy, K. (2021). Sources and consequences of groundwater contamination. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 80(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00805-z>
112. Madigan, M. T., & Jung, D. O. (2009). An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats. The purple phototrophic bacteria. *Springer*, 1–15.
113. Madigan, M. T., Jung, D. O., Woese, C. R., & Achenbach, L. A. (2000). *Rhodoferax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. *Archives of microbiology*, 173(4), 269–277. <https://doi.org/10.1007/s002030000140>
114. Masepohl, B., & Hallenbeck, P. C. (2010). Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Advances in experimental medicine and biology*, 675, 49–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_4
115. Masepohl, B., & Hallenbeck, P. C. (2010). Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Recent*

Advances in Phototrophic Prokaryotes, 675, 49–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_4

116. McGrath, J. E., & Harfoot, C. G. (1997). Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3333–3335. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3333-3335.1997>

117. McKinlay, J. B., & Harwood, C. S. (2010). Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11669–11675. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006175107>

118. Mehrabi, S., Ekanemesang, U. M., Aikhionbare, F. O., Kimbro, K. S., & Bender, J. (2001). Identification and characterization of *Rhodopseudomonas* spp., a purple, non-sulfur bacterium from microbial mats. *Biomolecular engineering*, 18(2), 49–56. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(01\)00086-7](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(01)00086-7)

119. Merugu, R., Garimella, S., Kudle, K. R., Malothu, R., Eppakayala, L. (2017). An update on bioremediation potentials of purple non sulphur phototrophic bacteria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 1530–1537.

120. Merugu, R., Prashanthi, Y., Sarojini, T., & Badgu, N. (2014). Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology*, 4(1), 16–19.

121. Meyer, B., Imhoff, J. F., & Kuever, J. (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environmental microbiology*, 9(12), 2957–2977. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01407.x>

122. Meyer, T. E., & Cusanovich, M. A. (2003). Discovery and characterization of electron transfer proteins in the photosynthetic bacteria. *Photosynthesis research*, 76(1-3), 111–126. <https://doi.org/10.1023/A:1024910323089>

123. Michalski, W. P., & Nicholas, D. J. D. (1988). Identification of two new denitrifying strains of *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS microbiology letters*, 52(3), 239–243. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02603.x>

124. Moroz, O. M., Zvir, G. I., & Hnatysh, S. O. (2021). Nitrite oxidation by phototrophic bacteria of *Chlorobium*, *Thiocapsa* and *Lamprocystis* genera under the influence of inorganic pollutants. *Biosystems Diversity*, 29(1), 39–46. <https://doi.org/10.15421/012106>
125. Mothersole, D. J., Farmer, D. A., Hitchcock, A., Hunter, C. N., Croce, R., van Grondelle, R., ... & van Stokkum, I. (2018). Photosynthetic apparatus in purple bacteria. In *Light Harvesting in Photosynthesis* (pp. 95–120). CRC Press. <https://doi.org/10.3390/ma12213554>.
126. Nagashima, K. V., Hiraishi, A., Shimada, K., & Matsuura, K. (1997). Horizontal transfer of genes coding for the photosynthetic reaction centers of purple bacteria. *Journal of molecular evolution*, 45(2), 131–136. <https://doi.org/10.1007/pl00006212>
127. Nelis, H. J., & De Leenheer, A. P. (1989). Profiling and quantitation of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection. *Applied and environmental microbiology*, 55(12), 3065–3071. <https://doi.org/10.1128/aem.55.12.3065-3071.1989>
128. Neumann, S., Wynen, A., Trüper, H. G., & Dahl, C. (2000). Characterization of the *cys* gene locus from *Allochromatium vinosum* indicates an unusual sulfate assimilation pathway. *Molecular biology reports*, 27(1), 27–33. <https://doi.org/10.1023/a:10070584217>
129. Neutzling, O., Imhoff, J. F., & Trüper, H. G. (1984). *Rhodopseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the *Rhodospirillaceae*, dependent on reduced sulfur compounds. *Archives of microbiology*, 137(3), 256–261. <https://doi.org/10.1007/BF004145>
130. Nozawa, T., Fukada, T., Hatano, M., & Madigan, M. T. (1986). Organization of intracytoplasmic membranes in a novel thermophilic purple photosynthetic bacterium as revealed by absorption, circular dichroism and emission spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 852(2–3), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90223-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90223-9).

131. Oda, Y., Star, B., Huisman, L. A., Gottschal, J. C., & Forney, L. J. (2003). Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5186–5191. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5186-5191.2003>
132. Olmo-Mira, M. F., Cabello, P., Pino, C., Martínez-Luque, M., Richardson, D. J., Castillo, F., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2006). Expression and characterization of the assimilatory NADH-nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Archives of microbiology*, 186(4), 339–344. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0149-x>
133. O'Toole, G. A. (2016). Classic spotlight: How the gram stain works. *Journal of bacteriology*, 198(23), 3128–3128. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-16>
134. Overmann, J. (2013). Mahoney Lake: A Case Study of the Ecological Significance of Phototrophic. *Advances in Microbial Ecology*, 15, 251–288.
135. Overmann, J., Beatty, J. T., & Hall, K. J. (1996). Purple sulfur bacteria control the growth of aerobic heterotrophic bacterioplankton in a meromictic salt lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3251–3258. <https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3251-3258.1996>
136. Ozaki, K., Thompson, K. J., Simister, R. L., Crowe, S. A., & Reinhard, C. T. (2019). Anoxygenic photosynthesis and the delayed oxygenation of Earth's atmosphere. *Nature communications*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10872-z>.
137. Ozaki, K., Thompson, K. J., Simister, R. L., Crowe, S. A., & Reinhard, C. T. (2019). Anoxygenic photosynthesis and the delayed oxygenation of Earth's atmosphere. *Nature communications*, 10(1), 3026. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10872-z>
138. Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants*, 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>
139. Peters, D. G., Hayes, J. M., Hieftje, G. M., & Fischer, R. B. (1974). Chemical separations and measurements: theory and practice of analytical chemistry. Philadelphia, Saunders.

140. Petushkova, E., Iuzhakov, S., & Tsygankov, A. (2019). Differences in possible TCA cycle replenishing pathways in purple non-sulfur bacteria possessing glyoxylate pathway. *Photosynthesis research*, *139*(1), 523–537. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0581-1>
141. Pfennig, N. (1969). *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. *Journal of Bacteriology*, *99*(2), 597–602. <https://doi.org/10.1128/jb.99.2.597-602.1969>
142. Pfennig, N. (1974). *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Archives of Microbiology*, *100*, 197–206. <https://doi.org/10.1007/BF00414554>
143. Pfennig, N. (1980). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a Ring-Shaped, Vitamin B₁₂-requiring Member of the Family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *30*(1), 224–224. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-2-283>
144. Pino, C., Olmo-Mira, F., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Castillo, F., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2006). The assimilatory nitrate reduction system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Biochemical Society transactions*, *34*(1), 127–129. <https://doi.org/10.1042/BST0340127>
145. Pott, R. W., Howe, C. J., & Dennis, J. S. (2013). Photofermentation of crude glycerol from biodiesel using *Rhodopseudomonas palustris*: comparison with organic acids and the identification of inhibitory compounds. *Bioresource technology*, *130*, 725–730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.126>
146. Prange, A., Chauvistré, R., Modrow, H., Hormes, J., Trüper, H. G., & Dahl, C. (2002). Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology*, *148*(1), 267–276. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-267>
147. Prange, A., Engelhardt, H., Trüper, H. G., & Dahl, C. (2004). The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR. *Archives of microbiology*, *182*(2-3), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0683-3>

148. Prytula, I. R., & Tashyrev, O. B. (2013). Application of Redox Indicators for Measuring Redox Potential in Growing Cultures of Microorganisms. *Studia Biologica*, 7(3), 133–144.
149. Rajani, B., Sunil Kumar, R., Uma Devi, M., Nayak, J. (2016). B Role of purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* RSOU000 and *Rhodopseudomonas thermotolerance* RSOU555 in waste water treatment. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(8), 1379–1387.
150. Ramana, V. V., Chakravarthy, S. K., Raj, P. S., Kumar, B. V., Shobha, E., Ramaprasad, E. V. V., Ramaprasad, E. V., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2012). Descriptions of *Rhodopseudomonas parapalustris* sp. nov., *Rhodopseudomonas harwoodiae* sp. nov. and *Rhodopseudomonas pseudopalustris* sp. nov., and emended description of *Rhodopseudomonas palustris*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(8), 1790–1798. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.026815-0>
151. Raymond, J. C., & Sistrom, W. R. (1969). *Ectothiorhodospira halophila*: a new species of the genus *Ectothiorhodospira*. *Archiv für Mikrobiologie*, 69(2), 121–126. <https://doi.org/10.1007/BF00409756>
152. Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., & Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 363(1829), 971–1040. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1539>
153. Reich, P. B., Hungate, B. A., & Luo, Y. (2006). Carbon-nitrogen interactions in terrestrial ecosystems in response to rising atmospheric carbon dioxide. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 611–636.
154. Rey, F. E., Heiniger, E. K., & Harwood, C. S. (2007). Redirection of metabolism for biological hydrogen production. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1665–1671. <https://doi.org/10.1128/AEM.02565-06>
155. Richardson, D. J., Berks, B. C., Russell, D. A., Spiro, S., & Taylor, C. J. (2001). Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(2), 165–178. <https://doi.org/10.1007/PL00000845>

156. Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A. M., Ingvarsdén, S., Schmid, M. C., Jetten, M. S., den Camp, H. J., Derksen, J. W., Pina-Ochoa, E., Eriksson, S. P., Nielsen, L. P., & Revsbech, N. P. (2006). Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature*, *443*(7107), 93–96. <https://doi.org/10.1038/nature05070>
157. Sander, J., & Dahl, C. (2009). Metabolism of inorganic sulfur compounds in purple bacteria. In *The purple phototrophic bacteria* (pp. 595–622). Springer, Dordrecht.
158. Sattley, W. M., & Madigan, M. T. (2006). Isolation, characterization, and ecology of cold-active, chemolithotrophic, sulfur-oxidizing bacteria from perennially ice-covered Lake Fryxell, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(8), 5562–5568. <https://doi.org/10.1128/AEM.00702-06>
159. Schott, J., Griffin, B. M., & Schink, B. (2010). Anaerobic phototrophic nitrite oxidation by *Thiocapsa* sp. strain KS1 and *Rhodopseudomonas* sp. strain LQ17. *Microbiology*, *156*(8), 2428–2437. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036004-0>
160. Schultz, J. E., & Weaver, P. F. (1982). Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of bacteriology*, *149*(1), 181–190. <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.181-190.1982>
161. Sepúlveda-Muñoz, C. A., de Godos, I., & Muñoz, R. (2023). Wastewater Treatment Using Photosynthetic Microorganisms. *Symmetry*, *15*(2), 525. <https://doi.org/10.3390/sym15020525>
162. Singh, S. P., Srivastava, S. C., & Pandey, K. D. (1994). Hydrogen production by *Rhodopseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, *19*(5), 437–440.
163. Sirevag, R. (2021). Thermophilic phototrophs. In *Thermophilic bacteria* (pp. 195–219). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003068334>.
164. Stöckl, M., Teubner, N. C., Holtmann, D., Mangold, K. M., & Sand, W. (2019). Extracellular polymeric substances from *Geobacter sulfurreducens* biofilms in microbial fuel cells. *ACS applied materials & interfaces*, *11*(9), 8961–8968. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14340>
165. Stolz, J. F., & Basu, P. (2002). Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. *Chembiochem: European journal of*

chemical biology, 3(2-3), 198–206. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020301\)3:2/3<198::AID-CBIC198>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020301)3:2/3<198::AID-CBIC198>3.0.CO;2-C)

166. Sugiyama, M. (2002). Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide. Patent US №6340596 B1.

167. Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Cheng, Q. (2021). Nitrogen Fixation and Diazotrophs – A Review. *Rom Biotechnol Lett*, 26(4), 2834–2845.

168. Swem, D. L., & Bauer, C. E. (2002). Coordination of ubiquinol oxidase and cytochrome cbb(3) oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of bacteriology*, 184(10), 2815–2820. <https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2815-2820.2002>

169. Takaichi, S. (2009). Distribution and biosynthesis of carotenoids. In *The purple phototrophic bacteria* (pp. 97–117). Springer, Dordrecht.

170. Tanabe, T. S., Leimkühler, S., & Dahl, C. (2019). The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA. *Advances in microbial physiology*, 75, 233–277. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.07.004>

171. Tang, K. H., Tang, Y. J., & Blankenship, R. E. (2011). Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications. *Frontiers in microbiology*, 2, 165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00165>

172. Tang, W., Cerdán-García, E., Berthelot, H., Polyviou, D., Wang, S., Baylay, A., Whitby, H., Planquette, H., Mowlem, M., Robidart, J., & Cassar, N. (2020). New insights into the distributions of nitrogen fixation and diazotrophs revealed by high-resolution sensing and sampling methods. *The ISME journal*, 14(10), 2514–2526. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0703-6>

173. Tanisho, S. (1996). Feasibility study of biological hydrogen production from sugar cane by fermentation. *Hydrogen Energy Progress*, 3, 2601–2606.

174. Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W., & Zhou, Z. (2008). Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(3), 963–973. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.11.021>

175. Tarabas, O. V., Hnatush, S. O., Tashyrev, O. B., Hovorukha, V. M., Havryliuk, O. A., Moroz, O. M., & Halushka, A. A. (2021). Production of hydrogen by purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii* IMV B-7620. *Mikrobiologichnij Zhurnal*, *83*(5), 19–29. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.05.019>
176. Tarabas, O. V., Hnatush, S. O., & Moroz, O. M. (2019). The usage of nitrogen compounds by purple non-sulfur bacteria of the *Rhodopseudomonas* genus. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, *10*(1), 83–86. <https://doi.org/10.15421/021913>
177. Then, J., & Trüper, H. G. (1981). The role of thiosulfate in sulfur metabolism of *Rhodopseudomonas globiformis*. *Archives of Microbiology*, *130*, 143–146. <https://doi.org/10.1007/BF00411067>
178. Thomas, J., & Gemming, T. (2014). *Analytical transmission electron microscopy: an introduction for operators*. Springer Science & Business.
179. Uffen, R. L., Clayton, R. K., & Sistrom, W. R. (1978). Fermentative metabolism and growth of photosynthetic bacteria. *The photosynthetic bacteria*. New York: Plenum Press, 857–872.
180. Venkidusamy, K., & Megharaj, M. (2016). A novel electrophototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain RP2, exhibits hydrocarbonoclastic potential in anaerobic environments. *Frontiers in microbiology*, *7*(1071), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01071>
181. Wang, R., Lin, J. Q., Liu, X. M., Pang, X., Zhang, C. J., Yang, C. L., Gao, X. Y., Lin, C. M., Li, Y. Q., Li, Y., Lin, J. Q., & Chen, L. X. (2019). Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp. *Frontiers in microbiology*, *9*, 32–90. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03290>
182. Wang, Y. Z., Liao, Q., Zhu, X., Tian, X., & Zhang, C. (2010). Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodopseudomonas palustris* CQK 01 in an immobilized-cell photobioreactor. *Bioresource technology*, *101*(11), 4034–4041. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.045>
183. Watmough, N. J., Butland, G., Cheesman, M. R., Moir, J. W., Richardson, D., & Spiro, S. (1999). Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochimica et*

Biophysica Acta-Bioenergetics, 1411(2-3), 456–474. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00032-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00032-8)

184. Weissgerber, T., Sylvester, M., Kröninger, L., & Dahl, C. (2014). A comparative quantitative proteomic study identifies new proteins relevant for sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Applied and environmental microbiology*, 80(7), 2279–2292. <https://doi.org/10.1128/AEM.04182-13>

185. Weissgerber, T., Zigann, R., Bruce, D., Chang, Y. J., Detter, J. C., Han, C., Hauser, L., Jeffries, C. D., Land, M., Munk, A. C., Tapia, R., & Dahl, C. (2011). Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T). *Standards in genomic sciences*, 5(3), 311–330. <https://doi.org/10.4056/sigs.2335270>

186. Wu, B., Liu, F., Fang, W., Yang, T., Chen, G. H., He, Z., & Wang, S. (2021). Microbial sulfur metabolism and environmental implications. *Science of The Total Environment*, 146–185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146085>

187. Wu, G., Zhang, T., Gu, M., Chen, Z., & Yin, Q. (2020). Review of characteristics of anammox bacteria and strategies for anammox start-up for sustainable wastewater resource management. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 82(9), 1742–1757. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.443>

188. Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2008). Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environmental science & technology*, 42(11), 4146–4151. <https://doi.org/10.1021/es800312v>

189. Yang, A., Zhang, G., Meng, F., Zhi, R., Zhang, P., & Zhu, Y. (2019). Nitrogen metabolism in photosynthetic bacteria wastewater treatment: a novel nitrogen transformation pathway. *Bioresource technology*, 294, 122–162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122162>

190. Zaar, A., Fuchs, G., Golecki, J. R., & Overmann, J. (2003). A new purple sulfur bacterium isolated from a littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov. *Archives of microbiology*, 179(3), 174–183. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0514-3>

191. Zengler, K., Heider, J., Rossello-Mora, R., & Widdel, F. (1999). Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris*

- sulfoviridis*. *Archives of microbiology*, 172(4), 204–212.
<https://doi.org/10.1007/s002030050761>
192. Zhan, Y., Yang, M., Zhang, S., Zhao, D., Duan, J., Wang, W., & Yan, L. (2019). Iron and sulfur oxidation pathways of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(4), 60. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2632-y>
193. Zhang, D., Yang, H., Huang, Z., Zhang, W., & Liu, S. J. (2002). *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2055–2060. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2055>
194. Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical Reviews*, 120(12), 5308–5351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>
195. Zimmer, S., Messmer, M., Haase, T., Piepho, H. P., Mindermann, A., Schulz, H., Habekuß, A., Ordon, F., Wilbois, K. P., & Heß, J. (2016). Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. *European Journal of Agronomy*, 72, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.09.008>
196. Zumft, W. G., & Kroneck, P. M. (2006). Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. *Advances in microbial physiology*, 52, 107–227. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)52003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)52003-X)
197. Zuo, Y., Xing, D., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2008). Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3130–3137. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-07>

Список публікацій здобувача:

За результатами дисертації опубліковано 27 наукових праць, серед них – 7 статей у фахових журналах (із них 2 – у виданнях бази Scopus, 1 – у виданні бази Web of Science), 1 свідоцтво про депонування штаму бактерій, 1 патент на корисну модель і 18 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Статті

(* – особистий внесок здобувача)

1. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Василечко, В. О., Грищук, Г. В., Звір, Г. І., & Комплікевич, С. Я. (2017). Використання сульфід- та тіосульфат-іонів пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii*. *Biosystems Diversity*, 25(3), 181–185. <https://doi.org/10.15421/011727> (*проведено дослідження закономірностей окиснення сульфід- і тіосульфат-іонів бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016, участь у написанні й оформленні публікації).

2. **Tarabas, O. V.**, Hnatush, S. O., & Moroz, O. M. (2019). The usage of nitrogen compounds by purple non-sulfur bacteria of the *Rhodopseudomonas* genus. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(1), 83–86. <https://doi.org/10.15421/021913> (*проведено дослідження закономірностей використання нітрит-іонів, участь у написанні й оформленні публікації).

3. **Тарабас, О.**, Мороз, О., Гнатуш, С., Яворська, Г., Звір, Г., & Ковальчук, М. (2017). Еколого-трофічні групи мікроорганізмів води озера Яворівське. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (76), 166–178. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.76.21> (*проведено дослідження фізико-хімічних властивостей води озера Яворівське та водойми заповідника Розточчя, визначено чисельність мікроорганізмів різних груп, участь у написанні й оформленні публікації).

4. **Тарабас, О.**, Гнатуш, С., Осташ, Б., Мутенко, Г., & Кошла, О. (2017б). Ідентифікація пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (75), 140–145. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.75.15> (*проведено дослідження морфологічних характеристик бактерій, участь у виділенні сумарної ДНК та проведенні ПЛР, у написанні й оформленні публікації).

5. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Галушка, А. А., & Мороз, О. М. (2018). Пігменти *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *Мікробіологія і біотехнологія*, 1(41), 57–65. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).120468](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).120468) (*отримала зразки пігментів клітин, участь у їхній ідентифікації, у написанні й оформленні публікації).

6. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Ковальчук, М. М. (2019). Біоремедіація стічних вод за використання фототрофних несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *Екологія та ноосферологія*, 30(2), 63–67. <https://doi.org/10.15421/03193002> (*проведено дослідження нагромадження біомаси бактеріями за росту у стічних водах, деяких хімічних характеристик цих вод, участь у написанні й оформленні публікації).

7. **Tarabas, O. V.**, Hnatysh, S. O., Tashyrev, O. V., Novorukha, V. M., Havryliuk, O. A., Moroz, O. M., & Halushka, A. A. (2021). Production of hydrogen by purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii* IMV B-7620. *Mikrobiologichnij Zhurnal*, 83(5), 19–29. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.05.019> (*проведено дослідження нагромадження біомаси бактеріями за росту в середовищах із різними органічними сполуками і визначення окисно-відновного потенціалу та рН, участь у визначенні вмісту газу у складі газової фази, вмісту органічних кислот у культуральній рідині, у написанні й оформленні публікації).

Патенти (свідоцтва про право автора на корисну модель) України

1. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М., Осташ, Б. О. (2017). Свідоцтво про депонування штаму бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* Ya-2016 у

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України з наданням реєстраційного номеру ІМВ В-7620.

2. Гнатуш, С. О., **Тарабас, О. В.**, Василів, О. М., Масловська, О. Д., Мороз, О. М. Пат. 132187 Україна, МПК Н01М 8/00; Н01М 8/16; Н01М 8/22. Спосіб одержання електричного струму у мікробному паливному елементі. Заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. № u201809830; заявл. 02.10.2018; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3.

Тези доповідей і матеріали конференцій, з'їздів

1. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О. Оптимізація умов культивування пурпурових фототрофних бактерій. *Молодь і поступ біології: XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 19–21 квітня 2016 р.). Львів, 2016. С. 230–231.

2. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Мороз, О. М. Використання донорів електронів пурпуровими фототрофними сіркобактеріями. *Досягнення та перспективи розвитку мікробіології: Міжнародна наукова конференція* (Львів, 12–14 жовтня 2016 р.). Львів: СПОЛОМ, 2016. С. 63.

3. Шегинська, М. В., Мороз, О. М., Звір, Г. І., **Тарабас, О. В.**, Гнатуш С. О. Утилізація гідроген сульфід у фототрофними сіркобактеріями за різних його концентрацій у середовищі. *Молодь і поступ біології: XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 19–21 квітня 2016 р.). Львів, 2016. С. 229–230.

4. **Тарабас, О.**, Гнатуш, С., Мороз, О., Комплікевич, С., Захарко, С. Використання гідроген сульфід у пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. *Молодь і поступ біології: XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 25–27 квітня 2017 р.). Львів, 2017. С. 198–199.

5. **Тарабас, О. В.**, Гнатуш, С. О., Остап, Б. О., Мороз, О. М., Мутенко, Г. В., Іжовська, І. М. Визначення чутливості бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 до антибіотиків. *XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського* (Одеса, 11–15 вересня 2017 р.). Одеса, 2017. С. 150.

6. **Tarabas, O.**, Moroz, O., Hnatush, S., Yavorska, G., Zvir, G., Borsukevych, B., Izhovska, I. Ecological trophic groups of microorganisms of Yavorivske lake water. *7th International Weigl Conference* (Lviv, 2017 September 26–29). Lviv, 2017. P.150.
7. **Tarabas, O.**, Hnatush, S., Govorukha, V., Tashyrev, O., Moroz, O. Production of molecular hydrogen by purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. *7th International Weigl Conference* (Lviv, 2017 September 26–29). Lviv, 2017. P.188.
8. Комплікевич, С., **Тарабас, О.**, Верига, Л., Василів, О., Іжовська, І. Ріст бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 за впливу ферум (III) цитрату. *Біологія: від молекули до біосфери: XI Міжнародна конференція молодих учених* (Харків, 29 листопада – 1 грудня 2017 р.). Харків, 2017. С.79.
9. Верига, Л., **Тарабас, О.**, Мороз, О., Звір, Г., Масловська, О., Комплікевич, С. Фототрофні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 230–231.
10. Гордій, Г., Павлюх, Х., Мороз, О., Яворська, Г., **Тарабас, О.** Сульфат- та сірководновловальні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 233.
11. Горошок, Х., Василів, О., **Тарабас, О.**, Гнатуш, С. *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384 та *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 як анодні біокаталізатори однокамерної біоелектрохімічної системи. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 233–234.
12. Кацюба, А., Мороз, О., Яворська, Г., **Тарабас, О.** Олігонітрофільні та нітрифікувальні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 240–241.
13. Комплікевич, С., **Тарабас, О.**, Гнатуш, С. Використання ферум (III) цитрату бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B- 7620. *Молодь і поступ*

біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 243–244.

14. Павлишин, І., Мороз, О., **Тарабас, О.**, Борсукевич, Б. Сірководокиснювальні і целюлозоруйнівальні бактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології*: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 247–248.

15. Пастух, Н., Мороз, О., Яворська, Г., **Тарабас, О.** Чисельність актинобактерій у воді озера Яворівське. *Молодь і поступ біології*: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 250–251.

16. Тиндик, І., **Тарабас, О.**, Мороз, О., Звір, Г. Денітрифікувальні бактерії і ціанобактерії води озера Яворівське. *Молодь і поступ біології*: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 257–258.

17. Комплікевич, С., **Тарабас, О.**, Верига, Л., Масловська, О., Гнатуш, С. Використання ферум (III) цитрату бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620 упродовж культивування та іммобілізованими клітинами. “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. *Bioscience advances*”: XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених (Київ, 24–27 квітня 2018 р.). Київ, 2018. С. 95–96.

18. **Tarabas, O.**, Hnatysh, S., Vasylyv, O., Maslovska, O., Moroz, O. Electricity generation by *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620. *International Conference: “Advances in Microbiology and Biotechnology”* (Lviv, 2018 October 29–31). Lviv, 2018. P.120.

Таблиця 1 – Інтерпретація результатів у стріпах ID 32 GN

(https://bacdive.dsmz.de/api-test-finder)

№	Тест	Субстрат	Інтерпретація результатів
			Позитивний/Негативний
1	2	3	4
1.0	RHA	L-рамноза	+/-
1.1	NAG	N-ацетилглюкозамін	
1.2	RIB	D-рибоза	
1.3	INO	Інозит	
1.4	SAC	D-сахароза	
1.5	MAL	D-мальтоза	
1.6	ITA	Ітаконова кислота	
1.7	SUB	Пробкова кислота	
1.8	MNT	Натрію малонат	
1.9	ACE	Натрію ацетат	
1.A	LAT	Молочна кислота	
1.B	ALA	L-аланін	
1.C	5KG	Калію 5-кетоглюконат	
1.D	GLYG	Глікоген	
1.E	mOBE	3-гідроксибензойна кислота	
1.F	SER	L-серин	
0.0	MAN	D-маніт	
0.1	GLU	D-глюкоза	
0.2	SAL	Саліцин	
0.3	MEL	D-мелібіоза	
0.4	FUC	L-фукоза	
0.5	SOR	D-сорбіт	

Закінчення табл. 1

1	2	3	4
0.6	ARA	L-арабіноза	
0.7	PROP	Кислота пропіонова	
0.8	CAP	Капринова (деканова) кислота	
0.9	VALT	Валеріанова кислота	
0.A	CIT	Натрію цитрат трьохзаміщений	
0.B	HIS	L-гістидин	
0.C	2KG	Калію 2-кетоглюконат	
0.D	3OBU	3-гідроксимасляна кислота	
0.E	pOBE	4-гідроксибензойна кислота	
0.F	PRO	L-пролін	

Таблиця 2 – Інтерпретація результатів у планшетах RapID™ ONE (RapID ONE System)

№	Код тесту	Хімічно активна сполука	Реакція	
			Позитивна, колір	Негативна, колір
1	URE	Сечовина	Червоний або фіолетовий	Жовтий або оранжевий
2	ADH	Аргінін	Яскраво-пурпуровий або синій	Жовтий, сірий, солом'яний або жовто-зелений
3	ODC	Орнітин		
4	LDC	Лізін		
5	TET	Аліфатичний тіол	Жовтий	Червоний або оранжевий
6	LIP	Складний ефір жирної кислоти		
7	KSF	Цукровий альдегід		
8	SBL	Сорбіт		
9	GUR	<i>n</i> -нітрофенол- β , D-глюкуронід	Жовтий	Безбарвний або жовтувато-коричневий
10	ONPG	<i>o</i> -нітрофенол- β , D-галактозид		
11	β GLU	<i>n</i> -нітрофенол- β , D-глюкозид		
12	β XYL	<i>n</i> -нітрофенол- β , D-ксилозид		
13	NAG	<i>n</i> -нітрофенол- <i>n</i> -ацетил- β , D-глюкозамінід		
14	MAL	Малонат	Червоний	Жовтий або оранжевий
15	PRO	Пролін- β -нафтиламін	Фіолетовий, пурпуровий, червоний або темно-рожевий	Безбарвний, жовтий, оранжевий або блідо-рожевий
16	GGT	γ -глутаміл- β -нафтиламін		
17	PYR	Піролідін- β -нафтиламін		
18	ADON	Адоїнол	Жовтий або світло-оранжевий	Червоний або темно-червоно-оранжевий

Таблиця 1 – Хімічний аналіз води озера Яворівське

Хімічні показники	ГДК (Грушко, 1979)	Глибина, м									Контроль	
		0	5	10	20	30	40	50	60	70		
рН	7,6-8,6	6,8±0,2	7,7±0,3	7,8±0,2	7,6±0,1	7,1±0,4	6,9±0,1	6,8±0,2	6,7±0,3	6,6±0,1	7,8	
МГ/Л	Na ⁺	50	29,7±0,3	29,5±0,2	29,8±1,5	32,5±0,7	36,0±1,2	39,0±0,4	42,0±2,2	42,0±1,1	43,0±1,6	2,9±0,1
	K ⁺	4	6,2±0,3*	6,2±0,4*	7,2±0,7*	8,5±0,3*	9,0±0,2*	10,0±0,4*	10,5±0,1*	10,7±0,2*	10,0±0,3*	1,1±0,2
	Ca ²⁺	550	270,5±3,3*	268,5±2,2*	272,5±1,4*	274,5±3,7*	280,6±3,5*	276,6±2,5*	268,5±1,7*	280,6±2,3*	420,8±1,5*	57,7±3,5
	Mg ²⁺	125	19,4±0,5	20,7±0,9	20,7±0,7	25,5±0,5	51,0±0,4*	60,8±1,2*	105,7±2,3*	100,9±1,9*	109,4±1,5*	13,0±2,7
	HCO ₃ ⁻	240	139,1±1,7	139,1±2,4	141,6±2,8	151,3±1,6	170,8±1,8	170,8±1,8	261,2±2,4	244,1±2,6	395,4±3,4	191,5±2,9
	Cl ⁻	200	24,5±1,2*	25,5±1,4*	25,5±1,6*	24,1±1,2*	24,6±2,0*	26,6±1,5*	26,7±1,7*	25,5±1,3*	34,5±2,4*	7,5±0,3
	SO ₄ ²⁻	250	913,3±6,1*	940,1±4,8*	983,3±3,2*	992,9±3,0*	1142,9±4,5*	929,6±3,4*	1540,8±2,2*	1239,7±1,7*	1529,5±3,9*	34,7±0,1
	NO ₃ ⁻	10,0	0,5±0,1*	1,3±0,1*	1,9±0,1*	1,6±0,1*	0,7±0,2*	0,9±0,3*	1,8±0,4*	1,3±0,4*	2,5±0,5*	6,3±0,2
	P ₂ O ₅	3,0	0,6±0,1	0,6±0,1	0,8±0,2	1,3±0,3	2,4±0,2	8,7±0,6*	15,4±0,5*	25,6±0,5*	69,1±0,8*	2,1±0,1
	NH ₄ ⁺	2,0	0	0	0	0,1±0,0*	2,0±0,1*	2,9±0,2	4,3±0,4*	14,1±0,5*	33,3±0,4*	0,05 ±0,006
H ₂ S+HS ⁻	0,2	0	0	0	0	27,5±0,4*	30,2±0,5*	27,5±0,3*	34,0±0,4*	30,2±0,2*	0,003±0,001	
МГ-ЕКВ/Л	Мінералізація < 7000	1403,8±3,1	1431,5±4,7	1483,3±3,8	1512,3±6,2	1747,5±7,1	1580,6±8,7	2304,4±5,3	2018,5±6,5	2677,7±4,3	223,2±2,8	

Примітка: Контроль – вода джерельного типу заповідника Розточчя ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$); * – вірогідні зміни порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Таблиця 2 – Продукування водню різними штамами пурпурових несіркових бактерій та *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620

Мікроорганізми	Середовище культивування	Максимальний вихід Н ₂ , ммоль Н ₂ × г ⁻¹ сухої маси клітин × год ⁻¹
<i>Rhodospirillum rubrum</i> (Tanisho, 1996)	Органічні речовини	2,5
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (Fascetti et al., 1998)	Лактат із побутових відходів	0,05
<i>Rhodopseudomonas capsulatus</i> (Fascetti et al., 1998)	Ферментовані коров'ячі екскременти	0,3
<i>Rhodopseudomonas</i> sp. (Singh et al., 1994)	Сік цукрової тростини	2,0
<i>Rhodopseudomonas</i> sp. (Singh et al., 1994)	Сироватка	1,1
<i>Rhodobacter</i> sp. штам KКУ-PS1 (Assawamongkholesiri & Reungsang, 2015)	Малат	3,88 ^a
<i>R. yavorovii</i> ІМВ В-7620	Натрію цитрат, 90 мМ	0,03

Примітка: ^a – виражено у моль Н₂ × моль⁻¹ малату

Таблиця 3 – Фізіолого-біохімічні властивості *Rhodopseudomonas yavorovii*

ІМВ В-7620, визначені з використанням RapID ONE тесту

№	Код тесту	Хімічно активна сполука	Реакція
1	URE	Сечовина	+
2	ADH	Аргінін	+
3	ODC	Орнітин	–
4	LDC	Лізін	–
5	TET	Аліфатичний тіол	+
6	LIP	Складний ефір жирної кислоти	+
7	KSF	Цукровий альдегід	–
8	SBL	Сорбіт	+
9	GUR	<i>n</i> -нітрофенол- β , D-глюкуронід	–
10	ONPG	<i>o</i> -нітрофенол- β , D-галактозид	–
11	β GLU	<i>n</i> -нітрофенол- β , D-глюкозид	–
12	β XYL	<i>n</i> -нітрофенол- β , D-ксилозид	–
13	NAG	<i>n</i> -нітрофенол- <i>n</i> -ацетил- β , D-глюкозамінід	–
14	MAL	Малонат	–
15	PRO	Пролін- β -нафтиламін	–
16	GGT	γ -глутаміл- β -нафтиламін	–
17	PYR	Піролідин- β -нафтиламін	–
18	ADON	Адоїнол	+

Примітка: “+” – реакція позитивна; “–” – реакція негативна

Таблиця 4 – Фізіолого-біохімічні властивості *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620, визначені з використанням ID 32 GN тесту

№	Тест	Субстрат	Реакція
1	2	3	4
1.0	RHA	L-рамноза	+
1.1	NAG	N-ацетилглюкозамін	+
1.2	RIB	D-рибоза	–
1.3	INO	Інозит	–
1.4	SAC	D-сахароза	–
1.5	MAL	D-мальтоза	–
1.6	ITA	Ітаконова кислота	+
1.7	SUB	Пробкова кислота	–
1.8	MNT	Натрію малонат	+
1.9	ACE	Натрію ацетат	+
1.A	LAT	Молочна кислота	+
1.B	ALA	L-аланін	+
1.C	5KG	Калій-5-кетоглюконат	–
1.D	GLYG	Глікоген	+
1.E	mOBE	3-гідроксибензойна кислота	–
1.F	SER	L-серин	+
0.0	MAN	D-маніт	+
0.1	GLU	D-глюкоза	+
0.2	SAL	Саліцин	–
0.3	MEL	D-мелібіоза	–
0.4	FUC	L-фукоза	–
0.5	SOR	D-сорбіт	–
0.6	ARA	L-арабіноза	+
0.7	PROP	Кислота пропіонова	–

Закінчення табл. 4

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
0.8	CAP	Капринова (деканова) кислота	+
0.9	VALT	Валеріанова кислота	+
0.A	CIT	Натрію цитрат трьохзаміщений	+
0.B	HIS	L-гістидин	+
0.C	2KG	Калію 2-кетоглюконат	–
0.D	3OBU	3-гідроксимасляна кислота	–
0.E	pOBE	4-гідроксибензойна кислота	–
0.F	PRO	L-пролін	+

Примітка: – “+” реакція позитивна; “–” – реакція негативна