

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ,
ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЙ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____М.М. Барановський
«___»_____2020р.

ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)
ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА
ЗА НАПРЯМОМ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

**Тема: «Особливості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з
біотопу печери "Атлантида"»**

Виконавець: студентка ЕК-203М групи

Бахмацька Д. О.

Керівник: к. с-г. н., доцент кафедри біотехнології

Ястремська Л.С.

Консультант розділу «Охорона праці»:

Павлиш В. Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища»:

Бовсуновський Є.О.

Нормоконтролер:

Лазарев В. Г.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Напрямок (спеціальність, спеціалізація): 162 «Біотехнології та біоінженерія», ОПП
«Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Барановський М.М.

« ____ » _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Бахмацької Дар'ї Олександрівни

1. Тема роботи «Особливості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида"» затверджена наказом ректора від «_» _____ 2019 р. №__ /ст.
2. Термін виконання роботи: з 14 жовтня 2019 року по 29 грудня 2019 року та з 20 січня 2020 року по 09 лютого 2020 року.
3. Вихідні дані роботи: : власні експериментальні дані зроблені на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ, літературні джерела щодо виявлення мідьрезистентних мікроорганізмів; зразки ґрунту печери «Атлантида».
4. Зміст пояснювальної записки: РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: 13 рисунків.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Пошук літературних джерел за темою дипломної роботи	10.10. – 30.10.2019	
2	Оброблення знайденого літературного матеріалу	31.10. – 30.11.2019	
3	Написання основної частини	01.12 – 25.12.2019	
4	Написання висновків	25.12.2019	
5	Оформлення дипломної роботи	01.01. – 09.01.2019	
6	Перевірка дипломної роботи керівником	10.01.2019	
7	Виправлення виявлених недоліків	25.01. – 30.01.2020	
8	Захист дипломної роботи	04.02.2020	

7. Консультанти з окремих розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Старший викладач Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	к.т.н, доцент кафедри екології Бовсуновський Є.О.		

8. Дата видачі завдання: « ____ » _____ 20 __ р.

Керівник дипломної роботи: _____ Ястремська Л.С.
(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання: _____ Бахмацька Д.О.
(підпис випускника)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Особливості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида"»: 90 с., 13 рис., 10 табл., 105 літературних джерела.

МІДЬРЕЗИСТЕНТНІ МІКРООРГАНІЗМИ, ТОКСИЧНІСТЬ, МЕТОДИ ВІДІЛЕННЯ МІДЬРЕЗИСТЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ, КІЛЬКІСНИЙ ОБЛІК, МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ, ПРИРОДНА ЕКОСИСТЕМА

Об'єкт дослідження – процес стійкості та взаємодії мікробного угруповання виділеного с біотопу печери «Атлантида» зі сполуками токсичної міді (II).

Предмет дослідження - мідьрезистентні мікроорганізми виділені з біотопу печери «Атлантида».

Мета роботи: дослідження особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери “Атлантида”.

Методи дослідження: мікробіологічні, хімічні та статистичні.

Досліджено особливості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери “Атлантида”. Виявлено, що найбільш згубний вплив на мікробіоту біотопу печери «Атлантида» проявила дія токсичної міді(II) у формі CuSO_4 , в пелеоґрунті при 175 мг/л Cu^{2+} кількість мікроорганізмів становила $2,46 \times 10^3$ КУО/г, в глині при 200 мг/л Cu^{2+} - $8,6 \times 10^2$ КУО/г. Експериментально виявили, що найбільшу стійкість мікроорганізми проявили при взаємодії з розчином цитрату міді (II). Вперше встановили, що за концентрації 2400 мг/л Cu^{2+} зразок пелеоґрунту містив $1,85 \times 10^3$ КУО/г, зразок глини при концентрації 2000 мг/л містить $5,59 \times 10^3$ КУО/г.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Характеристика міді.....	12
1.2. Участь токсичної міді у метаболізмі мікроорганізмів.....	13
1.3. Механізми стійкості мікроорганізмів до токсичної міді(II).....	16
1.4. Взаємодія мікроорганізмів з токсичною міддю(II).....	18
1.4.1. Мобілізація токсичних металів.....	20
1.4.2. Імобілізація токсичних металів.....	21
1.5. Використання стійких до міді мікроорганізмів у біотехнологіях.....	23
1.5.1. Біоремедіація ґрунтів, забруднені важкими металами.....	23
1.5.2. Очищення стічних вод з важкими металами.....	26
1.6. Висновки до розділу.....	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	29
2.1. Підготовка поживного середовища.....	29
2.2. Приготування серійних розведень суспензії мікроорганізмів.....	32
2.3. Посів на тверде поживне середовище в чашки Петрі.....	33
2.4. Приготування розчинів цитрату $[Cu^{2+} \cdot cit]$ та сульфату $CuSO_4$ міді.....	34
2.5. Методи виявлення мідьрезистентних мікроорганізмів.....	34
2.6. Оброблення експериментальних даних.....	35
2.6. Висновки до розділу.....	36
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	37
3.1. Характеристика досліджуваної екосистеми.....	37
3.2. Виділення мідьрезистентних мікроорганізмів з біотопу печери «Атлантида».....	39

3.3. Встановлення кількості мідьрезистентних мікроорганізмів у біотопі печери «Атлантида».....	40
3.3.1. Порівняння кількості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида» стійких до токсичної міді(II) у середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit.....	40
3.3.2. Порівняння кількості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида» стійких до токсичної міді(II) у середовищі МПА + крохмаль + CuSO_4	45
3.3.3. Порівняння кількості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида» стійких до токсичної міді(II) у середовищі Гіса.....	48
3.4. Визначення способів взаємодії мікроорганізмів природної екосистеми печери «Атлантида» з міддю (II).....	50
3.5. Висновки до розділу.....	53
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	54
4.1 Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида".....	54
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида".....	56
4.2.1. Розрахунок загальнообмінної вентиляції для нормалізації температури робочого приміщення – лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного.....	59
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки під час дослідження особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида".....	61

4.4. Висновки до розділу.....	63
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	64
5.1. Біосорбція	64
5.2.Розрахунок	69
5.3. Висновки до розділу.....	
ВИСНОВКИ.....	
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

МДК – максимально допустима концентрація

КУО – колонієутворюючі одиниці

ВСТУП

Актуальність теми. Сполуки токсичної міді (II) є одними з найбільш екологічно небезпечних, оскільки її сполуки виливаються у довкілля як у місцях її родовищ, так і внаслідок промислової діяльності людини [1]. Забруднення навколишнього середовища сполуками міді призводить до деструкції екосистем та згубної дії на живі організми [2]. Мідь (II) в низьких концентраціях є необхідним мікроелементом для мікроорганізмів. Однак Cu^{2+} при концентрації 100 мг/л і вище набуває властивостей ксенобіотику і стає екстримальним фактором чужим природним екосистемам, у тому числі мікробіому. Тому вивчення закономірностей адаптації мікроорганізмів до міді як чужорідного екстримального фактора дозволяє дослідити закономірності мікробного гомеостазу до екстремальних факторів та встановити формування адаптаційних механізмів.

На сьогодні, мідь є одним з найбільш поширених контамінантів на території аграрних країн, в тому числі України. Так, широко розповсюджено використання мідьвмісних пестицидів в якості фунгіцидів для боротьби з бактеріальними та грибовими захворювання овочів, фруктів, горіхів та сільсько-господарських культур [3]. Це призвело до накопичення міді у ґрунтах у високих концентраціях. У той же час, виявлено значне забруднення міддю урбанізованих територій майже всієї центральної та південно-східної України [4].

Катіон Cu^{2+} є металом комбінованої дії за своїм негативним ефектом. Він є одночасно як металом-замісником, так і металом-окиснювачем. Саме тому він є дуже токсичним металом [5].

Загальновідомо, що мідьрезистентні мікроорганізми вже були виділені із забруднених техногенних екосистем [6]. Однак механізми їх стійкості та взаємодії з міддю і досі залишаються недостатньо вивченими.

Враховуючи токсичність міді і її негативний вплив на функціонування природних екосистем, розробка природоохоронних біотехнологій очищення мідьвмісних стічних вод та очищення забруднених міддю екосистем є дуже

важливим напрямком природоохоронної галузі. Окрім очищення навколишнього середовища, такі біотехнологічні розробки є екологічно-безпечними, економічно-вигідними та технологічно простими.

Тому, **метою нашої роботи** було дослідження особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери “Атлантида”.

Завдання дипломної роботи:

1. Провести аналіз літературних джерел за темою дипломної роботи.
2. Виділити мідьрезистентні мікроорганізми у біотопу печери «Атлантида».
3. Встановити кількість мідьрезистентних мікроорганізмів у біотопі пеери «Атлантида».
4. Визначити способи взаємодії мікроорганізмів природної екосистеми печери «Атлантида» з міддю (II).
5. Обґрунтувати перспективи проведеного дослідження.

Об’єкт дослідження – процес стійкості та взаємодії мікробного угруповання виділеного с біотопу печери «Атлантида» зі сполуками токсичної міді (II).

Предмет дослідження - мідьрезистентні мікроорганізми виділені з біотопу печери «Атлантида».

Методи дослідження: мікробіологічні, хімічні та статистичні.

Наукова новизна дипломної роботи: вперше встановлено кількісне співвідношення мідьрезистентних мікроорганізмів ґрунту печери «Атлантида» у присутності міді (II) у різних формах – сульфату та цитрату. Визначено вплив хелатування та різновиду поживного середовища на токсичність міді. Показано, що в екосистемі географічної зони печери «Атлантида» переважають мідьрезистентні мікроорганізми, що стійкі до міді (II) у високих концентраціях – до 2 400 мг/л.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані мідьрезистентні мікроорганізми можливо використовувати у природоохороних біотехнологіях очищення мідьвмісних стічних вод, біоремідації ґрунтів.

Особистий внесок випускника. Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, статистична обробка результатів, їх опис і аналіз виконані випускником особисто під керівництвом к.с.-г.

н, доцента Л.С.Ястремської та на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ під керівництвом проф., д. т.н., зав. відділом біології екстремофільних мікроорганізмів О.Б. Таширева та провідного інженера О.А. Гаврилюк.

Публікації. За матеріалами дипломної роботи опубліковані тези: Bakhmatska D. The isolation of copper resistant retro microbiome from eco-friendly ecosystem of “Atlantida” karst cave/D.Bakhmatska, O.Havryliuk, V.Hovorukha, O.Tashyrev, L. Yastremska // Mat. of the Young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology” (November 12-14, 2019): Abstr. – Kyiv. – Ukraine. – K: IMV. – P. 8

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика міді

Мідь - це пластичний золотисто-рожевий метал з характерним металевим блиском. У періодичної системі Д. І. Менделєєва цей хімічний елемент позначається, як Cu (Cuprum) і знаходиться під порядковим номером 29 в I групі (побічної підгрупи), в 4 періоді [7].

Основні властивості міді

1. Фізичні властивості.

На повітрі мідь набуває яскравий жовтувато-червоний відтінок за рахунок утворення оксидної плівки. Тонкі ж пластинки при просвічуванні зеленувато-блакитного кольору. У чистому вигляді мідь досить м'яка, тягуча і легко прокочується і витягується. Домішки здатні підвищити її твердість [8].

Високу електропровідність міді можна назвати головною властивістю, що визначає її переважне використання. Також мідь володіє дуже високою теплопровідністю. Такі домішки як залізо, фосфор, олово, сурма і миш'як впливають на базові властивості і зменшують електропровідність і теплопровідність. За даними показниками мідь поступається лише сріблу [9].

Мідь має високі значення щільності, температури плавлення і температури кипіння. Важливою властивістю також є хороша стійкість по відношенню до корозії. Наприклад, при високій вологості залізо окислюється значно швидше [10].

Мідь добре піддається обробці: прокочується в мідний лист і мідний пруток, простягається в мідний дріт з товщиною, доведеної до тисячних часток міліметра. Цей метал є діамагнетиком, тобто намагнічується проти напрямку зовнішнього магнітного поля [9].

2. Хімічні властивості.

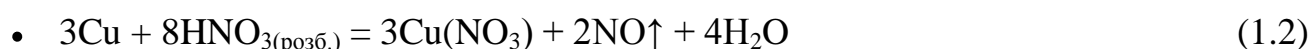
Мідь є порівняно малоактивним металом. У нормальних умовах на сухому повітрі її окислення не відбувається. Вона легко реагує з галогенами, селеном і сіркою. Кислоти без окислювальних властивостей не мають впливу на мідь. З воднем, вуглецем і азотом хімічних реакцій немає. На вологому повітрі відбувається окислення з утворенням карбонату міді (II) - верхнього шару платини [10].

Мідь володіє амфотерністю, тобто в земній корі утворює катіони і аніони. Залежно від умов, з'єднання міді виявляють кислотні або основні властивості [9].

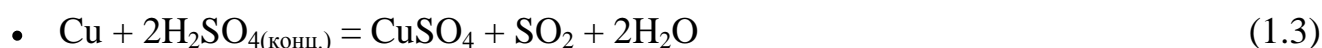
Мідь взаємодіє з концентрованою соляною кислотою:



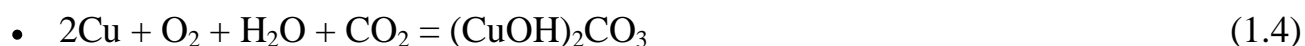
За звичайних умов вступає в реакцію з розбавленою азотною кислотою:



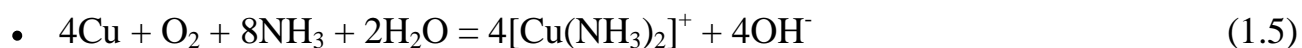
Під час нагрівання мідь реагує з концентрованою сірчаною кислотою:



У вологому повітрі, мідь повільно покривається плівкою зеленого гідроксокарбонату:



Мідь у присутності кисню розчиняється у водних розчинах аміаку:



1.2. Участь токсичної міді у метаболізмі мікроорганізмів

Метали мають вплив на метаболізм мікроорганізмів. Сполуки більшості токсичних металів (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} тощо) у низьких концентраціях (до 1-2 мг/л) є необхідними для росту мікроорганізмів. При концентраціях вище 1-2 мг/л метали негативно впливають на метаболізм мікроорганізмів. Іони металів активують ферменти, входять до складу простетичних груп ферментів та цитохромів, беруть участь у ферментативних реакціях та реакціях переносу електронів.

Функціональна роль міді(II) у мікробному метаболізмі:

- активація супероксиддисмутази у *Brucella abortus* [11];
- входить до складу супероксиддисмутази *Photobacterium leiognathi* [12];
- стимулює утворення азурину у *Escherichia coli* [13].

При підвищених концентраціях мідь пригнічує метаболізм мікроорганізмів. Токсичні метали мають широкий спектр негативної дії на мікробні клітини. Наприклад, пригнічують дихання, ферментативну активність мікроорганізмів, синтез білку, призводять до мутацій, порушують поділ клітин.

Так мідь(II) має такий негативний вплив на метаболізм мікроорганізмів:

- у *E.coli* пригнічує гліколіз та цикл трикарбонових кислот при 0,8 мг/л Cu^{2+} [14];
- зумовлює перекисне окислення ліпідів, окислення білків, пошкодження ДНК, руйнування Fe-s кластерів ферментів, руйнування ДНК [15];
- пригнічення активності глутатіонредуктази у *Hansenula marakii* [16];
- повне пригнічення росту *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* в присутності 100 мг/л CuO [17];
- в системах очистки води 50% денітрифікаторів інгубувалось при 0,95 мг/л Cu^{2+} , аеробних гетеротрофів – при 4,6 мг/л Cu^{2+} , нітрифікуючих бактерій – при 26,5 мг/л Cu^{2+} [18];
- пригнічення росту *Rhodopseudomonas palustris* TPE-1 при 100 М Fe(II) ТА 100 нМ Cu(II) [19];
- зниження активності каталазиб уреазиб видового різноманіття мікробного ґрунтового угруповання [20];
- зниження видового різноманіття *Pseudomonas* в ґрунтах, більшість як 80 років забруднених Cu^{2+} [21];
- загибель клітин грам-позитивних та грам-негативних бактерій на мідній поверхі протягом декількох хвилин [22].

Збільшення концентрації токсичних металів, в тому числі й міді(II), в екосистемах внаслідок техногенної дії людини призводить до порушення

функціонування мікробних угруповань: пригнічення дихання та ферментативної активності ґрунтів, зменшення кількості мікроорганізмів в мікробних угрупованнях та їх біорізноманіття [23,24]. Найбільш чутливими до токсичної дії металів є мікроорганізми циклу азоту (азотфіксатори, нітрифікатори). Саме вони пригнічуються першими в присутності токсичних металів [25].

Токсичні метали, в тому числі Cu^{2+} , що перевищують 1-2 мг/л, призводять до численних ушкоджень мікробних клітин. Мідь відносять до такого виду пошкоджень мікробних клітин токсичними металами – **окиснення металами структурних компонентів клітин та ферментів**, блокування циклічного переносу електронів внаслідок високого редокс-потенціалу металів. Cu^{2+} створює в середовищі високий редокс-потенціал [26,27]. Реакція відновлення міді та її редокс-потенціал наведено нище (реакція 1.1)



Завдяки високому редокс-потенціалу мідь(II) окислює структурні компоненти та ферменти клітин. Також Cu^{2+} здатен перехоплювати електрони у електронно-транспортному ланцюзі клітин. Таке відновлення металу не супроводжується синтезом АТФ у мікроорганізмів та призводить до їх енергетичного виснаження.

Ще один вид пошкодження до якого відносять мідь(II) – **заміщення металів у структурних складових та ферментах клітин або зв'язування з ними**, що призводить до багаторівневого ушкодження систем життєдіяльності мікроорганізмів.

Внаслідок стереохімічної аналогії (близькості або рівності іонних радіусів елементів) іонів токсичних металів та іонів, які є компонентами у метаболізмі мікроорганізмів та необхідними для нормального життєзабезпечення клітин відбувається накопичення токсичних металів, в тому числі й Cu^{2+} [28]. Рецепторні та транспортні системи мікробної клітини, які мають поглинати необхідні для життєзабезпечення клітини іони, «помиляються» внаслідок близькості або рівності іонних радіусів. Тому метал неспецифічно акумулюється клітиною [28]. Стереохімічні аналоги токсичної міді наведені в таблиці 1.1.

Стереохімічна аналогія макроелементів та міді

Макроелементи	Іонний радіус, нм	Токсичний метал	Іонний радіус, нм
Na ⁺	0.097	Cu ⁺	0.098
Mg ²⁺	0.078	Cu ²⁺	0.078
Fe ²⁺	0.079		

Токсичні метали після проникнення в клітину можуть заміщувати метали активних центрів ферментів та взаємодіяти з структурними компонентами клітини. Такі заміщення металів в активних центрах ферментів їх стереохімічними аналогами може й не впливати на функціонування цих ферментів, а може призводити до негативних порушень їх функціонування [29].

Cu²⁺ ще відносять до металів комбінованої дії, тобто мідь ушкоджує клітину завдяки високому редокс-потенціалу та заміщенню Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ у функціональних компонентах клітини.

1.3. Механізми стійкості мікроорганізмів до токсичної міді(II)

На сьогодні в літературі є інформація про мікроорганізми, які стійкі до високих концентрацій Cu²⁺ незважаючи на її токсичність.

Металорезистентні мікроорганізми виділяють переважно з забруднених металами середовищ. Високою стійкістю до дії токсичних металів виділяються сіркоокислювальні ацидофільні бактерії [30]. Такі металорезистентні бактерії виділяють переважно з родовищ, що містять FeS, CuS. Тому ці бактерії адаптувались до постійної токсичної дії металів. Факультативно термофільні бактерії, виділені із термального джерела Ісландії, подібні до *Thiobacillus*, стійкі до 23200 мг/л Cu²⁺ [31].

Наявність мікроорганізмів стійких до токсичних металів в забруднених металами екосистемах є закономірною, адже в присутності селективного фактору – токсичних металів – адаптуватися можуть лише металорезистентні мікроорганізми. На сьогодні з'являється інформація про металорезистентні мікроорганізми з

природних екологічно чистих екосистем, у яких концентрація металів не перевищує декілька мг/дм³ зразку. Особливо це стосується екосистем внутрішнього шлейфу Антарктичного півострова [32].

Стійкість мікроорганізмів до токсичних металів обумовлена рядом механізмів. Механізми стійкості:

- специфічні;
- неспецифічні.

До специфічних механізмів відносять генетично зумовлену стійкість мікроорганізмів до металів. Стійкість при цьому виробляється за дії токсичних металів. В присутності токсичного металу синтезуються білки, які зумовлюють антипорт токсичних металів з клітини, зв'язування чи відновлення токсичних металів до нерозчинних сполук [33-36].

Неспецифічні механізми стійкості притаманні для мікроорганізмів незалежно від присутності металів у середовищі.

Механізми стійкості до токсичних металів, які зумовлені генетично:

- антипорт або «пмпування» токсичних металів з клітини (видалення токсичних іонів, що потрапили до клітини) [33, 35, 37];
- ферментативне відновлення металів до менш токсичних або менш доступних сполук [37];
- зв'язування токсичних металів з метал-тіонеїновими білками [38].

Стійкість мікроорганізмів до Cu^{2+} зумовлена антипортом міді з клітини [35]. Антипорт токсичних металів може бути, як АТФ-залежним, так і хемоосмотичним. Антипорт Cu^{2+} у грам-позитивних бактерій відбувається із витратою АТФ. Стійкість *Enterococcus hirae* до Cu^{2+} зумовлена саме антипортом [39].

Ще один генетично-зумовлений механізм стійкості мікроорганізмів до токсичної міді є синтез металотіонеїнових білків [38, 40]. Металотіонеїнові білки – це низькомолекулярні білки з високим вмістом цистеїну [38]. Металотіонеїни зв'язують токсичні метали тількиними групами. Прикладом мікроорганізмів, які мають такий механізм стійкості є *Sulfolobus solfataricus* та *Bacillus acidocaldarius* [41].

Неспецифічні механізми стійкості мікроорганізмів до токсичних металів не індукується металами, а є притаманними мікроорганізмам незалежно від вмісту металів у середовищі. Наприклад, у *Cryptococcus laurentii* та *Rhodotorula rubra* захисним механізмом стійкості до міді(II) є синтез екзополісахаридів [42].

1.4. Взаємодія мікроорганізмів з токсичною міддю(II)

Спосіб взаємодії мікробів з металами частково залежить від того, чи є організми прокаріотичними чи еукаріотичними. Обидва типи мікроорганізмів мають здатність зв'язувати іони металів, присутні у зовнішньому середовищі на поверхні клітини, або транспортувати їх у клітину для різних внутрішньоклітинних функцій (рис. 1.1). З іншого боку, лише прокаріоти включають організми, здатні окислювати Mn (II), Fe (II), Co (II), Cu (I) [43]. Деякі прокаріоти та еукаріоти можуть утворювати продукти метаболізму, такі як кислоти або ліганди, які розчиняють основні метали, що містяться в мінералах, таких як Fe, Cu, Zn, Ni, Co та інші. Інші можуть утворювати аніони, такі як сульфід або карбонат, які осаджують розчинені іони металів [43].

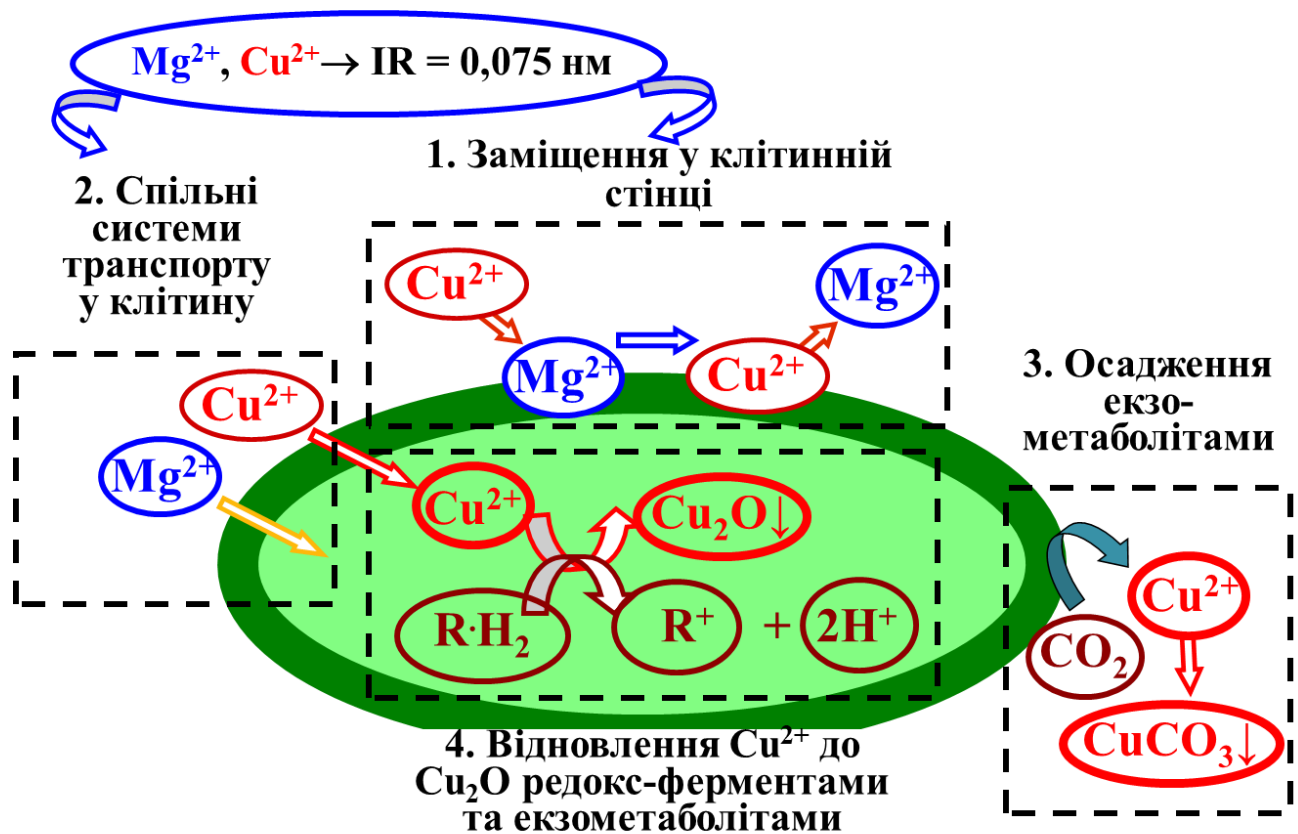


Рис. 1.1. Види взаємодії мікроорганізмів з токсичною міддю(II)

Мікроорганізми взаємодіють з токсичними металами і результатом їх взаємодії можуть бути мобілізація та іммобілізація металів.

В основі мікробної мобілізації та іммобілізації лежать різні механізми, такі як зміна рН середовища, синтез метаболітів, окиснення або відновлення металів (рис. 1.2).

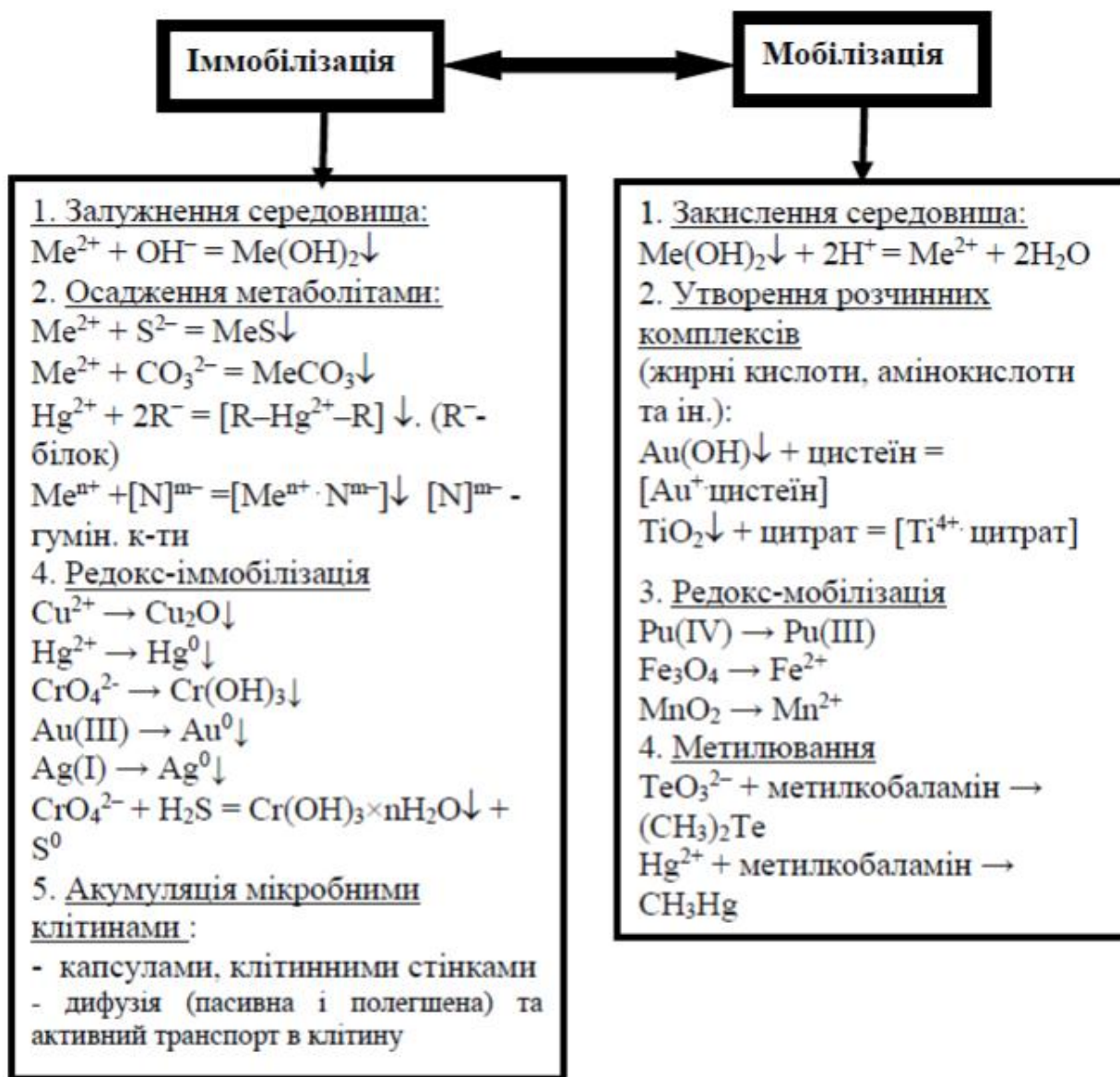


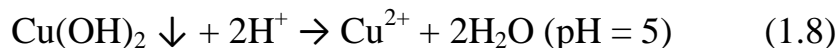
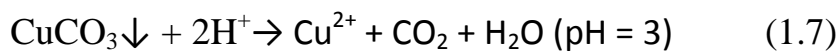
Рис. 1.2. Механізми мікробної мобілізації та імобілізації токсичних металів [44,45]

1.4.1. Мобілізація токсичних металів

Мобілізація металів можлива завдяки зниженню рН середовища внаслідок утворення кислот, утворенню комплексів металів з метаболітами мікроорганізмів, відновленню металів та метильованню металів.

Зміна рН середовища. Мікроорганізми змінюють рН середовища завдяки метаболічній активності і таким чином впливають на мобільність металів. Токсичні

металі є стабільними у рухомій катіонній формі в кислих та слабко-кислих умовах (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} тощо). Закислення середовища призводить до мобілізації токсичних металів:



Мікробне закислення середовища відбувається внаслідок накопичення H^+ . Тому мікроорганізми здатні мобілізувати нерозчинні сполуки металів з утворенням катіонів металів при зброджуванні органічних сполук [46,47].

Редокс-мобілізація. Завдяки зміні ступеню окиснення металів мікроорганізми можуть мобілізувати метали. Так, наприклад, при мікробному відновленні $\text{Mn}(\text{VI}) \downarrow$ (MnO_2) утворюється розчинний Mn^{2+} . Відновлення $\text{Mn}(\text{VI}) \downarrow$ відбувається з отриманням вільної енергії, доступної для мікробного метаболізму. Аналогічно мікроорганізми здатні відновлювати $\text{Cu}(\text{II}) \downarrow$ (Cu_2O) з утворенням розчинного Cu^{2+} [48].

1.4.2. Імобілізація токсичних металів

Імобілізація токсичних металів можлива внаслідок залуження середовища, осадження металів екзаметаболітами мікроорганізмів, відновлення металів до нерозчинних сполук та акумуляція мікробними клітинами.

Зміна рН середовища. Внаслідок підвищення рН середовища під час метаболічної діяльності мікроорганізмів можлива імобілізація токсичних металів. Підвищення рН вище 7 невідворотно призводить до осадження більшості двовалентних металів у вигляді нерозчинних сполук, наприклад CuCO_3 , $\text{Ni}(\text{OH})_2$, $\text{Zn}(\text{OH})_2$ тощо [49]. В процесі мікробного метаболізму в середовищі можуть накопичуватися лужні сполуки – K^+ , Na^+ , NH_3 , що підвищують значення рН, яке призводить до осадження металів [50].

Осадження металів екзаметаболітами мікроорганізмів. При взаємодії токсичних металів з метаболітами мікроорганізмів можуть утворюватися нерозчинні сполуки металів, такі як сульфідні, карбонати, оксалати, та ін.

Розчинні сполуки двовалентних металів, таких як Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} тощо при реакції з H_2S утворюють нерозчинні сульфідні металів: $\text{Me}^{2+} + \text{H}_2\text{S} = \text{MeS}\downarrow + 2\text{H}^+$. Сірководень утворюється при розкладанні органічних сполук, що містять сірку у сульфідних групах [51]. Осадження металів сірководнем використовується у біотехнологіях очищення стічних вод від токсичних металів [51, 52].

Метали утворюють нерозчинні комплекси з деякими органічними кислотами. Так, наприклад, оксалат, що синтезується багатьма мікроміцетами, утворює з металами нерозчинні оксалати металів [44]. Оксалати кальцію утворюються вільноживучими, патогенними мікроміцетами, а також лишайниками [98]. Мікроміцети можуть осаджувати у вигляді оксалатів також інші метали, в тому числі токсичні, такі як Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} тощо [53-55].

Накопичення токсичних металів мікроорганізмами. Мікроорганізми здатні накопичувати токсичні метали завдяки неспецифічній сорбції, зв'язуванню металів з полісахаридами мікробної капсули або білками клітинної стінки, активному транспорту металів всередину клітини [56-59]. Стійкі до дії токсичних металів мікроорганізми виявляють підвищену здатність до накопичення металів. Накопичення металів мікроорганізмами має місце не лише при низьких концентраціях металів у водних розчинах, але і в стічних водах, у яких концентрація металів дуже висока [60]. Один і той же штам мікроорганізмів здатний ефективно накопичувати метали, що відносяться до різних груп елементів. Наприклад, *Rhodotorula glutinins* накопичує у високих концентраціях Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Be^{2+} та CrO_4^{2-} [61].

Відновлення металів до нерозчинних сполук. Мікроорганізми здатні відновлювати метали з утворенням нерозчинних сполук металів. Наприклад, Cu(II) до Cu(0) , Cr(VI) до Cr(III) тощо [101]. Відновлення Cu(II) до Cu(0) , Cu(II) до Cu(I)

здійснюється за допомогою *Pseudomonas maltophila*, *Micrococcus lactilyticus*, *Thiobacillus ferrooxidans* [62,63].

1.5. Використання стійких до міді мікроорганізмів у біотехнологіях

1.5.1. Біоремедіація ґрунтів, забруднені важкими металами

Одним із прикладів використання стійких до міді мікроорганізмів може бути біоремедіація ґрунтів, які забруднені важкими металами, зокрема міддю. Біоремедіація - це очищення ґрунтів, стічних вод, атмосфери з використанням метаболічного потенціалу біооб'єктів.

Ґрунт - природний фільтр для техногенних забруднювачів, особливо важких металів, які впливають на її біологічні властивості. При цьому спостерігається зміна загальної чисельності ґрунтових мікроорганізмів, звуження біорізноманіття, зміна структури мікробіоценозів і зниження ферментативної активності. Присутність ТМ змінює консервативні ознаки ґрунтів: гумусний стан, структуру, показник кислотності, що призводить до часткової, а іноді і повної втрати родючості. Важкі метали порівняно швидко накопичуються в ґрунті і вкрай повільно з неї виводяться: період видалення Zn^{2+} - 500, Cd^{2+} - 1100, Cu^{2+} - 1500, Pb^{2+} - до декількох тисяч років. У ґрунтах важкі метали присутні у водорозчинній, іонообмінній і неміцно адсорбованій формі. У складі ґрунту важкі метали знаходяться в декількох пулах ґрунту:

1. Розчинені в ґрунтовому розчині;
2. Займають сайти обміну на неорганічних компонентах ґрунту;
3. Міцно адсорбовані з ґрунтовими частинками;
4. Асоційовані з нерозчинною органічною речовиною ґрунту;
5. Які випали в осад у вигляді твердих частинок;
6. Присутні в структурі вторинних мінералів;
7. Присутні в структурі первинних мінералів.

Процес трансформації важких металів, які надійшли в ґрунт включає наступні стадії:

1. Перетворення оксидів металу в гідроксиди (карбонати, гідрокарбонати);
2. Розчинення гідроксидів важких металів(карбонатів, гідрокарбонатів) і адсорбцію відповідних катіонів металу твердими фазами ґрунтів;
3. Утворення фосфатів важких металів і їх сполук з органічною речовиною ґрунту [64].

Накопичення важких металів у ґрунті обумовлено впливом ряду взаємопов'язаних процесів, що включають кругообіг органічних та неорганічних речовин, окислювально-відновні реакції, осадження/розчинення і адсорбцію/десорбцію. Ступінь адсорбції катіонів металів корелює зі значеннями рН і окислювально-відновного потенціалу (ОВП), вмістом глини, ґрунтової органічної речовини, окисів заліза і марганцю, карбонату кальцію. Інтенсивність адсорбції аніонів металів корелює з вмістом окисів заліза і марганцю, а також значеннями рН і ОВП [64].

За прийнятою міжнародною класифікацією біоремедіаційні технології діляться на три групи:

1. Біоремедіація *ex situ*:

- Витяг забрудненого ґрунту, переміщення її на майданчики знешкодження, агротехнічні роботи;
- Відмивання витягнутого ґрунту від забруднення (в основному від нафти), повернення на колишнє місце проведення меліорації;
- Екскавація ґрунту і проведення рідкофазної або твердофазної ферментації в біореакторах з додаванням біогенних елементів в аеробних або анаеробних умовах (кілька днів або місяців, зниження концентрації ксенобіотики на 90-99%).

2. Біоремедіація *on site*:

- Забруднений ґрунт залишається на місці;
- Проводяться меліорація, біостимулювання, фіторемедіація (1-2 роки,

зниження концентрації токсиканту на 60-90%);

– Забруднений ґрунт залишається на місці, тільки при необхідності механічно знімається верхній, сильно забруднений шар ґрунту, далі проводяться обробка біопрепаратами-деструкторами і весь комплекс агротехнічних робіт (2-4 роки або більше, зниження концентрації ксенобіотика до 90%).

3. Біоремедіація *in situ* (забруднення знаходиться під поверхнею ґрунту):

– Біовентилювання - закачування повітря, тривалість - від декількох днів до місяця, зниження концентрації ксенобіотика на 90-99%;

– Біобарботування - закачування поживних розчинів, тривалість - від декількох днів до місяці, зниження концентрації ксенобіотика на 90-99%;

– Біодеструкція при відкачці рідкої фази забруднювача під вакуумом (тривалість - від декількох днів до місяця і року) [65].

Саме мідрезистентні штами бактерій теж можна використовувати у біотехнологіях. Наприклад, досліджували фітотоксичну дію міді на рослини сочевиці, інокульовані стійкими до міді бактеріями *Providenciavermicola*, вирощеними в забрудненій міддю ґрунті. Стійка до міді *P. vermicola* показала множинні властивості, що сприяють росту рослин, при використанні в якості інокулянту насіння. Він захищав сочевицю від токсичності міді зі значним збільшенням довжини коренів і пагонів, сухої маси рослин і площі листя, збільшував вміст хлорофілу у листку, кількість стручків та маса насінин також була вища у інокульованих рослин. В цілому, результати показали, що інокуляція насіння *P. vermicola* забезпечує стійкість до важких металів у сочевиці, яка може бути використана в якості потужного біотехнологічного інструменту для вирішення проблем забруднення міддю у сільськогосподарських рослин для підвищення врожайності [66].

Окрім ґрунтів, досліджувалася здатність стійкого до міді *Stenotrophomonas maltophilia* PD2 видаляти з водного розчину мідь. При таких параметрах, як рН=5,5, часі 26 годин і початковій концентрації міді 50 мг/л мідь видалялася на 90% [67].

Було виявлено, що грамнегативні бактерії *Pantoea* TEM 18 здатні показувати високі значення біосорбції іонів міді в розчинах, забруднених нафтопродуктами [68]. Не менш вражаючі біосорбційні можливості виявляють бактерії *Corynebacterium glutamicum* і бактерії різновидів *Pseudomonas* по відношенню до іонів свинцю і міді [69].

1.5.2. Очищення стічних вод з важкими металами

Відомі способи очищення стічних вод від іонів важких металів при їх сумісній присутності шляхом їх зв'язування в важкорозчинні сполуки, де в якості осаджувачів застосовують оксиди, гідроксиди, солі лужних, лужноземельних і перехідних металів, сульфід- і фосфатвмісними матеріали [70].

Важкі метали в природних водах знаходяться в розчиненому і адсорбованому стані. Потрапляючи в воду в іонній формі, вони накопичуються в опадах у вигляді гідроксиду, карбонатів, сульфідів або фосфатів. Вміст різних металів у водоймах варіює в широких межах. Високі концентрації важких металів виявляються у верхніх шарах води. За своєю токсичності важкі метали можна розташувати в наступній послідовності: ртуть, срібло, мідь, кадмій, цинк, свинець, хром, нікель, кобальт [71].

Існує багато досліджень по очищенню вод від різних шкідливих домішок. Досягнуто великі успіхи з розробки та впровадження способів біологічного очищення побутових і ряду інших відходів. У той же час не дивлячись на те, що мікробіологічна трансформація і детоксикація окремих металів і їх з'єднань вже досить повно вивчена, біологічне очищення від промислових стічних вод знаходиться на стадії розробки і становлення.

Перспективні мікробіологічні методи сорбції та осадження іонів металів. Для вилучення металів з розчинів можуть бути використані представники різних таксономічних груп. Так, клітини *Thiobacillus ferrooxidans* вилучають з розчину іони Cd(II), Co(II), Cu(II), Cr(VI), Fe(III), Ni(II), Ag⁺, Au(III); ціанобактерії - Cd(II), Au(III); клітини хлорели - Cd(II), Ni(II), Co(II), Zn(II), Sr(II), Mo(II); дріжджі *Candida*

lipolytica, *Candidautilis*, *Rhodotorula mucilaginosa* - Cd(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II); міцелліальні гриби роду *Aspergillus* - Co(II), Ra(II). Мікроорганізми по різному реагують на важкі метали. Ряд мікроорганізмів здатні здійснювати активний транспорт важких металів всередину клітин [72].

Сульфатредуктори - одна з найдавніших фізіологічних груп бактерій. Осаджувати сульфід металів здатні не тільки облігатні сульфатредуктори, але і мікроорганізми, які використовують менше окислені сполуки сірки в дихальному ланцюзі, селекційні штами бактерій роду *Pseudomonas*, що володіють здатністю до сульфатредукції. В результаті їх діяльності добре розчинні токсичні сульфати відновлюються до практично нерозчинних, що випадають в осад. В результаті діяльності сульфатвідновних бактерій з стічних вод осідають сульфід кобальту, нікелю, кадмію, заліза, свинцю, цинку та інші [73].

Таким чином, в біотехнології очищення стічних вод від важких металів особливо важливе значення мають сульфатредуючі бактерії. Однак, застосування сульфатів як окислювача органічних речовин при очищенні стічних вод поки що є важким через надмірну токсичність сірководню, що утворюється, невміння і небажання з ним працювати, високою його реакційною здатністю, що вимагає біореакторів з корозійно-стійких матеріалів. У той же час використання сульфату як окислювача дуже важливо при очищенні стічних вод, що містять іони важких металів, які, зв'язуючись з сірководнем, осідають у вигляді сульфідів. Такий осад у багато разів менше того, який утворюється в результаті сорбції іонів важких металів на біомасі, і може служити сировиною для вилучення елементів, що містяться в ньому.

1.6. Висновки до розділу

Мідь - це пластичний золотисто-рожевий метал з характерним металевим блиском. Іони токсичної міді у малих концентраціях є необхідною для функціонування енергетичного метаболізму мікроорганізмів. Але при концентраціях вище за 1-2 мг/л, вона здатна пригнічувати мікроорганізми. Вплив

токсичної міді призводить до порушень бар'єрної, транспортної, енергетичної системи мікроорганізмів, порушення клітинного поділу, а також до мутацій.

Стійкість мікроорганізмів до міді(II) забезпечується специфічними та неспецифічними механізмами. До специфічних механізмів належить антипорт з клітини та синтез металотіонеїнових білків, а до неспецифічних – синтез екзополісахаридів.

Мікроорганізми здатні мобілізувати та іммобілізувати метали завдяки зміні рН середовища, синтезу метаболітів, відновленню металів. При іммобілізації металів мікроорганізми утворюються металовмісні породи. Іммобілізація металів робить їх недоступними для живих істот та запобігає накопиченню металів у трофічних ланцюгах. Мобілізація металів мікроорганізмами призводить до перерозподілу металів у довкіллі. Розчинні сполуки металів є доступними для рослин та тварин. Мікробна мобілізація та іммобілізація металів використовується в широкому спектрі біотехнологій. Мікробну мобілізацію покладено в основу збагачення бідних руд та відвалів. Мікробна іммобілізація застосовується в ряді біотехнологій очищення стічних вод від металів.

Прикладами використання стійких до міді мікроорганізмів можуть бути біоремедіація ґрунтів або очищення стічних вод, які забруднені важкими металами, зокрема міддю.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Підготовка поживного середовища

В якості селективного поживного середовища використовували МПА + крохмал та середовище Гіса.

МПА + крохмал 1 г/л. Для приготування 300 мл 2% МПА + крохмаль 1 г/л у флакон об'ємом 300 мл вносять 6 г агару, 3,9 г порошку NB, 0,3 г розчинного крохмалю та 288 мл дистильованої води. Автоклавують при 1,5 Атм протягом 2 годин.

Гіса. Для приготування 300 мл 2% середовища Гіса у флакон об'ємом 300 мл вносять 6 г агару та 294 мл дистильованої води. Більше у флакони нічого не додають та автоклавують при 1,5 Атм протягом 2 годин.

Склад середовища Гіса на 1 л.

NH_4Cl – 1;

Na_2SO_4 – 0,5;

K_2HPO_4 – 0,5 (класичний вміст 2 г/л, однак фосфати з міддю випадають у осад, тому концентрацію зменшили)

Глюкоза – 10;

Дріжджовий екстракт – 0,2.

Для приготування середовища Гіса окремо готують концентровані розчини вище вказаних солей та вуглеводів. Стандартні концентрації вказаних розчинів становлять 50 г/ 200 мл для хлориду амонію, 50 г/200 мл для сульфату натрію, 20 г/ 100 мл для фосфату калію (його необхідно нейтралізувати фосфорною кислотою до $\text{pH} = 7,0$, оскільки розчин солі має сильно лужний показник кислотності pH), для глюкози – 40 г/ 100 мл, дріжджового екстракту – 10 г/100 мл. Наприклад, щоб отримати концентрацію 10г/100 мл у флакон необхідно

внести 10 г дріжджового екстракту та 90 мл дистильованої води. Солі та порошок поживних середовищ рочиняти у дистильованій воді не довше ніж за дві години до стерилізації. Після стерилізації усіх компонентів середовища зливають їх в стерильних умовах до вказаних вище кінцевих концентрацій. Перед цим проводять розрахунки, скільки мл необхідно відібрати приготовлених концентрованих розчинів солей, щоб отримати концентрації 1;0,5;0,5;10 та 0,2 г/л відповідно (склад середовища Гіса). Розрахунок проводять за формулою:

$$[A] = (C_1 \times V) / C_2, \dots \dots \dots (2.1)$$

де А – об'єм концентрованого розчину сполуки, мл; C_1 – концентрація сполуки, яку необхідно отримати у заданому об'ємі, мг/л; V – заданий об'єм, у якому необхідно отримати необхідну концентрацію, мл; C_2 – вихідна концентрація стандартного концентрованого розчину сполуки, мг/л.

Наприклад, для того, щоб у 300 мл середовища отримати концентрацію NH_4Cl - 1 г/л (1000 мг/л) необхідно $(1000 \text{ мг/л} \times 300 \text{ мл}) / 50\,000 \text{ мг/л} = 6 \text{ мл}$. Тобто у 294 мл рідини необхідно внести 6 мл розчину NH_4Cl (50 г/л), щоб отримати 300 мл рідини з концентрацією NH_4Cl 1 г/л. Такі розрахунки необхідно провести і з іншими солями та вуглеводами, що входять до складу поживного середовища.

Розлив проводився у боксі, що попередньо знезаражувався ультрафіолетом.

У агаризованих поживних середовищах створювали концентраційний градієнт Cu(II) . У першому варіанті (МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit) градієнт становив 200...2 400 мг/л Cu^{2+} з кроком 200 мг/л (табл. 2.2). У другому (Гіса + Cu^{2+} + cit) становив 25...200 мг/л Cu^{2+} з кроком 25 мг/л (табл. 2.1)

За використання міді у нехелатованій сульфатні формі також створювали концентраційний градієнт Cu(II) : для варіанту Гіса + CuSO_4 градієнт становив 1...5 мг/л Cu^{2+} (див. табл. 2.1). У другому варіанті з сульфатом: МПА + крохмаль + CuSO_4 градієнт становив 25...200 мг/л Cu^{2+} з кроком 25 мг/л (див. табл. 2.2). В якості контролю використовували середовище, що не містить мідь.

Таблиця 2.1

Математичний розрахунок кількостей компонентів селективних мідьвмісних розчинів на середовищі Гіса при використанні різних форм міді

Гіса + Cu²⁺ + cit		Гіса + CuSO₄	
концентрація, мг/л	Сu (мл)	концентрація, мг/л	Сu (мл)
контроль (10 ⁻²)	0	контроль (10 ⁻²)	0
25	0,0416	1	0,0016
50	0,0833	5	0,0083
75	0,125	10	0,0166
100	0,1666	15	0,025
125	0,2083	20	0,0333
150	0,25		
175	0,2916		
200	0,3333		

Таблиця 2.2

Математичний розрахунок кількостей компонентів селективних мідьвмісних розчинів на середовищі МПА при використанні різних форм міді

МПА + крохмаль + Cu²⁺ + cit		МПА + крохмаль + CuSO₄	
концентрація, мг/л	концентрація, мг/л	концентрація, мг/л	Сu (мл)
контроль (10 ⁻²)	0	контроль (10 ⁻²)	0
200	0,333	25	0,0416
400	0,666	50	0,0833
600	1	75	0,125
800	1,333	100	0,1666
1000	1,666	125	0,2083
1200	2	150	0,25

1400	2,333	175	0,2916
1600	2,666	200	0,3333
1800	3		
2000	3,333		
2200	3,666		
2400	4		

2.2. Приготування серійних розведень суспензії мікроорганізмів

Чисельність мікроорганізмів у культуральному середовищі зазвичай велика, тому для одержання ізольованих колоній необхідно приготувати ряд послідовних розведень (рис. 1). Розведення готують у стерильній воді або 0,85 % -му розчині NaCl. У ході досліду доцільно використовувати однаковий коефіцієнт розведення, наприклад 10, що зменшує ймовірність помилки. Для приготування розведень стерильну воду розливають по 9 мл у стерильні сухі пробірки. Потім 1 мл досліджуваної суспензії стерильною піпеткою переносять у пробірку з 9 мл стерильної води – це перше розведення (10^{-1}). Отримане розведення ретельно перемішують новою стерильною піпеткою, набираючи в піпетку й випускаючи з неї отриману суспензію. Цю процедуру виконують 3-5 разів, потім тією же піпеткою відбирають 1 мл отриманої суспензії й переносять в другу пробірку – одержують друге розведення (10^{-2}). У такий же спосіб готують і наступні розведення. Ступінь розведення залежить від густини досліджуваної популяції мікроорганізмів.

Для кожного розведення необхідно обов'язково використовувати нову піпетку. Нехтування цим правилом призводить до помилкового результату.

2.3. Посів на тверде поживне середовище в чашки Петрі

Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Перед посівом поверхневим способом (рис. 2.1.) розливають розтоплене, найчастіше агаризоване, поживне середовище в ряд стерильних чашок Петрі по 25 мл у кожену. Чашки залишають на горизонтальній поверхні доти, доки середовище не застигне.

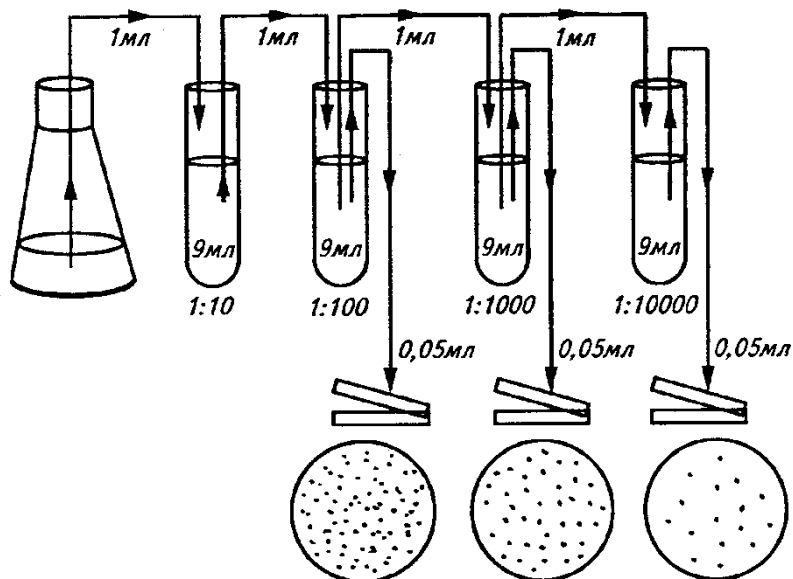


Рис. 2.1. Схема приготування розведень і посіву суспензії мікроорганізмів

Після того, як середовище готове, на його поверхню стерильною піпеткою наносять точно вимірний об'єм (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення мікроорганізмів і розподіляють його стерильним скляним шпателем по поверхні середовища. Посіви на тверде середовище проводять, як правило, 13 трьох останніх розведень, з кожного по 2-4 паралельні висіви. Для посіву можна використовувати одну піпетку, але починати треба обов'язково з більшого розведення. Для кожного розведення використовують новий стерильний шпатель. Після посіву чашки Петрі термостатують.

2.4. Приготування розчинів цитрату [Cu²⁺· cit] та сульфату CuSO₄ міді

Концентрація міді – 30 г/л по катіону.

Для розрахунку необхідно враховувати молярну масу вихідної сполуки. Зазвичай використовуються мідьвмісні солі - сульфат міді CuSO₄ (мідний купрос) або хлорид міді CuCl₂.

Розчини міді у концентрації 30 г/л готували розчиненням CuSO₄·5H₂O у дистильованій воді. Для приготування 250 мл розчину цитрату міді 29,4 г CuSO₄·5H₂O розчиняли у 200 мл дистильованої води (рН= 3,4). Після цього додавали 60 г сухого трьохзаміщеного натрію цитрату та перемішували до повного розчинення. Розчин мав рН = 5,5 і тому його нейтралізували за допомогою Na₂CO₃ до рН=6,5. Отриманий розчин вносили у колбу Мора об'ємом 250 мл та доводили об'єм до мітки дистильованою водою.

Для приготування розчину сульфату міді 29,4 г CuSO₄·5H₂O розчиняли у 100 мл дистильованої води, вносили у колбу Мора (250 мл) та доводили об'єм до мітки дистильованою водою. Розчин мав рН = 6,5. Розчини стерилізували кип'ятінням на водяній бані протягом 30 хв у герметично закритих флаконах.

2.5. Методи виявлення мідьрезистентних мікроорганізмів

Для перевірки здатності мікроорганізмів відновлювати мідь (II) до оксиду міді (I) під кришку чашок та у флакони вносили сірководень [39]. Колонії, що містили сполуки мідь (II), забарвлювалися в чорний колір внаслідок утворення сульфідів міді – CuS [40].

Для отримання сірководню у флакон об'ємом 50 мл вносили 5 г лимонної кислоти, продували агроном протягом 10 хвилин для видалення кисню та герметично закривали пеніциліновою пробкою і гвинтовим затискачем. У флакон проколом за допомогою шприца вносили 0,5 мл насиченого розчину Na₂S. Внаслідок взаємодії лимонної кислоти з сульфідом натрію виділявся сірководень: $2\text{H}^+ + \text{S}^{2-} = \text{H}_2\text{S}\uparrow$. Про це свідчило збільшення тиску газу у флаконі. Шприцом

відбирали 0,5 мл H_2S та вносили до культиватора з колоніями мікроорганізмів. Колонії, що містили сполуки Cu^{2+} , забарвлювалися в чорний колір внаслідок утворення сульфиду заліза: $\text{Cu}^{2+} + \text{S}^{2-} = \text{CuS}$ [40]. Такі колонії були ізольовані для проведення подальших досліджень.

2.6. Оброблення експериментальних даних

Кількість клітин в 1 мл досліджуваної суспензії мікроорганізмів обчислюють за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V}; \quad (2.2)$$

де M – кількість клітин в 1 мл; a – середня кількість колоній (від 3 до 300); 10^n – фактор розведення; V – об'єм інокулятора, мл.

Коефіцієнту перерахунку кількості колоній у 1 г вологого (сирого) зразка ґрунту на 1 г абсолютно сухого ґрунту визначають за формулою:

$$K = \frac{m_{\text{вологого}}}{m_{\text{сухого}}}, \quad (2.3)$$

де $m_{\text{вологого}}$ – маса вологого ґрунту; $m_{\text{сухого}}$ – маса сухого ґрунту.

Чисельність мікроорганізмів у зразках перераховували у загальну кількість мікроорганізмів на 1 г абсолютно сухого зразка за формулою:

$$X = M \times K, \quad (2.4)$$

де: X – кількість клітин у 1 г сухого зразка; M – кількість клітин у 1 мл суспензії досліджуваних мікроорганізмів; K – коефіцієнту перерахунку кількості колоній.

Статистична обробка даних проводилася за допомогою програмних пакетів Microsoft Office Excel з достовірністю 95%. Всі дослідження виконували у трикратній повторюваності. Показники стандартних відхилень обчислювали за загальноприйнятими формулами.

2.7. Висновки до розділу

В ході виконання експериментальної частини дипломної роботи вихідним матеріалом слугували зразки глини та палеогрунту взяті з печери «Атлантида». Особливості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида" досліджували посівом на агаризоване середовище яке містило різні форми міді, для перевірки здатності мікроорганізмів відновлювати мідь(II) до оксиду міді(I) використовували сірководень.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Характеристика досліджуваної екосистеми

Для виділення мідьрезистентних мікроорганізмів було обрано зразки глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида», яка розташована в межах Кам'янець-Подільського району Хмельницької області, біля села Завалля України. Зразки глини та палеогрунту відібрані у науковій експедиції співробітниками відділу біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ (табл. 2.1).

Таблиця 3.1

Характеристика досліджуваних зразків ґрунту біотопу печери «Атлантида»

№ зразка	Географічна зона	Екологічна ніша	Екстремальні фактори
1	Печера «Атлантида»	Глина	Температура: +9,4...+10,5°C,
2	Печера «Атлантида»	Палеогрунт	Температура: +9,4 ... +10,5 °C,



Рис. 3.1. Фото печери «Атлантида»

«Атлантида» - це карстова печера, розташована в межах Кам'янець-Подільського району Хмельницької області, поблизу села Завалля. Її відкрили в

1969 році, а досліджувати почали тільки через 6 років. З 1975 року має статус геологічної пам'ятки природи загальнодержавного значення. Це єдина в Україні триярусна горизонтальна печера, з площею 3120 м² і довжиною 2400 м. Стіни грота покриті масою різноманітних різнокольорових гіпсових кристалів та інших утворень. Саме завдяки їм печера «Атлантида» славиться своєю красою та унікальністю, а дані про неї можна знайти в міжнародних енциклопедіях і спеціалізованих довідниках.

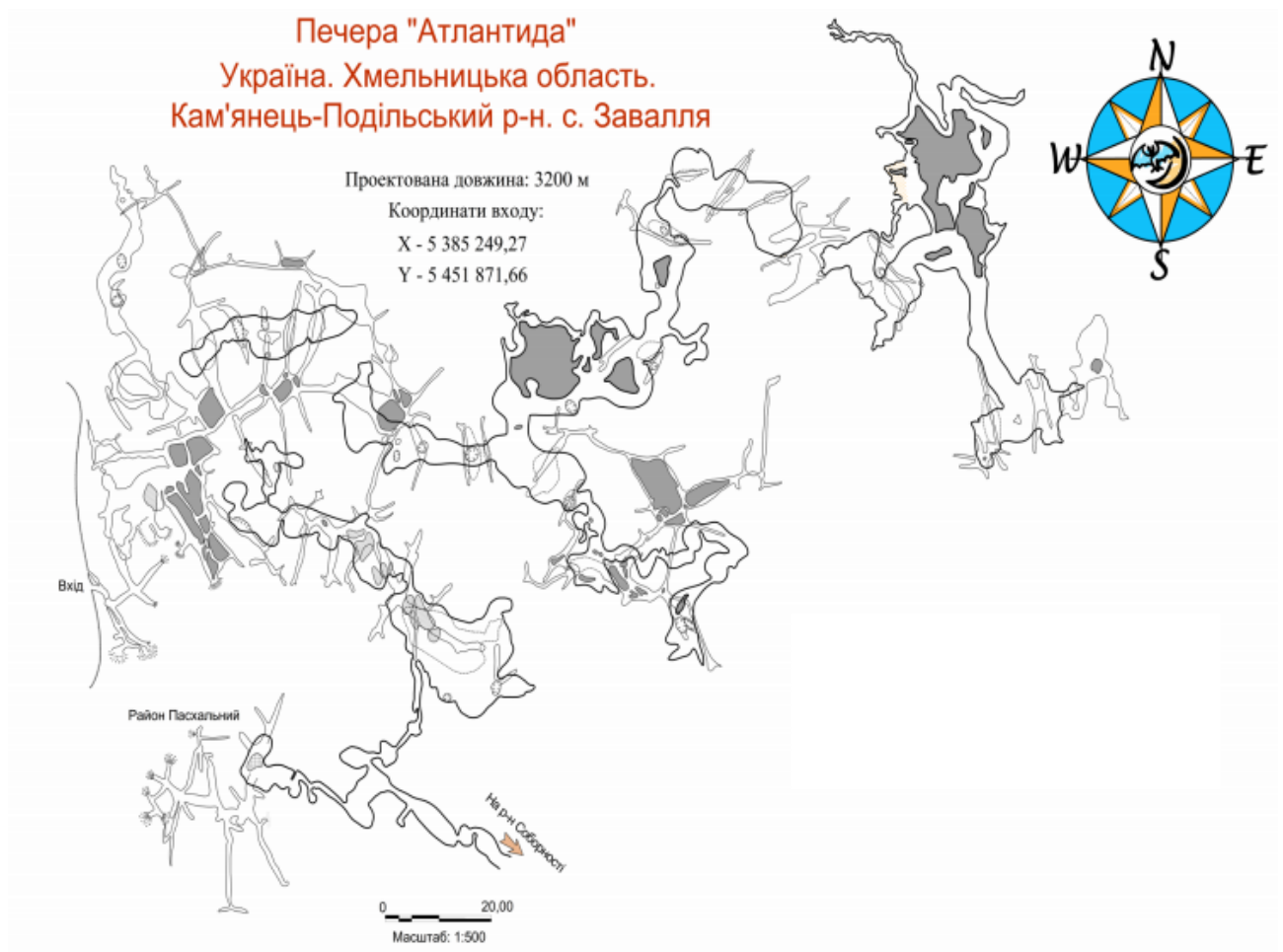


Рис. 3.2. Карта печери «Атлантида»

3.2. Виділення мідьрезистентних мікроорганізмів з біотопу печери «Атлантида»

Виділяли мідьрезистентні мікроорганізми з біотопу печери «Атлантида» посівом на середовищах МПА + крохмаль та Гіса з цитратом міді, та з сульфатом міді, при температурі 30°C, тривалість 14 діб.

Виявлення мідьрезистентних мікроорганізмів з біотопу печери «Атлантида» проводили методом візуальної оцінки колоній, що виростили на чашках Петрі. Було визначено, що біотоп печери «Атлантида» містила значну кількість мідьрезистентних мікроорганізмів, що здатні взаємодіяти з міддю. За використання середовища МПА + крохмаль з цитратом міді, та з сульфатом міді були виявлені бактерії, що активно відновлювали мідь. Про це свідчила поява коричневих колоній на чашках з середовищем, що містила мідь. Особливий інтерес становлять мідьредуктори, що здатні відновлювати мідь (II) до оксиду міді (I) (рис. 3.1).

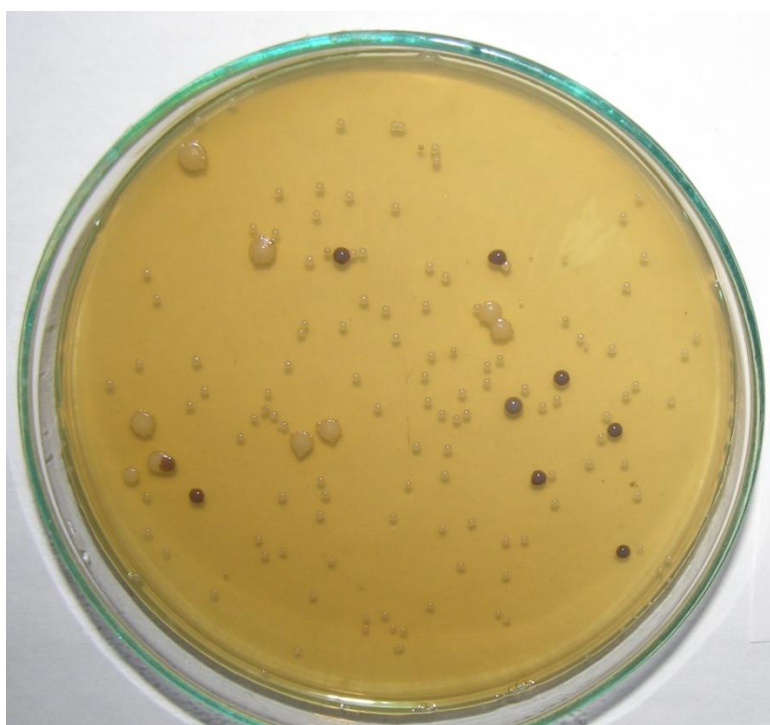


Рис. 3.3. Колонії мідьрезистентних мікроорганізмів на середовищі МПА + крохмаль на 14 добу (коричневі)

Також було встановлено, що виділені мідьрезистентні мікроорганізми краще ростуть на середовищах що містять амінокислоти, ніж на середовищах що містять вуглеводневий склад.

3.3. Встановлення кількості мідьрезистентних мікроорганізмів у біотопі печери «Атлантида»

Кількість мідьрезистентних мікроорганізмів у біотопі печери «Атлантида» встановлювали методом підрахунку колоній на чашках Петрі які виростили на середовищі МПА + крохмаль або на середовищі Гіса з різними формами міді.

3.3.1. Порівняння кількості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида» стійких до токсичної міді(II) у середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit

Найбільша кількість мідьрезистентних мікроорганізмів посіяних з глини на середовище МПА + крохмаль з міддю у формі цитрату міді виростили при концентраціях Cu(II) від 600мг/л до 1200 мг/л ($10,1 \times 10^3$ кл/г). З концентрації 1400мг/л до 2000 мг/л кількість мідьрезистентних мікроорганізмів зменшується до $5,6 \times 10^3$ кл/г. МДК для мідьрезистентних мікроорганізмів на середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit посіяних з глини становить 2000 мг/л, КУО= $5,59 \times 10^3$ (рис. 3.4).

КУО, кл/г $\times 10^3$

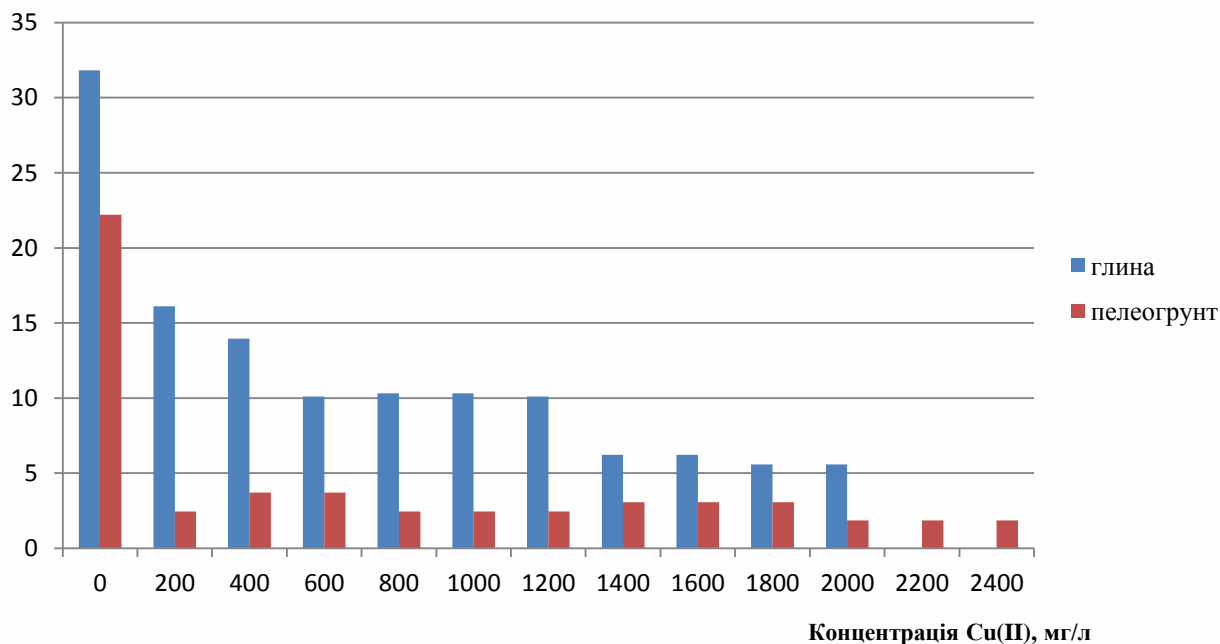
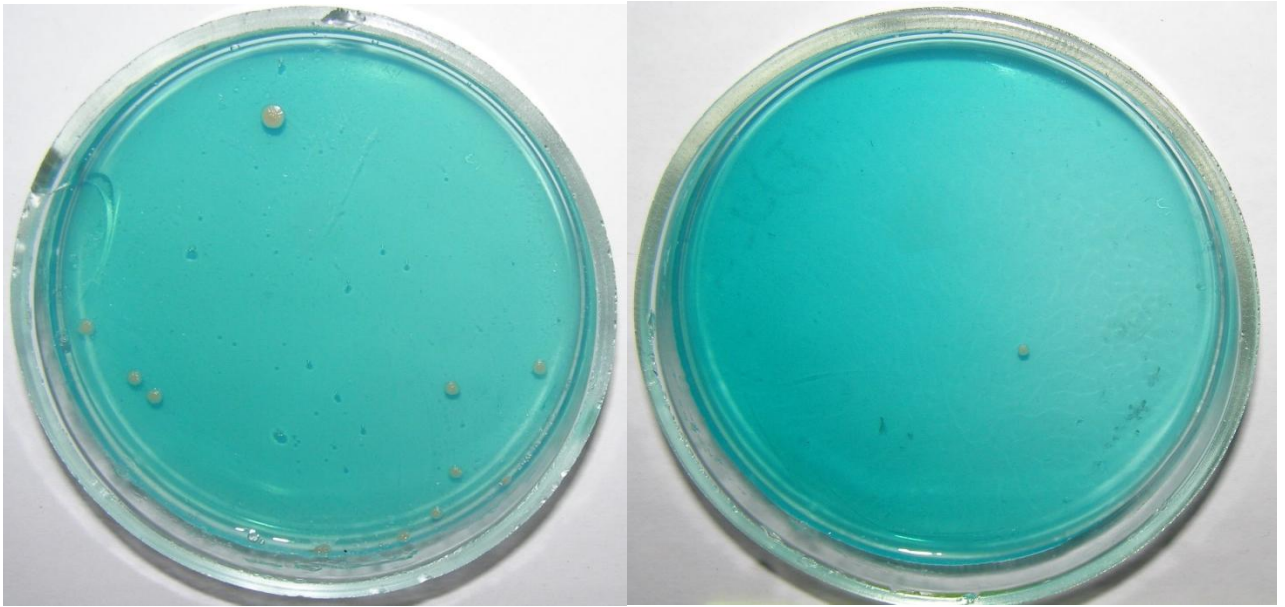


Рисунок 3.4. Кількість мікроорганізмів виділених з глини та пелеоґрунту стійких до міді(II) у середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + сит

Мікроорганізми, що вирости на середовищі МПА + крохмаль з цитратом міді, посіяні з пелеоґрунту в порівнянні з контролем стрімко зменшують свою кількість, що підтверджує токсичну дію міді. Експериментально підтверджено, що, незважаючи на токсичну дію міді у пелеоґрунті біотопа печери «Атлатида» виявлено значну кількість мідьрезистентних мікроорганізмів. МДК для мікроорганізмів на середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + сит становить 2400 мг/л, КУО= $1,85 \times 10^3$ (див. рис. 3.4).



а)

б)

Рисунок 3.5. Мідьрезистентні мікроорганізми стійкі до токсичної міді (II) у середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit, при концентрації 2000 мг/л, виділені з:
а)глини; б) пелеоґрунту

Нами підтверджено, що, незважаючи на токсичну дію міді і катастрофічне зменшення кількості життєздатних клітин, у біотопі печери «Атлантида» виявлено значну кількість мідьрезистентних мікроорганізмів за надвисокої концентрації Cu^{2+} у формі цитрату міді - 2000 мг/л для мікроорганізмів виділених з глини ($5,59 \times 10^3$), 2400 мг/л - з пелеоґрунту ($1,85 \times 10^3$ кл/г).

Характеристика мідьрезистентних мікроорганізмів, виділених з глини біотопа печери «Атлантида» на середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit

№ п/п	Розведення	$[\text{Cu}^{2+}]$, мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
1	10^{-2}	0	49	18 шт- кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 31 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
2	10^{-2}	200	27	13 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 5 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня; 9 шт – жовті, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
3	10^{-2}	400	19	12 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 5 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 1 шт – жовта, кругла, блискуча, рівні края, гладка поверхня
4	10^{-2}	600	12	12 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня
5	10^{-2}	800	16	11 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 5 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня
6	10^{-2}	1000	16	8 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 8 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня
7	10^{-2}	1200	17	11 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 6 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня
8	10^{-2}	1400	6	6 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
9	10^{-2}	1600	11	11 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня;
10	10^{-2}	1800	8	8 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня 2 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня
11	10^{-2}	2000	11	11 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, зморшкувата поверхня

Характеристика мідьрезистентних мікроорганізмів, виділених з пелеогрунту біотопа печери «Атлантида» на середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit

№ п/п	Розведення	$[\text{Cu}^{2+}]$, мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
1	10^{-2}	0	10	10 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
2	10^{-2}	200	1	1 шт – кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
3	10^{-2}	400	3	2 шт – кремові, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня; 1 шт – рожева, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
4	10^{-2}	600	3	2 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 1 шт – кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
5	10^{-2}	800	1	1 шт – кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
6	10^{-2}	1000	1	1 шт – кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
7	10^{-2}	1200	2	2 шт - кремові, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня
8	10^{-2}	1400	2	2 шт - кремові, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня
9	10^{-2}	1600	2	2 шт - кремові, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня
10	10^{-2}	1800	2	2 шт - кремові, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня;
11	10^{-2}	2000	1	1 шт - кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
12	10^{-2}	2200	1	1 шт - кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
13	10^{-2}	2400	1	1 шт - кремова, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня

3.3.2. Порівняння кількості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида» стійких до токсичної міді(II) у середовищі МПА + крохмаль + CuSO_4

Значно меншу стійкість до Cu^{2+} проявляють мікроорганізми виділені з глини якщо мідь присутня у вигляді CuSO_4 (рис. 3.6). Найбільша кількість мідьрезистентних мікроорганізмів спостерігається при концентраціях Cu^{2+} з 50 мг/л до 100 мг/л (82×10^3 кл/г). З концентрації 125 мг/л до 200 мг/л кількість мікроорганізмів стрімко зменшується. МДК на середовищі МПА + крохмаль + CuSO_4 дорівнювало 200 мг/л Cu^{2+} ($0,86 \times 10^3$ кл/г).

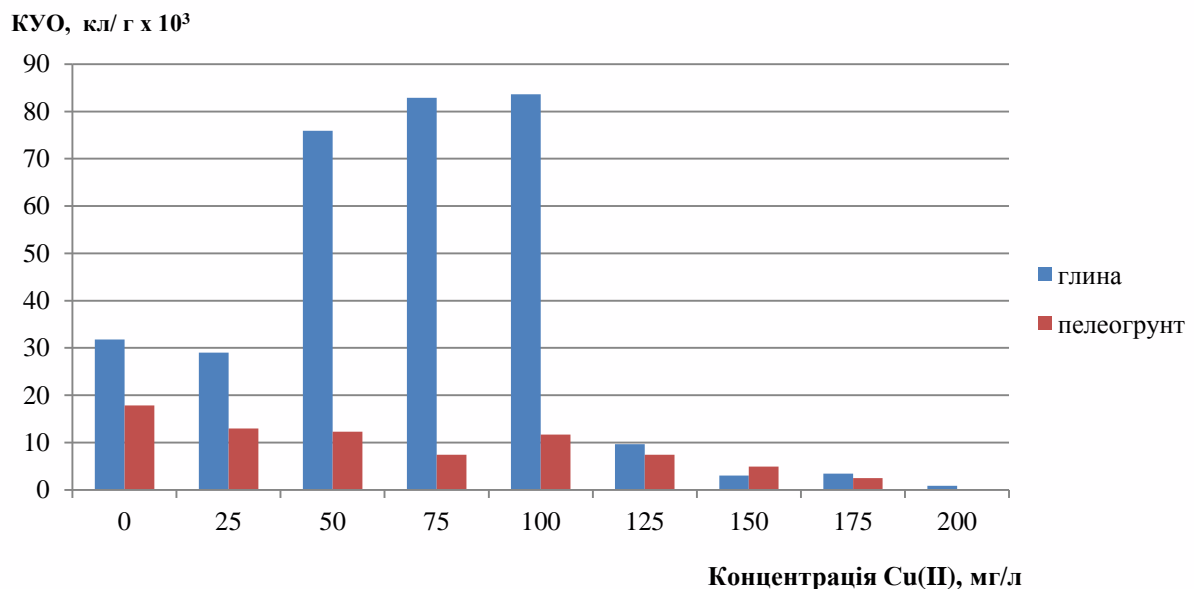
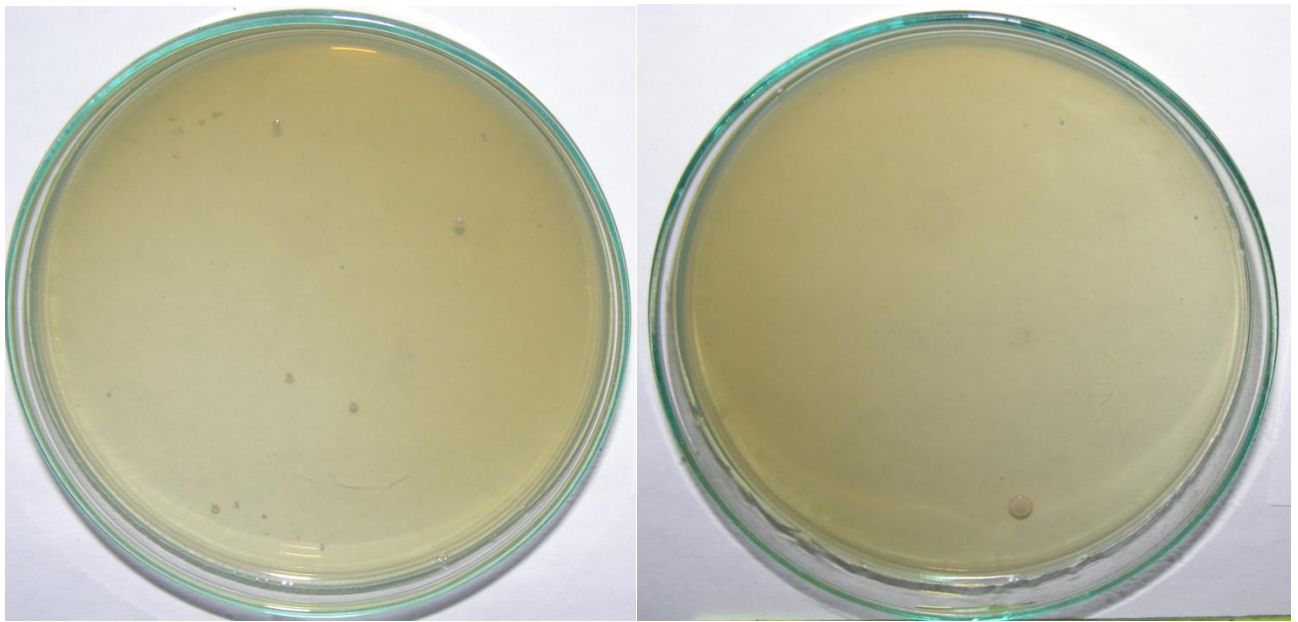


Рисунок 3.6. Кількість мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту стійких до токсичної міді(II) у середовищі МПА + крохмаль + CuSO_4

Біологічна закономірність щодо негативної дії міді спостерігається і у варіанті з мікроорганізмами виділеними з палеогрунту на середовищі з Cu^{2+} у формі CuSO_4 , що говорить про те, що $\text{Cu}(\text{II})$ у вигляді сульфата міді має більшу токсичність, ніж у формі цитрата міді. МДК для мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з палеогрунту на середовищі з CuSO_4 становить 175 мг/л, $\text{КУО} = 2,46 \times 10^3$.



а)

б)

Рисунок 3.7. Мідьрезистентні мікроорганізми стійкі до токсичної міді (II) у середовищі МПА + крохмаль + CuSO_4 , при концентрації 175 мг/л, виділені з:

а)глини; б) палеогрунту

Отже, нами було підтверджено, що меншу стійкість до Cu^{2+} проявляють мікроорганізми виділені з біотопу печери «Атлантида», якщо мідь присутня у вигляді CuSO_4 .

Таблиця 3.3.

Характеристика мідьрезистентних мікроорганізмів, виділених з глини біотопа печери «Атлантида» на середовищі МПА + крохмаль + CuSO_4

№ п/п	Розведення	$[\text{Cu}^{2+}]$, мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
1	10^{-2}	25	43	38 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 5 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
2	10^{-2}	50	113	108 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 5 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня

№ п/п	Розведення	[Cu ²⁺], мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
3	10 ⁻²	75	130	123 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 7 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
4	10 ⁻²	100	133	129 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 4 шт – коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
5	10 ⁻²	125	12	6 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 6 шт - коричневі, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
6	10 ⁻²	150	2	2 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
7	10 ⁻²	175	5	5 шт - кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
8	10 ⁻²	200	1	1 шт – кремова, кругла, блискуча, рівні края, гладка поверхня

Таблиця 3.4

Характеристика мідрезистентних мікроорганізмів, виділених з палеогрунту біотопа печери «Атлантида» на середовищі МПА + крохмаль + CuSO₄

№ п/п	Розведення	[Cu ²⁺], мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
1	10 ⁻²	25	7	7 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
2	10 ⁻²	50	8	7 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 1 шт – коричнева, кругла, блискуча, рівні края, гладка поверхня
3	10 ⁻²	75	3	3 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
4	10 ⁻²	100	8	4 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня; 4 шт – кремові, круглі, блискучі, не рівні края, гладка поверхня
5	10 ⁻²	125	5	5 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
6	10 ⁻²	150	3	3 шт – кремові, круглі, блискучі, рівні края, гладка поверхня
7	10 ⁻²	175	1	1 шт – кремова, кругла, блискуча, рівні края, гладка поверхня

3.3.3. Порівняння кількості мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту біотопу печери «Атлантида» стійких до токсичної міді(II) у середовищі Гіса

Мікоорганізми виділені з біотопу печери «Атлантида» погано ростуть на середовища Гіса. Це говорить про те, що дані мікроорганізми не ростуть на середовищах багатих лише на вуглеводи, їм для росту потрібні білки (амінокислоти) на які багате середовище МПА, що було показано вище.

МДК міді для мікроорганізмів вирощених на середовищі Гіса + Cu^{2+} + cit виділених: з глини становить 200 мг/л ($1,93 \times 10^3$), з палеогрунту – 1 мг/л ($1,07 \times 10^3$).

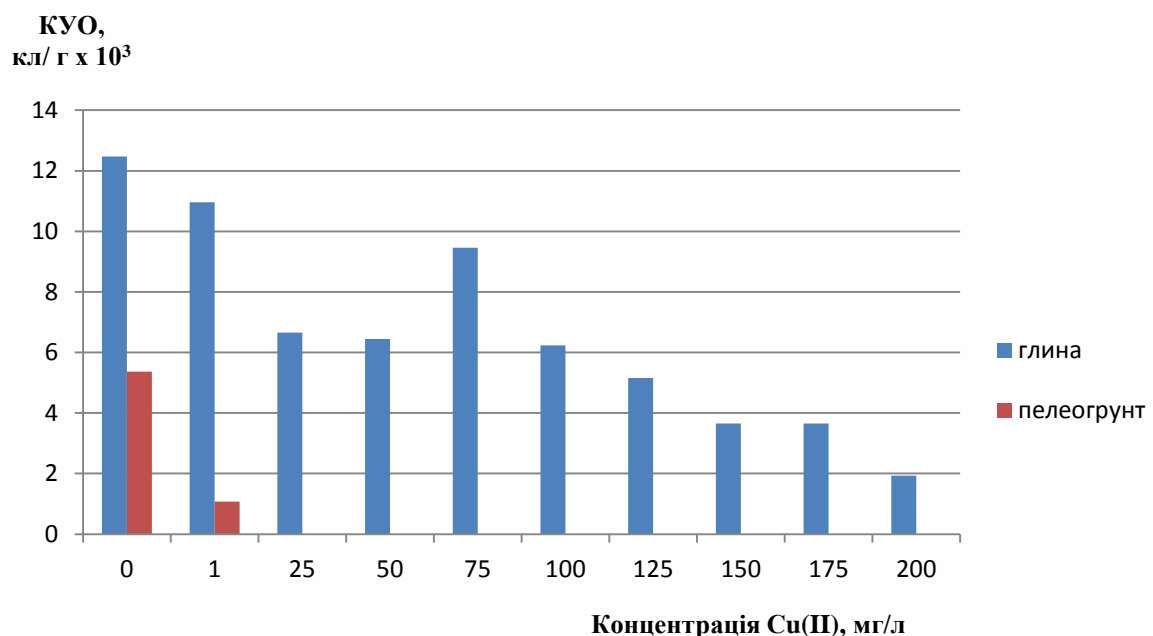


Рисунок 3.8. Кількість мікроорганізмів виділених з глини та палеогрунту стійких до міді(II) у середовищі Гіса + Cu^{2+} + cit

Характеристика мідьрезистентних мікроорганізмів, виділених з глини біотопа печери «Атлантида» на середовищі Гіса + Cu^{2+} + сит

№ п/п	Розведення	$[\text{Cu}^{2+}]$, мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
1	10^{-2}	0	15	10 шт - коричневі, круглі, матові, нерівні края, зморшувата поверхня; 5 шт – кремові, круглі, матові, нерівні края, зморшувата поверхня
2	10^{-2}	1	14	8 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 2 шт – кремові, круглі, матові, нерівні края, зморшувата поверхня; 4 шт – білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня
3	10^{-2}	25	6	6 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня ;
4	10^{-2}	50	12	3 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 8 шт – кремові, круглі, матові, нерівні края, зморшувата поверхня; 4 шт – білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня
5	10^{-2}	75	18	13 шт - коричневі, круглі, матові, нерівні края, зморшувата поверхня; 5 шт - білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня
6	10^{-2}	100	11	2 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 4 шт - коричневі, круглі, матові, нерівні края, зморшувата поверхня; 5 шт - білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня
7	10^{-2}	125	8	3 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 1 шт – кремова, кругла, матова, нерівні края, зморшувата поверхня 4 шт – білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня
8	10^{-2}	150	6	3 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 1 шт – кремова, кругла, матова, нерівні края, зморшувата поверхня 2 шт – білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня
9	10^{-2}	175	4	2 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 2 шт – білі, круглі, матові, рівні края, зморшувата поверхня

10	10^{-2}	200	3	3 шт – коричневі, круглі, матові, рівні края, гладка поверхня; 1 шт – біла, кругла, матова, рівні края, зморшкувата поверхня
----	-----------	-----	---	---

Таблиця 3.6

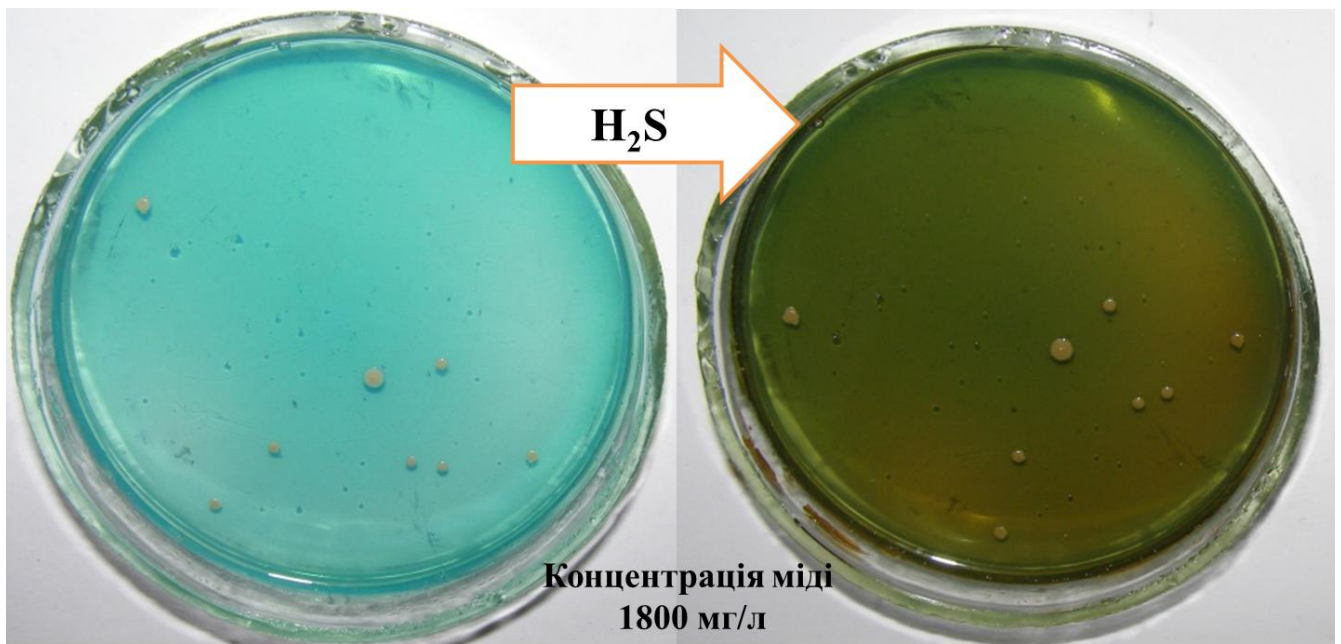
Характеристика мідьрезистентних мікроорганізмів, виділених з палеогрунту біотопа печери «Атлантида» на середовищі Гіса + Cu^{2+} + cit

№ п/п	Розведення	$[\text{Cu}^{2+}]$, мг/л	КУО/шт	Кількість морфотипів колоній
1	10^{-2}	0	8	2 шт – оранжеві, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня; 6 шт – кремові, круглі, матові, рівні края, зморшкувата поверхня;
2	10^{-2}	1	1	1 шт – біла, кругла, матові, рівні края, гладка поверхня

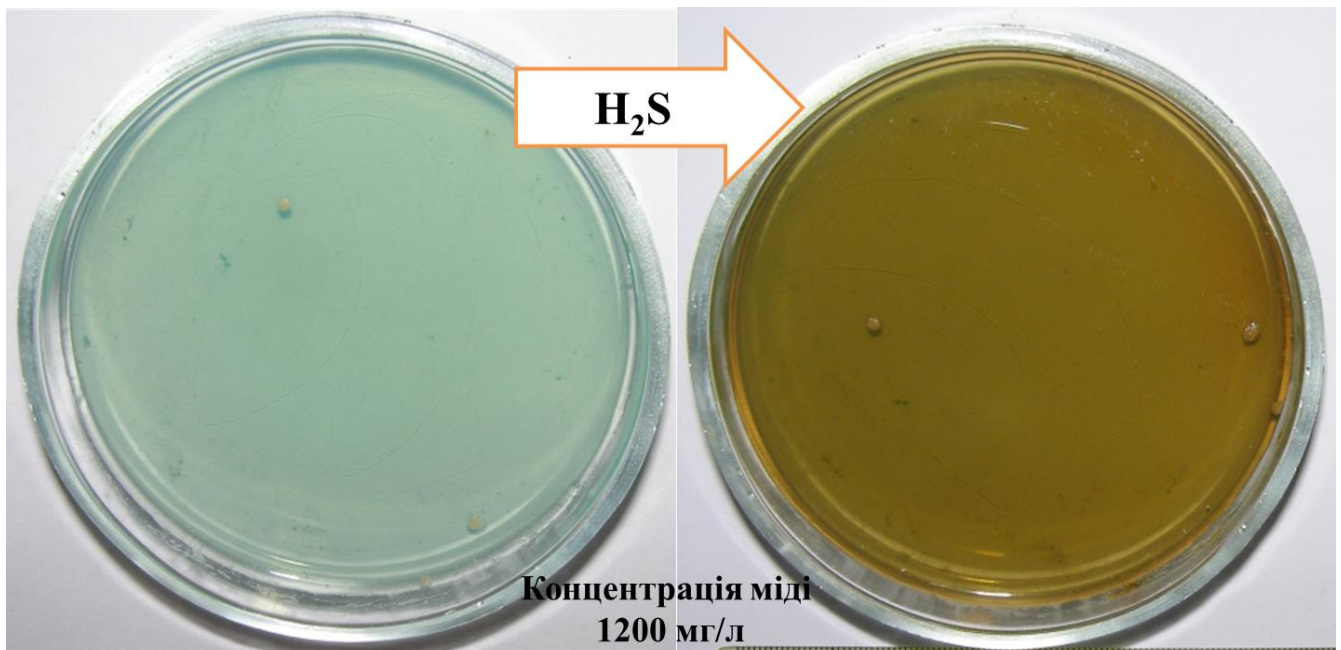
3.4. Визначення способів взаємодії мікроорганізмів природної екосистеми печери «Атлантида» з міддю (II)

Визначення способів взаємодії мікроорганізмів природної екосистеми печери «Атлантида» з міддю (II) проводили за допомогою якісної реакції з H_2S . Колонії, що накопичували $\text{Cu}(\text{II})$, забарвлювалися в коричневий колір (рис. 3.9) внаслідок утворення сульфиду міді: $\text{Cu}^{2+} + \text{S}^{2-} = \text{CuS} \downarrow$.

Виділені нами мікроорганізми з біотопа печери «Атлантида» не тільки стійкі до Cu^{2+} у формі цитрата міді у надвисоких концентраціях, але і здатні вилучати її з водних розчинів завдяки накопиченню Cu^{2+} .



а)



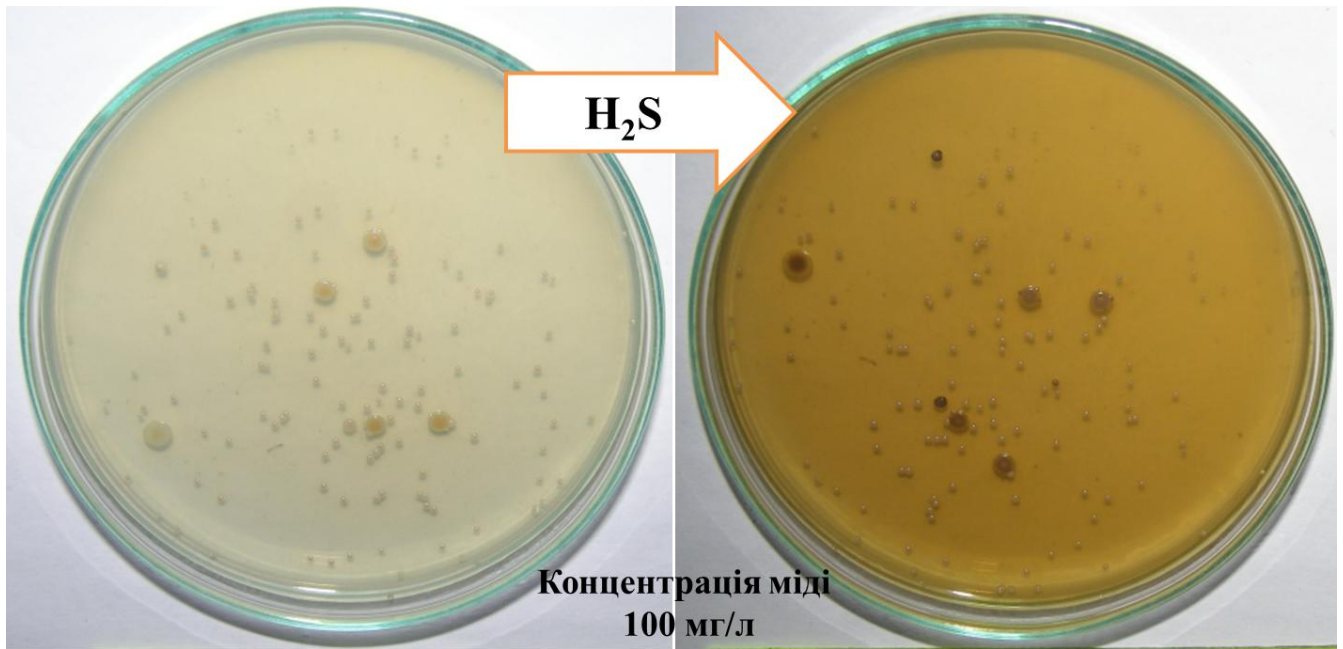
б)

Рисунок 3.9. Візуальна оцінка колоній, що проросли на середовищі МПА + крохмаль + Cu^{2+} + cit , після обробки сірководнем:

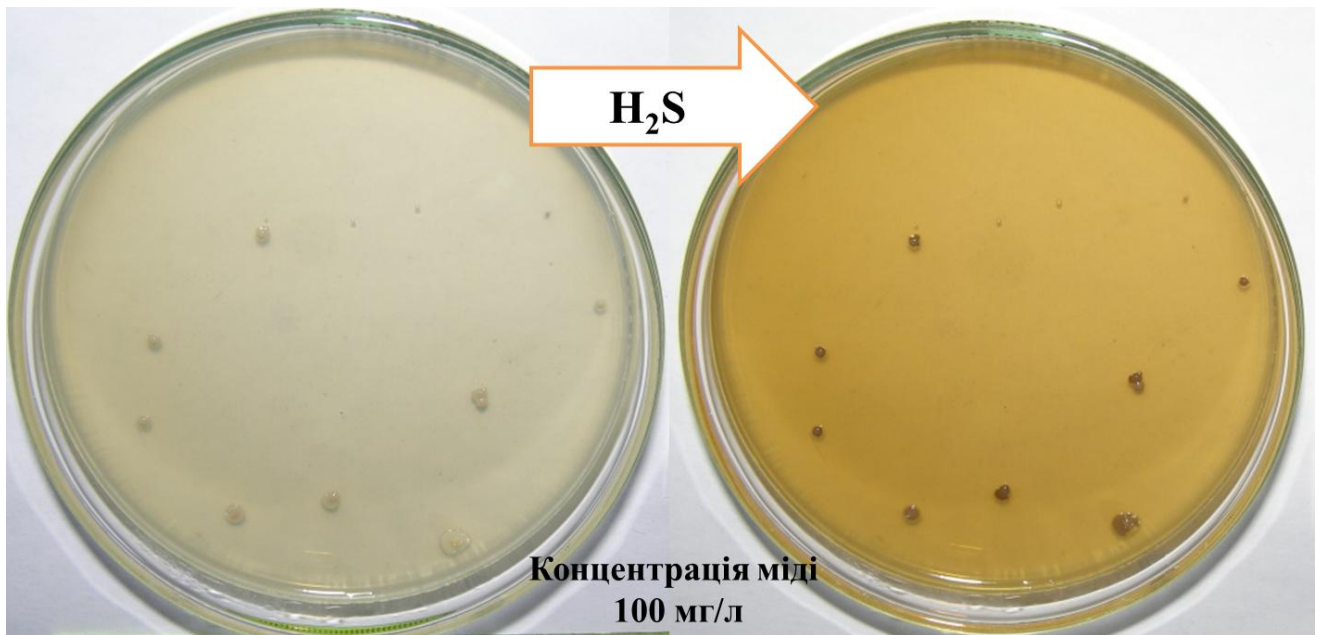
а) глина; б) пелеоґрунт

Внаслідок проведення якісної реакції з H_2S , отримали колонії, які змінили забарвлення на коричневе, завдяки накопиченню Cu^{2+} (див рис. 3.10), що ще раз підтвердили, що на середовищі МПА + крохмаль мікроорганізми виділені з глини

біотопа печери «Атлантида» не тільки стійкі до міді у надвисоких концентраціях, але і накопичують її.



а)



б)

Рисунок 3.12. Візуальна оцінка колоній, що проросли на середовищі МПА + крохмаль + CuSO₄, після обробки сірководнем:

а) глина; б) палеогрунт

3.5. Висновки до розділу

Підсумовуючи оброблені результати експерименту, прослідковується загальна біологічна закономірність щодо токсичної дії міді. З підвищенням концентрації міді кількість життєздатних клітин мікроорганізмів катастрофічно зменшується.

Найбільш згубний вплив на мікробіоту біотопу печери «Атлантида» проявила дія токсичної міді(II) у формі CuSO_4 у середовищі МПА + крохмаль. Однак, вдалося встановити, що в пелеоґрунті при 175 мг/л Cu^{2+} кількість мікроорганізмів становила $2,46 \times 10^3$ КУО/г, в глині при 200 мг/л Cu^{2+} - $8,6 \times 10^2$ КУО/г.

Експериментально виявили, що найбільшу стійкість мікроорганізми проявили при взаємодії з розчином цитрату міді (II) у середовищі МПА + крохмаль. Вперше встановили, що за концентрації 2400 мг/л Cu^{2+} зразок пелеоґрунту містив $1,85 \times 10^3$ КУО/г, зразок глини при концентрації 2000 мг/л містить $5,59 \times 10^3$ КУО/г.

Це свідчить про високу стійкість мікроорганізмів даної екосистеми до сполук двохвалентної міді. Отже, нами підтверджено, що, незважаючи на токсичну дію міді і катастрофічне зменшення кількості життєздатних клітин, у біотопі печери «Атлантида» виявлено значну кількість мідьрезистентних мікроорганізмів.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1 Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида"

Проаналізувавши умови праці при виконанні експериментальної частини дипломної роботи у лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного можна виділити ряд шкідливих та небезпечних виробничих факторів, які впливають на здоров'я і працездатність людини. Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у лабораторії діяли фізичні та хімічні небезпечні виробничі фактори. До фізичних належать підвищена температура повітря робочої зони, підвищені рівні шуму на робочому місці, підвищений рівень ультрафіолетової радіації та ін. [74].

Підвищена температура повітря робочої зони. Джерелом цього фактору є термостати, автоклави, сушильні шафи, дистильатори та електричні плитки. У теплу пору року робота вказаних приладів призводить до підвищення температури повітря робочого приміщення до 34-38 °С при відносній вологості 40-60 %, що негативно впливає на організм працівника [75].

Підвищені рівні шуму на робочому місці. Основними джерелами шуму у приміщенні лабораторії є термостат електричний сухоповітряний ТС-80М, шафа сушильна електрична СШ-30, холодильник побутовий «Gorenje». Нормативний рівень звуку згідно з ДСН 3.3.6.037-99 для приміщень де виконуються висококваліфіковані роботи, вимірювальні та аналітичні роботи становить 50 дБА [76]. Фактичне значення шуму при виконанні робіт в лабораторії становить 57,8 дБА, що не відповідає встановленим нормам.

Підвищений рівень ультрафіолетової радіації. В ході виконання експериментальної частини дипломної роботи по дослідженні особливостей

мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида" використовували ультрафіолетові стерилізатори, якими оснащені ламінарні бокси у лабораторії. Допустимі значення густини УФ-променів для діапазону 220 - 280 нм становлять 0,01 Вт/м².

Також під час виконання експериментальної частини дипломної роботи на організм працівника діяли **хімічні** небезпечні і шкідливі виробничі фактори. Хімічні речовини (шкідливі та небезпечні), що використовувалися працівником відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 за характером впливу на організм людини поділяються на токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори, подразнюючі хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори.

Токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. До цієї групи хімічних факторів належить спирт етиловий, що використовувався для дезінфекції інструментів під час виконання експериментальної частини дипломної роботи. Етиловий спирт належить до 4-го класу безпеки, а його ГДК у повітрі робочої зони (за ГОСТ 12.1.005-88) становить 1000 мг/м³. До цієї групи відносять також сірководень, що використовувався для визначення типу взаємодії мікроорганізмів з міддю. Сірководень відносять до 3-го класу безпеки, ГДК у повітрі робочої зони – 10 мг/м³.

Подразнюючі небезпечні і шкідливі виробничі фактори. До цієї групи хімічних факторів належить NH₄Cl, що використовувався для приготування середовища Гіса. За ступенем дії на організм людини ця шкідлива речовина входить до 3-го класу безпеки і є помірно небезпечна для працівників. Згідно з ГОСТ 12.1.005-88 ГДК луку становить 10 мг/м³[77].

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні особливостей мідьрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида"

Зменшення рівня впливу підвищеної температури. Нормалізація несприятливих мікрокліматичних умов у лабораторії здійснюється за допомогою комплексу заходів та способів, які включають: будівельно-планувальні, організаційно-технологічні, санітарно-технічні та ін. заходи колективного захисту. Для профілактики перегрівань та переохолоджень робітників використовуються засоби індивідуального захисту, медико-біологічні тощо.

Оптимальна температура, значення якої відповідають вимогам ДСН 3.3.6.042-99 на робочих місцях досягаються за рахунок раціонального планування приміщення і оптимального розміщення в ньому устаткування з тепло-, холодо- та вологовиділеннями. Для зменшення термічних навантажень на працюючих передбачається максимальна механізація, автоматизація та дистанційне управління технологічними процесами і устаткуванням.

Для зменшення впливу підвищеної температури у приміщеннях із значними площами застелених поверхонь передбачаються заходи щодо захисту від перегрівання при попаданні прямих сонячних променів в теплий період року (орієнтація віконних прорізів схід - захід, улаштування жалюзей та ін.). При температурі внутрішніх поверхонь огорожуючих конструкцій вище допустимих величин робочі місця повинні бути віддалені від них на відстань не менше 1 м.

У виробничих приміщеннях з надлишком (явного) тепла використовують природну вентиляцію (аерацію). Аераційні ліхтарі та шахти розташовують безпосередньо над основними джерелами тепла на одній осі. У разі неможливості або неефективності аерації встановлюють механічну загальнообмінну вентиляцію. При наявності одиничних джерел тепловиділень оснащують обладнання місцевою витяжною вентиляцією у вигляді локальних відсмоктувачів, витяжних зонтів та ін. У невеликих за об'ємом приміщеннях при виконанні робіт використовують системи

кондиціонування повітря з індивідуальним регулюванням температури та об'єму повітря, що подається.

Згідно вимогам, в лабораторії адаптаційної біотехнології присутня система вентиляції, що представлена загальнообмінною витяжною вентиляцією та місцевими вентиляційними системами з використанням витяжних шаф. Для підтримання комфортних умов праці в теплий період року існує система кондиціонування повітря. Всі вище перераховані системи вентиляції дозволяють підтримувати відповідну до вимог ДСН 3.3.6.042-99 температуру та вологість повітря. В сушильній шафі та термостаті передбачена теплоізоляція для уникнення теплового опромінювання лаборантів.

Контроль параметрів мікроклімату здійснюється рядом вимірювальних засобів: температура повітря – термометром; відносна вологість повітря – психрометром; швидкість руху повітря – анемометрами; інтенсивність теплового випромінювання – актинометром або через температуру поверхні обладнання, що вимірюють дистанційно; барометричний тиск – барометром.

Зменшення впливу підвищеного рівня шуму. Відповідно до ГОСТ 12.1.029-80 для захисту від підвищеного рівня шуму в лабораторії адаптаційної біотехнології можливе використання як колективних, так і індивідуальних заходів та засобів захисту [78]. Призначення засобів індивідуального захисту від шуму - перекрити найбільш чутливі канали проникнення звуку в організм - вуха. Такі засоби дозволяють одночасно попередити розлад і всієї нервової системи від дії інтенсивного подразника, яким є шум. До засобів захисту від шуму належать навушники, протишумові вкладки, шумозаглушувальні шоломи.

Коллективного захисту від шуму у лабораторії адаптаційної біотехнології можна досягти зменшенням шуму в самому джерелі; зменшення шуму на шляху його поширення та організаційно-технічними заходами.

Найбільш оптимальними заходами захисту від шуму, які можна використати у лабораторії – це організаційно-технічні засоби, що передбачають дотримання правил технічної експлуатації, проведення планово-попереджувальних оглядів та ремонтів, а також віддалене розташування центрифуг та холодильників від робочих

місць. Крім того, для боротьби з шумом в лабораторії пропонується ввести додаткові акустичні заходи - звукоізоляція та звукопоглинання (встановлення звукоізоляційних кожухів).

Вимірювання і аналіз шуму відбувається за допомогою інтегруючого шумоміра 00026 «Robotron».

Зменшення шкідливого впливу УФ-випромінювання. При роботі УФ-стерилізатора роботи в боксі не ведуться. Для нейтралізації шкідливого впливу користуються захисним екраном або спеціальною захисною маскою оскільки УФ-випромінювання може викликати опіки шкіри та слизової очей. [79]

Для зниження шкідливого впливу УФ-випромінювання при ввімкнених УФ-лампах застосовується екранування джерела УФ променів флінтгласом.

Додатково рекомендовано до впровадження застосування співробітниками лабораторії мазей з вмістом речовин-світлофільтрів. Також рекомендовано використання засобів захисту від УФ-випромінювання. При використанні спецодягу та засобів захисту обличчя, рук, що не пропускають випромінювання (шкіра, тканини з плівковим покриттям тощо), допустима інтенсивність в області УФ-В і УФ-С не повинна перевищувати 1 Вт/м^2 [79].

Захист працівників від несприятливого впливу хімічних небезпечних і шкідливих виробничих факторів. Захист працівників від несприятливого впливу хімічних речовин у лабораторії адаптаційної біотехнології можна здійснювати за допомогою таких заходів:

- удосконалення і розробки нових технологічних процесів, які виключають використання шкідливих хімічних речовин;
- заміни шкідливих речовин менш шкідливими;
- установлення концентрації хімічних речовин у сумішах;
- комплексної механізації та автоматизації процесів, що супроводжуються шкідливими виділеннями;
- раціонального планування цехів і обладнання (ізоляції шкідливих речовин, ізоляція місць зберігання шкідливих речовин);

- влаштування місцевої вентиляції для відсмоктування шкідливих речовин безпосередньо від місця їх утворення;
- використання індивідуальних засобів (спецодягу, окулярів, шоломів, масок, протигазів та респіраторів, антисептичних паст і т. д.);
- контролю за станом повітряного середовища на робочих місцях;
- токсикологічної експертизи і гігієнічної стандартизації всіх хімічних речовин;
- проведення періодичних профілактичних медичних оглядів;

До самостійної роботи у лабораторії допускаються особи, яким виповнилося 18 років та які пройшли інструктаж з охорони праці на робочому місці, медогляд та мають відповідну освіту. На кожен одиницю обладнання лабораторія має паспорт підприємства-виробника, а на робочих місцях вивішені інструкції з експлуатації з урахуванням вимог біологічної безпеки. Для попередження отруєнь усі ємності мають етикетку з назвою реактиву, хімічною формулою, датою, токсичністю. Відходи хімічних реактивів та органічних розчинників зберігаються у спеціальних контейнерах. Роботу з отруйними речовинами та біологічним матеріалом виконували в гумових рукавицях та захисних окулярах. При виконанні експерименту робочі поверхні та нітрилові рукавички оброблялися дезінфікуючим розчином (70% спирт). У приміщенні лабораторії на видному місці знаходяться укомплектована аптечка із засобами першої медичної допомоги [80]. Мінімальне число персоналу в лабораторії при виконанні небезпечних робіт та вночі повинне бути не менше двох осіб.

4.2.1. Розрахунок загальнообмінної вентиляції для нормалізації температури робочого приміщення – лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного

Підвищена температура робочого приміщення є небезпечним та шкідливим виробничим фактором. У лабораторії адаптаційної біотехнології експериментальна

робота проводилася у теплу пору року. Джерелом цього фактору у лабораторії були термостати, автоклави, сушильні шафи, дистиллятори та електричні плитки. У теплу пору року робота вказаних приладів призводить до підвищення температури повітря робочого приміщення до 34-38 °С при відносній вологості 40-60 %, що негативно впливає на організм працівника.

Інтенсивність теплового опромінення працюючих від відкритих джерел (нагрітий метал, скло, "відкрите" полум'я та ін.) не повинна перевищувати 140 Вт/м² [81].

Оскільки у лабораторії було щонаймеш 6 джерел додаткового тепловиділення (термостати, автоклави, сушильні шафи, дистиллятори та електричні плитки), то можливо розрахувати повітрообмін (L_n) для нормалізації температури робочого приміщення.

При боротьбі з надмірним теплом необхідний повітрообмін визначається з умов асиміляції теплових надлишків об'ємом повітря, що подається, м³/год [82].

$$L_n = \frac{Q_{надл}}{c \cdot \rho_{пр} \cdot (t_{вид} - t_{пр})}, \quad (1)$$

де $Q_{надл}$ - надлишкові тепловиділення, Вт;

c – питома теплоємність припливного повітря, в розрахунках беремо 1,01 Дж/(кг*К);

$\rho_{пр}$ - густина припливного повітря, в розрахунках беремо 1,2 кг/м³;

$t_{вид}$ - температура повітря, яке видаляється з приміщення, °К;

$t_{пр}$ - температура повітря, яке подається в приміщення, °К.

Враховуючи індивідуальні значення джерел додаткового тепловиділення у лабораторії сумарне значення $Q_{надл}$ становить 1000 Вт. Температура повітря, яке видаляється з приміщення ($t_{вид}$) - 38 °С або 311,15 °К, температура повітря, яке подається в приміщення ($t_{пр}$) - 20 °С або 293,15 °К. Розрахуємо необхідний повітрообмін L_n , що забезпечить оптимальні умови праці.

$$L_n = \frac{Q_{надл}}{c \cdot \rho_{np} \cdot (t_{зд} - t_{np})} = \frac{1000}{1,01 \cdot 1,2 \cdot (11,15 - 293,15)} = 45,83 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Оскільки робоче приміщення невелике за об'ємом, то при виконанні подібних науково-дослідних робіт необхідною та достатньою умовою успішної роботи є використання системи кондиціонування повітря з індивідуальним регулюванням температури та об'єму повітря, що подається.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки під час дослідження особливостей мідрезистентних мікроорганізмів виділених з біотопу печери "Атлантида"

Вірогідними джерелами пожежі в рамках виконання експерименту можуть бути: виникнення полум'я при перенавантаженні електричного обладнання (ламінарий бокс, Уф-лампи, електричні плитки, атоклави) та пошкодженні електропроводки; займання легкоокисних органічних та неорганічних речовин (етанол у спиртовому пальнику для фламбування пінцетів для стерильної посадки рослин) при контакті з вогнем або з окисниками внаслідок порушення правил зберігання легкозаймистих речовин, використанні відкритого полум'я, прямий удар блискавки в будівлю [83].

У роботі з газовим пальником можливе «проскакування» полум'я, що може призвести до загоряння гумової трубки чи прилеглих предметів і речовин. Загоряння може відбутися під час стерилізації сухим жаром посуду, що загорнена в папір, за умов неправильного режиму роботи сушильної шафи. Причиною пожеж може стати несправність електричних приладів.

На випадок пожежі у робочому приміщенні у відповідних місцях завжди повинні бути: пожежний рукав; шухляда з піском; азбестова ковдра; вогнегасник; чотирихлористий вуглець. За умов виникнення пожежі в лабораторії всі наявні під рукою засоби гасіння необхідно негайно використовувати й одночасно викликати

місцеву пожежну команду. Попередження пожежі в лабораторії адаптаційної біотехнології може досягатися:

- максимально можливим застосуванням негорючих і важкогорючих речовин і матеріалів;
- обмеженням маси і об'єму горючих речовин, матеріалів та найбільш безпечним способом їх розміщення;
- ізолюванням горючого середовища;
- підтримуванням концентрації горючих газів, пари, суспензій і окислювача в суміші за межею їх спалаху;
- достатньої концентрації флегматизатора в повітрі захищеного об'єкту;
- підтримуванням температури і тиску горючого середовища, за якими розповсюдження полум'я неможливе;
- максимальною механізацією і автоматизацією технологічних процесів, пов'язаних з вживанням горючих речовин;
- встановленням пожежонебезпечного обладнання, по можливості, в ізольованих приміщеннях чи на відкритих площадках;
- застосуванням для горючих речовин герметичного обладнання і тари;
- застосуванням пристроїв захисту виробничого обладнання від ушкоджень і аварій, встановленням відключаючих, відсікаючих та інших пристроїв;

На випадок пожежі у лабораторії адаптаційної біотехнології застосовуються наступні заходи:

- приміщення з різною пожежною небезпекою розділені протипожежними перегородками з гіпсокартону із заповненням мінеральними плитами (границя вогнестійкості 1,25 години);
- у коридорах на шляхах евакуації персоналу передбачені протидимові та протипожежні перегородки;
- розміщення пожежних кранів виконано у пожежних шафах, на шляхах евакуації персоналу шафи розміщені у нішах;

- електропроводка за підвісною стелею виконана з кабелів з мідними жилами у оболонці, що не розповсюджує горіння;
- проводки кабелів та проводів крізь стіни виконані у обрізах сталевих труб та закриті вогнетривкою сумішшю;
- приміщення підприємства обладнані протипожежною сигналізацією [84].

4.4. Висновки до розділу

Проаналізувавши умови праці при виконанні експериментальної частини дипломної роботи у лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного можна виділити ряд шкідливих та небезпечних виробничих факторів, які впливають на здоров'я і працездатність людини. Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у лабораторії діяли фізичні та хімічні небезпечні виробничі фактори.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Біосорбція

В даний час досить гостро стоїть проблема забруднення навколишнього середовища (НС) різними поллютантами. До числа найбільш поширених і небезпечних забруднювачів НС відносять сполуки важких металів (ВМ), які в силу високої токсичності, рухливості і біоаккумуляції становлять небезпеку для людини [85].

Одним із шляхів видалення ВМ з компонентів НС є біосорбція. В її основі лежить здатність живих організмів, перш за все мікроорганізмів (МО), акумулювати ВМ. Біосорбція є фізико-хімічним процесом, який полягає у видаленні речовин з розчину біологічним матеріалом [86].

Дослідження з вивчення сорбційних здібностей живих організмів почали активно проводитися з 90-х рр. ХХ століття.

Практично весь біологічний матеріал має певну спорідненість до ВМ. Проведено безліч досліджень по використанню рослинної і тваринної біомаси, а також похідних продуктів (наприклад, хітозану) в якості біосорбентів. Однак більшість досліджень по біосорбції традиційно продовжує проводитися на МО, головним чином, на бактеріях, водоростях і мікроміцетах [87].

Серед мікробів-біосорбентів останнім часом основні позиції займають мікроскопічні гриби. Вони проявляють стабільно високу сорбційну активність до більшості ВМ. Деякі види грибів зазвичай пов'язані з субстратами, багатими ВМ, і можуть навіть розглядатися як їх гіпераккумулятори [88].

Особливості мікроміцетів, як сорбентів важких металів. Мікроскопічні гриби є одними з найбільш стабільних і домінуючих представників мікробіоти. Вони виявлені у всіх екосистемах, де колонізують численні субстрати, виконуючи різноманітні функції. Багато видів грибів - космополіти і генералісти, або фахівці,

обмежені в поширенні лише певним субстратом. Серед їх місце мешкань виявлені і такі незвичайні, як сухі арктичні пустелі, антарктичні долини, арктичні льоди, солончаки і занадто засолені мікробні мати. Численними є муталістичні зв'язки грибів з іншими організмами. Одним з яскравих прикладів коеволюції грибів і комах є грибна мімікрія під яйця термітів [89].

В освоєнні наземного середовища грибами простежується три принципово різних стратегії: активного пристосування, підпорядкування середовищу і уникнення несприятливих умов.

Так само активно мікроміцети заселяють і техногенно перетворені території. Доведено високий ступінь їх адаптації до дії поллютантів природного і антропогенного походження. З одного боку, це призвело до негативних екологічних наслідків, так як виживання мікроміцетів в забрудненому середовищі стимулювало перехід багатьох, раніше сапрофітних видів в розряд опортуністичних, що викликають хвороби людей, тварин і рослин [90], а також підвищення агресивності фітопатогенів. З іншого боку, певні види мікроскопічних грибів можна розглядати як потенційних агентів біоремедіації забруднених ґрунтів внаслідок їх здатності до продукування органічних хелатуючих кислот, біотрансформації мінеральних руд, деструкції таких забруднювачів, як нафта і нафтопродукти, пестициди, синтетичні поверхнево-активні речовини, ароматичні вуглеводні, синтетичні полімери, а також біосорбційної активності по відношенню до ВМ.

Пошук МО, які акумулюють і трансформують ВМ з НС, - одна з важливих завдань біотехнології. Зокрема, численні модельні досліди і польові дослідження дозволили виявити коло мікроміцетів, стійких до ВМ і які володіють високою сорбційною активністю по відношенню до них.

Наприклад, виділені з руди і шахтних вод штами грибів були перевірені на їх здатність рости при підвищених концентраціях міді і нікелю в середовищі [91]. Серед грибів, стійких до міді, виділені наступні види: *Ulocladium botrytis*, *Trichoderma viride*, *Penicillium chrysogenum* var. *chrysogenum*, *P. decumbens*. Толерантність до нікелю проявляли інші види грибів: *P. commune*, *P.*

aurantiogriseum, *P. chrysogenum* var. *chrysogenum*, причому останній вид стійкий як до нікелю, так і до міді.

Найбільш активними сорбентами Cu були штами *Cladosporium cladosporioides* і *Stachybotrys chartarum*. Сорбція іонів міді була вище у штамів грибів, виділених з сучасних ґрунтів, в порівнянні з тими, які виділені з археологічних ґрунтів [92]. Неодноразово зазначалося домінування грибів р. *Fusarium* в ґрунтах, забруднених ВМ.

Показано [93], що високою сорбційною здатністю по відношенню до Cr, Cd, Pb і Co володіли мікроміцети, виділені з стічних вод підприємств хімічної промисловості і шкіряних заводів. Серед чотирьох видів роду *Aspergillus*, виділених із стічних вод шкіряного виробництва, *A. terreus* продемонстрував відмінну адсорбційну здатність по відношенню до хрому [94]. Відпрацьована біомаса, яка містить мертві клітини *A. niger*, показала хороші сорбційні властивості по відношенню до іонів заліза (II) і (III), до іонів нікелю.

Як біосорбент особливий інтерес представляють дріжджі, що обумовлено, в першу чергу, їх широкою доступністю і унікальністю природи живих і мертвих дріжджових клітин, а також їх мутантних типів як культивованих лабораторними методами, так і одержуваних в результаті відходу бродильних виробництв. Ефективними біосорбентами металів є дріжджі пологів *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* [95]. Показана також можливість біоаккумуляції Cu, Co, Zn з води суспендованих в ній клітинами дріжджів *Kluuveromyces marxianus* [96]. Сорбція Cu і Co мертвими клітинами була, відповідно, на 61 і 75% вище, ніж живими. На прикладі дріжджів *Rhodotorula glutinis* було встановлено, що вони мають здатність протягом 10 хв сорбувати 80% свинцю з водних розчинів.

В цілому, слід зазначити, що певна кількість зв'язаного ВМ залежить не тільки від біосорбенту (вид МО, тип біомаси, концентрація клітин, життєздатність, елементний склад), але також від природи іона металу, його концентрації, а також інших фізико-хімічних чинників таких, як температура розчину, рН, іонна сила і вплив іонів інших металів, які присутні в розчині [97].

Ефективність мікробної сорбції також визначається концентрацією біомаси і часом, протягом якого МО контактують з розчином іонів металу. До певного моменту зростання кількості мікробних клітин в середовищі інтенсифікує процес зв'язування металів, але потім ефективність сорбції починає плавно знижуватися в зв'язку з неповним використанням сорбуючої поверхні біомаси. Зростання часу експозиції спочатку різко збільшує ефективність біосорбції, а потім крива їх залежності виходить на плато в точки вичерпання адсорбційної ємності біомаси [98].

Механізми біосорбції. Розуміння механізмів біосорбції є основним для оптимізації її застосування. Так, якщо механізм біосорбції заснований на іонному обміні, то, змінюючи іонну силу розчину, можна впливати на поглинання металу. Вибір методу десорбції також залежить від задіяного механізму. Наприклад, зв'язування металу з кислотними групами може бути усунуто зниженням рН і протонуванням цих груп.

Виявити, який механізм сорбції характерний для того чи іншого сорбенту, досить складно. По-перше, біосорбенти містять різні типи клітин, що складаються з безлічі молекул, що містять кілька ділянок (сайтів) зв'язування. По-друге, навіть один сайт зв'язування може брати участь в різних механізмах. Наприклад, карбоксильні групи здатні до комплексоутворення, до електростатичного притягання іонів ВМ. По-третє, механізм може визначатися зовнішніми умовами (рН середовища, температура, аерація і т. П.) [97].

Для біосорбції може бути використана як «жива», так і «мертва» біомаса, а також попередньо хімічно оброблена біомаса. Використання живих МО більш трудомісткий процес: необхідно передбачити систему їх життєзабезпечення, розмноження і десорбції ВМ. У зв'язку з цим застосування неживих МО в технологічних процесах більш рентабельно і менш затратно.

Рівень сорбції живою біомасою в багатьох випадках виявляється вище, ніж у неживій. Показано, що сухі пекарські дріжджі сорбують тільки 22-27% ВМ із забруднених вод, в той час як при використанні живих клітин рівень сорбції становить від 65-99% [99]. Механізм сорбції ВМ живими дріжджами відрізняється

динамічністю за рахунок утворення різних речовин, що беруть участь в детоксикації (глутатіон, металлотіонеїнов, фітохелатіни і ін.).

На основі клітинного метаболізму механізми біосорбції можна класифікувати на незалежні і залежні від нього.

Механізми, незалежні від метаболізму, характерні як для живих, так і для неживих клітин, вони включають неспецифічне зв'язування металу з клітинними поверхнями МО, шарами слизу, позаклітинними матрицями і т.д. (Пасивне поглинання) і осадження на поверхні мікробної клітини [100]. Даний процес протікає досить швидко, можна зупинити і не залежить від температури.

Механізми, залежні від метаболізму, характерні тільки для живих МО, в їх основі лежить перенесення іонів ВМ через клітинну мембрану, внутрішньоклітинне поглинання і накопичення (біоаккумуляція). Як правило, біоаккумуляція відбувається з меншою швидкістю, ніж біосорбція «мертвою» біомасою [101].

Відповідно до класифікації на основі розташування біосорбції виділяють наступні механізми:

- 1) внутрішньоклітинне накопичення;
- 2) позаклітинне накопичення і осадження;
- 3) сорбція і осадження на поверхні клітин.

Механізми, які стосуються перших двох груп, є залежними від метаболізму і обумовлені процесами комплексоутворення, осадження, іонного обміну; а остання група механізмів - також і адсорбцією.

Механізм видалення міді *A. niger* в основному обумовлений активним метаболічним процесом, що призводить до внутрішнього поглинання металу. Накопичення металів всередині клітини може бути результатом біоаккумуляції, повільного метаболічно залежного механізму видалення [102].

Ртуть, кадмій, срібло, уран сорбуються грибами в основному на поверхні клітин, лише частково проникаючи всередину. Іони міді, цинку, нікелю, кобальту, марганцю частіше транспортуються в клітку. В роботі [103] для видалення ВМ з розчину, що містять відразу кілька іонів (Zn (II), Cu (II), Cd (II), Cr (VI) і Ni (II)), використаний мікроміцет *Beauveria bassiana*. Було відзначено, що значна частина

іонів Zn (до 41,8%) і Cr (VI) (до 37,9%) видаляється за рахунок біосорбції. Поглинання Cd, Ni і Cu в основному визначається біоаккумуляцією (73-88%).

Транспорт ВМ через клітинну мембрану. Катіони ВМ можуть надходити в клітини шляхом дифузії через клітинну стінку. На поглинання іонів ВМ сильно впливає проникність клітинної мембрани [104]. Як правило, проникнення іонів ВМ всередину клітин живих організмів відбувається за механізмом активного транспорту, який використовується для передачі метаболічно важливих іонів (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}). У мікроміцетів цією системою є система транспорту Mg^{2+} , а іноді Mn^{2+} і Ca^{2+} . Транспортні системи цих металів можуть «помилятися» в присутності іонів ВМ того ж заряду і іонного радіусу і брати участь в транспорті ВМ. Крім того, є дані, що окремі іони ВМ індують свої системи транспорту. Переносники можуть складатися з усіх транспортних систем з метаболічним зв'язком і H^+ -градієнтом [105].

ВИСНОВКИ

1. При порівнянні отриманих значень максимально допустимої концентрації отримали закономірності стійкості мікробіому зразка ґрунту з екосистеми печери «Атлантида» до розчинних сполук токсичної міді (II) виявили, що найбільшу стійкість мікроорганізми проявили при взаємодії з розчином цитрату міді у середовищі МПА. МДК для мідьрезистентних мікроорганізмів вирощених на середовищі МПА+крохмаль з цитратом міді(II): для глини становить 2000 мг/л ($5,59 \times 10^3$ кл/г); для палеоґрунту - 2400 мг/л ($1,85 \times 10^3$ кл/г). МДК для мідьрезистентних мікроорганізмів вирощених на середовищі МПА+крохмаль з CuSO_4 для глини дорівнювало 200 мг/л ($0,86 \times 10^3$ кл/г); для палеоґрунту - 175 мг/л ($\text{КУО} = 2,46 \times 10^3$ кл/г).

2. Встановлено, що мікроорганізми, які росли на середовищі з цитратом міді мають більшу стійкість до сполук токсичної міді(II) у 10 разів на прикладі середовища Гіса. Залежність кількості мікроорганізмів від концентрації міді описується гіперболічною кривою, оскільки з підвищенням її вмісту у середовищі зменшувалася кількість мікроорганізмів.

3. Показано, що колонії бактерій, що вирости, здатні взаємодіяти зі сполуками токсичної міді, накопичуючи її та відновлюючи Cu(II) до Cu(I) оксиду. Про це свідчить забарвлювання у коричневий колір мікроорганізмів при обробці H_2S .

4. Запропонований методологічний підхід дозволяє виділити мідьрезистентні мікроорганізми з природних екосистем для створення новітніх біотехнологій очищення промислових стічних вод та ґрунтів від розчинних сполук міді у надвисоких концентраціях.

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ

1. Nies D. H. Microbial heavy-metal resistance / D. H. Nies // Springer-Verlag Appl Microbiol Biotechnol. – (1999) 51. – P. 730-750.
2. Rakesh K. Jain Copper-resistant microorganisms and their role in the environment / Rakesh K. Jain // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1990. – Vol. 6. – P. 356-365.
3. Моделювання міграції пестицидів у ґрунтах від джерел постійного забруднення / Я. О. Наземцева, Д. О. Лазненко. // Восточно-Европейский журнал передовых технологий, 2013.
4. Забруднення довкілля токсичними металами та його індикація за допомогою рослинних тестових систем / А. Довгалюк // Біологічні студії. – 2013.
5. Таширев А.Б. Термодинамическое прогнозирование редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями (Hg^{2+} , CrO_2-4 и Cu^{2+}) / А.Б. Таширев, Э.В. Галинкер, Е.И. Андреюк // Доповіді Національної академії наук України. – 2008. – №4. – С. 166-173.
6. Rajbanshi A. Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant / Rajbanshi A. // Our Nature. – 2008. – Vol. 52. – P. 146– 151.
7. Медь, свойства, соединения, сплавы, производство, применение [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://tehtab.ru/Guide/GuideMatherials/Metalls/CooperBronsesAndBrasses/Cooper/CooperOverView/>.
8. Свойства меди – химические, физические и уникальные целебные [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://tutmet.ru/med-lechebnye-himicheskie-svoystva-plotnost-jelektroprovodnost.html>.
9. Медь — свойства, характеристики свойства [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://cu-prum.ru/med.html>.

10. Физические и химические свойства меди [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://met-all.org/cvetmet-splavy/med/fizicheskie-i-himicheskie-svoystva-medi.html>.
11. Beck B. L. Protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu-Zn superoxide dismutase / B. L. Beck, L. B. Tabatabai, J.E. Mayfield. // *Biochemistry*/ - 1900. – V. 29, N 2. – P. 372-376.
12. Cu, Zn-superoxidedismutase from *Photobacterium leiognathi* is an hyperefficient enzyme / M. E. Stroppolo, M. Sette, P. O`Neil [et al.]. // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37, N 35. – P. 12287-12292.
13. Expression of the blue copper protein azurin from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* / B. G. Karlsson, T. Pascher, M. Nordling [et. al.]. // *FEBS Lett.* – 1989. – V. 246, N 2. – P. 211-217.
14. Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper / M. J. Domek, J. E. Robbins, M. E. Anderson, G. A. McFeters. // *Can. J. Microbiol.* – 1987. – V. 33, N 1. – P. 57-62.
15. Dupont C. L. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance – new insights and application / C. L. Dupont, G. Grass, C. Rensing. // *Metallomics*. – 2011. – V. 3, N 11. – P. 1109-1118.
16. Oxidative stress response in yeast: Purification and characterization of glutathione reductase from *Hansenula mrakii* / T. Miki, Y. Tsujimoto, S. Miyabe [et al.]. // *Biosci., Biotechnol. and Biochem.* – 1996. – V. 60, N 7. – P. 1207-1209.
17. Beak Y. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* / Y. Beak, Y. An. // *Science of the Total Environment*. – 2011. – V. 409, N 8. – P. 1603-1608.
18. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems / V. Ochoa-Herrera, G. Leon, Q. Banihani [et al.]. // *Science of the Total Environment*. – 2011. – N 412. – P. 380-385.
19. Bird L. J. Iron and Copper Act Synergistically To Delay Anaerobic Growth of Bacteria / L. J. Bird, M. L. Coleman, D. K. Newmand. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79, N 12. – P. 3619-3627.

20. The combined effect of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and copper (Cu) on soil enzyme activities and microbial community structure / W. Zhang, M. Zhang, S. An [et al.]. // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2012. – V. 34, N 2. – P. 358-369.
21. Thorsen M. K. Abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* constitute sensitive indicators for adverse long-term copper impacts in soil / M. K. Thorsen, K. K. Brandt, O. Nybroe. // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2013. N 57. – P. 933-935.
22. Lemire J. A. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications / J. A. Lemire, J. J. Harrison, R. J. Turner. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – N 11. – P. 371-384.
23. Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity / F. Wang, J. Yao, Y. Si [et al.]. // *Jurnal of Hazardous Materials*. – 2010. – V. 173, N 1-3. – P. 510-516.
24. Soil microbial and physical properties and their relations along a steep copper gradient / E. Arthur, P. Moldrup, M. Holmstrup [et al.]. // *Agriculture, Ecosystems and Environment*. – 2012. – N 159. – P. 9-18.
25. Доолоткельдиева Т. Д. Тяжелые металлы в почве и их воздействия на микробные комплексы (модельные опыты) / Т. Д. Доолоткельдиева, Ч. М. Омургвзиева. // *Манас Университети «Табигый илимдер» журналы*,. – 2002. - №3. – С. 165-175.
26. Pourbaix M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. / M. Pourbaix – Oxford: Pergamon press, 1963. – 320 p.
27. Таширев А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Восстановительная трансформация металлов. / А. Б. Таширев. // *Мікробіол. журнал*.. – 1994. - №56. – С. 76-88.
28. Таширев А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с микроэлементами. / А. Б. Таширев. // *Мікробіол. журнал*.. – 1994. - №56. – С. 89-100.

29. Варбанец Л. Д. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования / Л. Д. Варбанец, Е. В. Мацелюх. – Київ: Наукова думка, 2014. – 321 с.
30. Dopson M. Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies / M. Dopson, D. S. Holmes. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2014. – V. 98, N 19. – P. 8133-8144.
31. Brierley J. A. Facultative Thermophilic Thiobacillus – Like Bacteria in Metal Leaching / Brierley // *Biogeochemistry of Ancient and Modern Environments* / Brierley., 1980. – P. 445-450.
32. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} / А. Б. Таширеву, В. А. Романовская, И. А. Иома [и др.] // *Доповіді НАН України.* – 2008. - № 1. – С. 169-176.
33. Nies D. H. Microbial heavy-metal resistance / Nies. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V/ 51, N 6. – P/ 730-750.
34. Smith K. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. / K. Smith, R. P. Novick. // *J. Bacteriol.* – 1972. – V. 122, N 2. – P/ 761-722.
35. Nies D. H. The cobalt, zinc, cadmium efflux system *czcABC* from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. / Nies. // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 177, N 10. – P. 2707-2712.
36. Lebrun M. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. / M. Lebrun, A. Audurier, P. Cossart. // *J. Bacteriol.* – 1994. – V. 176, N 10. – P. 3040-3048.
37. Nies D. H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in Microbes / Nies. // *Plasmid.* – 1992. – V. 27, N 1. – P. 17-28.
38. Birch L. Complexing agents from microorganisms / L. Birch, R. Bachofen. // *Experientia.* – 1990. – V. 46, N 8. – P. 827-834.
39. Silver S. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. / S. Silver, L. T. Phung. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1996. – N 50. – P. 753-789

40. Gadd G. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation / Geoffrey Michael Gadd. // *Microbiology*. – 2010. V. 156, N 3. – P. 609-643.
41. Identification of a metalbinding complex from thermophilic bacteria growth in the presence of heavy metals / R. Scudiero, C. Capasso, L. Madonna [et al.] // International conference “Thermophiles: Science and Technology”. – 1992. – P. 38.
42. Тихомирова О. М. Оценка биомассы клеток дрожжей - отхода производства экзогликанов как биосорбентов для иммобилизации ионов тяжелых металлов // О. М. Тихомирова, Г. А. Витовская // Всероссийская научная конференция: «Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств». – 1996ю – С. 32
43. Ehrlich, H. L. (1996). How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chem Geol* 132: 5-9
44. Gadd G. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation / Geoffrey Michael Gadd. // *Microbiology*. – 2010. – V. 156, N 3. – P. 609-643.
45. Ehrlich H. L. *Geomicrobiology* / H. L. Ehrlich, D. K. Newman., 2008. – 628 p.
46. Vera M. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation – part A. / M. Vera, A. Schippers, W. Sand. // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2013. – V. 97, N 17. – P. 7529-7541.
47. Mishra D. Microbial leaching of metals from solid industrial wastes / D. Mishra, Y. Ha Rhee. // *Jurnal of Microbiology*. – 2014. – V. 52, N 1 . – P. 1-7.
48. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals / D. R. Lovley, S. J. Giovannoni, D. C. White [et al.]. // *Arch Microbiol*. – 1993. – V. 159, N 4. – P. 336-344.
49. Справочник химика. Основные свойства неорганических и органических соединений / ред. Никольского Б. П. Т. 2 / – Л: Химия, 1971. – 1168 с.

50. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – Москва: Мир, 1972. – 476 с.
51. Буракаева А. Д. Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов / А. Д. Буракаева, А. М. Русанов, В. П. Лвнтух. – Оренбург: ОГУ, 1999. – 54 с.
52. Энкер П. Б. Очистка шахтных вод Карабашского медеплавильного комбината с помощью гетеротрофных микроорганизмов / П. Б. Энкер, Н. Н. Абдуллина, Л. Г. Золотарева // Орг. систем оборот. водоснабж. и эксплуат. хвостохранилищ и предприятий цв. металлургии / П. Б. Энкер, Н. Н. Абдуллина, Л. Г. Золотарева. – Алма-Ата, 1988. – С. 47-54.
53. White C. Microbial solubilization and immobilization of toxic metls: key biogeochemical processes for treatment of contamination. / C. White, J. Sayer, G. Gadd. // FEMS Microbiol Rev. – 1997. – V. 20, N 3-4. – P. 503-516.
54. Gadd G. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. / G. M. Gadd. // Adv Microb Physiol. – 1999. – N 41. – P. 47-92.
55. Lead mineral transformation by fungi / J. Sayer, J. Cotter-Howells, C. Watson [et al.]. // Curr Biol. – 1999. – V. 9, N 13. – P. 691-694.
56. Effects of Cu²⁺ on morphological structure, functional groups, and elemental composition of aerobic granular sludge / X. Y. Zheng, X. N. Wang, X. Huang [et al.]. // Environmental Technology. – 2013. – V. 34, N 1-4. – P. 219-224.
57. Huang Z. Cu²⁺ biosorption by a hidhly copper resistant bacterium isolated from soil / Z. Huang, D. Li. // Chinese Journal of Applied and Environmental Biology. – 2012. – V. 18, N 2. – P. 964-970.
58. Sannasi P. Effect of heavy metals to bacterial culture and removal of heavymetals from an industrial effluent / P. Sannasi, S. Salmijah, J. Kader. // Biosciences Biotechnology Research Acia. – 2010. – V. 7, N 2. – P. 543-557.
59. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury / F. Francois, C. Lombard, J. Guigner [et al.]. // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78, N 4. – P. 1097-1106.

60. Biosorption of aluminum, cobalt and copper ions by *Providencia rettgeri* isolated from wastewater / A. Abo-Amer, A. Ramadan, M. Abo-State [et al.]. // *Journal of basic Microbiology*. – 2012. – V. 53, N 6. – P. 1-12.
61. Bio-accumulation de métaux lourds chez certains microorganismes / A. J. Drapeau, R. A. Laurence, P. S. Harbec [et al.]. // *Sci. et Techn. Eau.* – 1983. – V. 16, N 4. – P. 359-363.
62. Lovley D. R. Dissimilatory metal reduction / Derek R. Lovley. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1993. – N 47. – P. 263-290.
63. Woolfolk C. A. Reducyion of inorganic compounds with molecular hydrogen by *Micrococcus lacfilyticus*. 1. Stoichiometry with compounds of arsenic, selenium, tellurium transition and other elements / C. A. Woolfolk, H. R. Whiteley. // *J. Bacteriol.* – 1962. – N84. – P. 647-658.
64. Костина Л. В. Методы очистки загрязненных тяжелыми металлами почв с использованием (био)сурфактантов / Л. В. Костина, М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // *Вестник Пермского университета*. 2009. Вып. 10. Биология. № 36. С. 95-110.
65. Янкевич М. И. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра / М. И. Янкевич, В. В. Хадеева, В. П. Мурыгина // *Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера»*. — 2015. — т. 7. — № 2. — С. 199—208.
66. Copper-resistant bacteria reduces oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. / F. Islam, T. Yasmeen, Q. Ali [et al.]. // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – V. 23, N 1. – P. 220-233.
67. Ghosh, A. Optimization of copper bioremediation by *Stenotrophomonas maltophilia* PD2. / A. Ghosh, P. Saha // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2013. – V. 1, N 3. – P. 159-163.
68. Ozdemir G. Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18. // *Chemical Engineering Journal*. – 2004. – V. 102, N 3. – P. 249-253.

69. de Vargas I. Biosorption of palladium and platinum by sulfate-reducing bacteria. / I. de Vargas, L. Macaskie, E. Guibal // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2003. – V. 79, N 1. – P. 49-56.
70. Баймаханов М. Т. Очистка и контроль сточных вод предприятий цветной металлургии / М. Т. Баймаханов, К. Б. Лебедев, В. Н. Антонов, А. И. Озеров // М.: Металлургия. – 1983. – с. 191.
71. Авакян З. А. Сравнительная токсичность тяжелых металлов для некоторых микроорганизмов // *Микробиология*.-1967,- т. 36, № 6 — С. 446–450.
72. Эрлих Х. Жизнь микробов в экстремальных условиях.-М.: Мир, 1981, 469 с.
73. Зайнуллин Х. Н. Применение сульфатвосстанавливающих бактерий для биохимической очистки сточных вод машиностроительных предприятий / Х. Н. Зайнуллин, Г. Ф. Смирнова и др. // *Химия и технология воды*, - 1980, т.2, № 3, С. 272–275.
74. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.
75. Постанова № 42 від 01.12.99 - Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99.
76. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвук та інфразвук.
77. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
78. ГОСТ 12.1.029-80 “Система засобів безпеки праці. Засоби і методи захисту від шуму. Класифікація”.
79. ГОСТ 12.4.080-79 ССБТ. Светофильтры стеклянные для защиты глаз от вредных излучений на производстве. Технические условия.
80. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях / С. Г. Дроздов, Н. С. Гарин, Л.С. Джиндоян, В.М. Тарасенко. – АМН СССР. – М.: Медицина, 1987. – 256 с.

81. Определение интенсивности теплового излучения [Электронный ресурс]: учебное электронное текстовое издание / В.С. Мушников, И.Н. Фетисов, Е.Е. Барышев. - Екатеринбург: Изд-во ГОУ ВПО УГТУ-УПИ, 2005. - 15 с.
82. Методичні вказівки до дипломного проекту «Розрахунок загальнообмінної вентиляції» з розділу «Охорона праці» /Укладачі: Л.О.Гурець, О.П.Будьоний.– Суми: Видавництво СумДУ, 2010. – 23с.
83. Захаров Л. П. Техника безопасности в химических лабораториях. – Л.: Химия, 1985. – 184 с.
84. Иванов Б. И. Пожарная безопасность в химических лабораториях. М.: Химия, 1988. – 112 с.
85. Shubakov A.A., Mikhaylova E.A., Ovodov Yu.S. Use of microorganisms for the extraction of manganese from aqueous media // Izvestiya Komi nauchnogo tsentra UrO RAN. 2014. No. 1 (17). P. 16–18.
86. Gadd G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 13–28.
87. Volesky B., Holan Z.R. Biosorption of heavy metals // Biotechnol. Prog. 1995. V. 11. P. 235–250.
88. Purvis O.W., Halls C. A review of lichens in metal-enriched environments // Lichenologist. 1996. V. 28. P. 571–601.
89. Yashiro T., Matsuura K., Tanaka C. Genetic diversity of termite-egg mimicking fungi “termite balls” within the nests of termites // Insect. Soc. 2011. V. 58. No. 1. P. 57–64.
90. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Fokina A.I., Ogorodnikova S.Yu., Kantor G.Ya. Biomonitoring and biotesting of soils // Bioindicators and biotest systems in the assessment of the environment of technogenic territories. Kirov: O-Kratkoe, 2008. P. 68–105.
91. Evdokimova G.A., Gershenkop A.Sh., Voronina N.V. Microbiological processes in the system of extraction and processing of apatitenephrite ores using circulating water supply. Sankt-Peterburg: Nauka, 2008. 102 p.

92. Domracheva L., Trefilova L., Fokina A. Fusarium: biological control, sorption possibilities. Lap Lambert Academic Publishing, 2013. 183 p.
93. Zahira S.B.E., Khalid A.N. Role of some micromycetes in biosorption of heavy metals in different polluted water samples // Journal of Yeast and Fungal Research. 2013. V. 4 (7). P. 84–91.
94. Sugasini A., Rajagopal K., Banu N. A study on biosorption potential of *Aspergillus sp.* of tannery effluent // Advances in Bioscience and Biotechnology. 2014. V. 5. P. 853–860.
95. Wang J.L., Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review // Biotechnol. Adv. 2006. V. 24. P. 427–451.
96. Yusef H.H. Bioaccumulation of metal cations by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* // Adv. Food Sci. 1997. V. 19. No. 3. P. 120–123.
97. Naja G., Volesky B. The mechanism of metal cation and anion biosorption // Microbial biosorption of metals / Eds. P. Kotrba, M. Mackova, T. Macek. London, New York: Springer Dordrecht Heidelberg, 2011. P. 19–58.
98. Tyupa D.V. Biosorption of heavy metals and bioforming of nanoparticles of silver for metals resistant to microorganisms: A dissertation for the degree of a candidate of biological sciences. Moskva, 2015. 197 p.
99. Garanin Z.A., Lykov I.N. Use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as biosorbent and bioaccumulator of heavy metal cations // AgroXXI. 2008. No. 4–6. P. 73–74.
100. Gadd G.M., Griffiths A.J. Microorganisms and heavy metal toxicity // Microbial Ecology. 1978. V. 4. P. 303–317.
101. Goyal N., Jain S., Banerjee U. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals // Adv. Environ. Res. 2003. V. 7. P. 311–319.
102. Hamza S.M., Ahmed H.F., Mohammad E.A.M. Optimization of cadmium, zinc and copper biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae* // Journal of American Science. 2010. V. 6. P. 597–604.

103. Gola D., Dey P., Bhattacharya A., Mishra A., Malik A., Namburath M., Ahammad S.Z. Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* // Bioresource Technology. 2016. V. 218. P. 388–396.
104. Mane P.C., Bhosle A.B., Kulkarni P.A. Biosorption and biochemical study on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) with reference to selenium // Archives of Applied Science Research. 2011. V. 3. P. 222–229.
105. Siddiquee S., Rovina K., Azad S.A., Naher L., Suryani S., Chaikaew P. Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: a review // J. Microb Biochem Technol. 2015. V. 7. P. 384–393.