

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

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач випускової кафедри  
\_\_\_\_\_М.М. Барановський  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_2020 р.

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

**Тема: «Закономірності процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів як підґрунтя природоохоронних біотехнологій»**

Виконавець: студентка ЕБ-206М гр. ФЕБІТ

Біда І. О.

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

Ястремська Л.С.

Консультант розділу «Охорона праці»

Павлиш В.Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища»:

Рябчевський О.В.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2020

# НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ М.М. Барановський

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

## ЗАВДАННЯ

**на виконання дипломної роботи**

**Біди Ірини Олександрівни**

1. Тема дипломної роботи: «Закономірності процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів як підґрунтя природоохоронних біотехнологій» затверджена наказом ректора від « 15 » \_\_\_\_\_ вересня \_\_\_\_\_ 2020 р. № 16571 /ст.
2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня по 31 грудня \_\_\_\_\_ 2020 р.
3. Вихідні дані до роботи: власні експериментальні дані зроблені на базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України, літературні джерела щодо біоремедіації сполук токсичного хрому(VI).
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ; 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 26 рисунків, 2 таблиці.

## 6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Пошук літературних джерел за темою дипломної роботи	5.10 – 15.10.2020	
2	Оброблення знайденого літературного матеріалу	16.10 – 30.10.2020	
3	Написання основної частини	31.10 – 10.11.2020	
4	Написання висновків	11.11.2020	
5	Оформлення дипломної роботи	12.11. – 20.11.2020	
6	Підготовка презентації дипломної роботи	21.11. – 29.11.2020	
7	Перевірка дипломної роботи керівником	30.11.2020	
8	Виправлення виявлених недоліків	01.12. – 08.12.2020	
9	Попередній захист дипломної роботи	09.12.2020	
10	Захист дипломної роботи	22.12.2020	

7. Дата видачі завдання: « 22 » жовтня 2020р.

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Старший викладач Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	Асистент кафедри екології Рябчевський О.В.		

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_ Ястремська Л.С.  
(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ Біда І.О.  
(підпис випускника)

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Закономірності процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів як підґрунтя природоохоронних біотехнологій»: 86 сторінок, 26 рисунків, 2 таблиці, 128 використаних джерел.

**Об'єкт дослідження** – процес одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення сполук токсичного хрому(VI).

**Предмет дослідження** – харчові відходи, хромрезистентний, облігатно-анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1 – деструктор органічних відходів.

**Мета дипломної роботи** – дослідження закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів як підґрунтя природоохоронних біотехнологій.

**Методи дослідження** – аналітичні, мікробіологічні, фізико-хімічні, статистичні методи обрахунку отриманих результатів, математичні.

Вперше досліджено придатність до біовилучення сполук токсичного хрому(VI) хромрезистентним, облігатно-анаеробним штамом *Clostridium butyricum* GMP1, який здатен ефективно відновлювати сполуки токсичного Cr(VI) до Cr(III) і разом з тим активно брати участь у процесах деструкції харчових відходів. Оптимальними умовами для синтезу 40% водню є  $\text{pH} = 6,0 \pm 5$  і  $E_h = -290 \pm 10$  мВ, тривалість деструкції субстрату 5-6 діб.

Результати роботи можливо використовувати для розробки новітніх біотехнологій очищення хромвмісних стічних вод та біоремедіації ґрунтів та одночасній деструкції органічних відходів. А також, при викладанні дисциплін: «Нові тенденції в природоохоронних біотехнології», «Екстремофільні мікроорганізми в біотехнології».

**ХРОМАТИ, ТОКСИЧНІСТЬ, ХРОМРЕЗИСТЕНТНІ МІКРООРГАНІЗМИ,  
ДЕСТРУКЦІЯ ХАРЧОВИХ ВІДХОДІВ, БІОВОДЕНЬ, ПРИРОДООХОРОННІ  
БІОТЕХНОЛОГІЇ**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	13
1.1. Основні властивості хрому .....	13
1.2. Вплив хрому на метаболізм мікроорганізмів .....	19
1.3. Виявлення механізмів стійкості мікроорганізмів до іонів хрому.....	20
1.3.1. Фізіологічні механізми стійкості мікроорганізмів до іонів хрому...	20
1.3.2. Молекулярно-генетичні особливості хромрезистентних мікроорганізмів.....	23
1.4. Перспективи використання хромрезистентних мікроорганізмів у процесах мікробного вилучення хроматів .....	25
1.5. Мікробні технології отримання $H_2$ при бродінні органічних відходів та його використання.....	26
1.6. Висновки до розділу.....	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	33
2.1. Підготовка посуду, поживних середовищ та стандартних розчинів токсичних сполук хрому(VI).....	33
2.2. Культивування анаеробних мікроорганізмів за модифікованою методикою Хангейта.....	36
2.3. Визначення ефективності біовилучення токсичних сполук хрому(VI) мікробною біомасою .....	39
2.4. Методи дослідження динаміки збродження органічних відходів.....	41
2.4.1. Визначення рН та $E_h$ за збродження субстрату.....	41
2.4.2. Вимірювання об'єму газу під час збродження субстрату.....	42
2.5. Газохроматографічний метод визначення газової фази при бродінні харчових відходів.....	42
2.6. Статистичні методи обрахунку результатів досліджень.....	43

2.7. Висновки до розділу .....	43
РОЗДІЛ 3. ДЕСТРУКЦІЯ ХАРЧОВИХ ВІДХОДІВ ТА МІКРОБНЕ ВИЛУЧЕННЯ ХРОМАТІВ ЯК ПІДҐРУНТЯ ПРИРОДООХОРОННИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ.....	44
3.1. Властивості облігатно-анаеробного штаму <i>Clostridium butyricum</i> GMP1 – деструктора харчових відходів.....	45
3.2. Визначення метаболічної активності облігатно-анаеробного штаму <i>Clostridium butyricum</i> GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів.....	46
3.3. Визначення метаболічної активності облігатно-анаеробного штаму <i>Clostridium butyricum</i> GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату, з одночасним додаванням у реактор хроматів у певних концентраціях .....	48
3.4. Ефективність біовилучення Cr(VI) облігатно-анаеробним штамом <i>Clostridium butyricum</i> GMP1 за зброджування крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів.....	51
3.5. Висновки до розділу.....	52
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	53
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів .....	53
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів.....	54
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки під час дослідженні закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів .....	59
4.4. Висновки до розділу.....	60
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	62
5.1. Наслідки забруднення навколишнього середовища хроматами.....	62

5.2. Рівень біологічної безпеки при мікробному вилученні хроматів з харчових відходів.....	65
5.3. Висновки до розділу.....	69
ВИСНОВКИ.....	70
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	72

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

Eh	– окислювально-відновний потенціал, редокс-потенціал
ОВП	– окислювально-відновний потенціал
Гр <sup>+</sup>	– грампозитивні
Гр <sup>-</sup>	– грамнегативні
NB	– поживний бульйон Nutrient Broth
МУ	– мікробні угруповання
BSL-1	–перший рівень біологічної безпеки



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Хром (Cr) є одним з найбільш токсичних металів та згубно діє на живі організм, проявляючи мутагенні та канцерогенні властивості [1]. Незважаючи на це, він використовується у гальванотехніці, металургії, деревообробній, целюлозно-паперовій, хімічній та текстильній галузях [2]. У зв'язку з широким промисловим застосуванням сполуки хрому є одними з найбільш розповсюджених забруднювачів навколишнього середовища [3]. Серед основних джерел забруднення хромом відходи виробництва вогнетривкої цегли, електронних пристроїв та керамічної продукції, а також стічні води шкіряної та хімічної промисловості [4]. Сполуки хрому з промислових стоків потрапляють у ґрунтові та поверхневі води, а також у родючий шар ґрунту, що призводить до погіршення стану довкілля [5]. Крім того, розчинні сполуки шестивалентного хрому –  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  та  $\text{CrO}_4^{2-}$ , є окисниками, що спричиняє їх потужні токсичні властивості [6]. Тому розробка методів їх детоксикації становить значний інтерес як для науки, так і для промисловості.

Фізико-хімічні методи знешкодження сполук Cr(VI), такі як хімічне та електрохімічне осадження, іонообмін [7], є екологічно-небезпечними та економічно не вигідними [8]. Перспективним альтернативним шляхом їх знешкодження є впровадження біотехнологій, що передбачають використання хромрезистентних мікроорганізмів (бактерій, грибів та актиноміцетів) для очищення контамінованих екосистем [9]. Такі мікроорганізми характеризуються стійкістю до хрому(VI) у високих концентраціях та здатні накопичувати його сполуки у біомасі, відновлюючи до нерозчинного, а отже нетоксичного  $\text{Cr}(\text{OH})_3\downarrow$  [10].

У розробці методів очищення довкілля від сполук токсичних важких металів, зокрема хрому, відбувається значний прогрес. Проте, ефективні біотехнології для швидкого очищення забруднених екосистем від сполук хрому у високих концентраціях досі не розроблені.

Водночас серйозною проблемою, що вимагає негайного вирішення є накопичення на звалищах побутових відходів. За даними консалтингової компанії Boston Consulting Group наразі щорічно 1,6 млрд тонн харчових продуктів на суму 1,2 трлн доларів США стають відходами. І ці цифри невпинно зростають: прогнозується, що до 2030 р. вони сягнуть 2,1 млрд тонн та 1,5 трлн доларів відповідно, тобто продукти будуть викидати зі швидкістю 66 тонн на секунду [11]. Найбільш екологічно доцільними є біотехнологічні методи переробки харчових побутових відходів, адже вони базуються на природних процесах і тому є безпечним для живих організмів й довкілля [12].

**Мета роботи** – дослідження закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів як підґрунтя природоохоронних біотехнологій.

**Завдання дипломної роботи:**

1. Проаналізувати літературні джерела, щодо властивостей хрому, термодинамічного прогнозування трансформації сполук хрому мікроорганізмами залежно від значень рН та Eh, механізмів резистентності бактеріальної клітини до хроматів, використання мікробних технологій отримання  $H_2$  при бродінні органічних відходів.

2. Дослідити метаболічну активність облігатно-анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 при зброджуванні крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів.

3. Виявити зміни метаболічної активності облігатно-анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 при бродінні крохмалевмісного субстрату, з одночасним додаванням у реактор певних концентрацій хроматів.

4. Визначити ефективність біовилучення хроматів облігатно-анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 за зброджування крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів.

5. Надати висновки та рекомендації щодо використання хромрезистентних мікроорганізмів та мікроорганізмів-деструкторів харчових відходів як підґрунтя в природоохоронних біотехнологіях.

**Об'єкт дослідження** – процес одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення сполук токсичного хрому(VI).

**Предмет дослідження** – харчові відходи, хромрезистентний, облігатно-анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1 – деструктор органічних відходів.

**Методи дослідження** – аналітичні, мікробіологічні, фізико-хімічні, математичні, статистичні методи обрахунку отриманих результатів.

**Наукова новизна роботи:** вперше досліджено придатність до біовилучення сполук токсичного хрому(VI) хромрезистентним, облігатно-анаеробним штамом *Clostridium butyricum* GMP1, який здатен ефективно відновлювати сполуки токсичного Cr(VI) до Cr(III) і разом з тим активно брати участь у процесах деструкції харчових відходів. Визначено вплив сполук Cr(VI) на метаболічну активність *C. butyricum* GMP1.

**Практична значимість.** Результати роботи можливо використовувати для розробки новітніх біотехнологій очищення хромвмісних стічних вод та біоремедіації ґрунтів та одночасній деструкції органічних відходів.

**Особистий внесок випускника.** Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, опис, аналіз та статистична обробка результатів виконані випускником особисто під керівництвом к.с.-г.н., с.н.с., доцента Л.С. Ястремської та на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під керівництвом проф., д.т.н., зав. відділом біології екстремофільних мікроорганізмів О.Б. Таширева та провідного інженера О.А. Гаврилюк.

**Апробація отриманих результатів.** За матеріалами дипломної роботи опубліковано двоє тез і стаття:

1. Біда І.О. Перспективи використання хромрезистентних мікроорганізмів у природоохоронних біотехнологіях / І.О. Біда, О.А. Гаврилюк, В.М. Говоруха, Л.С. Ястремська, О.Б. Таширев // Матеріали XXI Міжнародної науково-практичної конференції «Екологія. Людина. Суспільство» (21-22 травня 2020 р., м. Київ). – К.: НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського», 2020. – С. 29.

2. Bida I. Bioremoval of chromates by strict anaerobe *Clostridium butyricum* GMP1 during anaerobic destruction of starch-containing substrate / I. Bida, O. Havryliuk, V. Hovorukha, O. Tashyrev, L. Yastremska // Conference materials of the II young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology” (23-26 November, 2020), Abstr. – Kyiv. – IMV NASU – Ukraine, 2020. – P. 7.

3. Hovorukha V. M. Interaction of obligate anaerobic destroyer of solid organic waste *Clostridium butyricum* GMP1 with soluble compounds of toxic metals Cr(VI), Mo(VI) and W(VI) / V.M. Hovorukha, O.A. Havryliuk, G.V. Gladka, I.O. Bida, O.B. Tashyrev // *Biotechnologia Acta*, 2020. – V. 13, № 5. – P. 73-86. – DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech13.05.073>

# РОЗДІЛ 1

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1. Основні властивості хрому

Хром – пластичний тугоплавкий метал світло-сірого кольору з характерним металевим блиском [13]. У періодичній системі Д.І. Менделєєва цей хімічний елемент позначається як Cr (Chromium) і знаходиться під порядковим номером 24 в VIВ групі (побічної підгрупи), в 4 періоді [14]. Він є сьомим найпоширенішим елементом на землі та двадцять першим у земній корі. У навколишньому середовищі хром існує в декількох станах окислення, починаючи від  $-2$  до  $+6$ . Однак найбільш поширеними і стабільними є форми  $+3$  та  $+6$  [15].

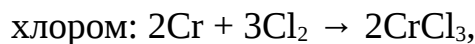
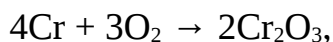
Хром відрізняється високою твердістю, має високі значення щільності, температури плавлення і температури кипіння. Його механічні властивості значною мірою залежать від наявності домішок: у чистому вигляді він пластичний, а за наявності невеликої кількості домішок, зокрема нітрогену та кисню – крихкий та ламкий. Хром технічної чистоти легко розколюється та розтирається у порошок [16].

Важливою властивістю хрому також є висока стійкість до корозії. За помірних температур хром стійкий і до атмосферної корозії. Це можна пояснити утворенням захисної оксидної плівки на поверхні металу. Вона дуже тонка, але водночас має надзвичайну міцність. Тому вироби, що мають хромоване покриття не втрачають кольору на повітрі [17].

Для хрому у хімічних сполуках характерними є ступені окиснення  $0$ ,  $+2$ ,  $+3$ ,  $+4$ ,  $+5$ ,  $+6$ . Особливістю хімії хрому є здатність до утворення значної кількості комплексних сполук і участь у різноманітних окисно-відновних реакціях [18].

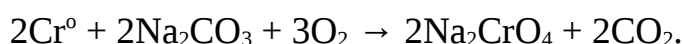
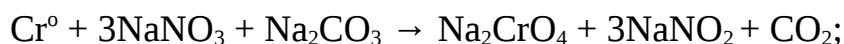
Хром належить до металів середньої активності, але за звичайних умов його хімічна активність дуже мала. Така особливість обумовлена утворенням на поверхні металу тонкого, але дуже щільного шару малоактивного оксиду  $Cr_2O_3$ . За таких умов хром взаємодіє лише незначною мірою з фтором [16].

При підвищенні температурного режиму хром вступає в реакцію з киснем:

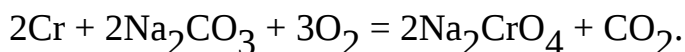


сіркою:  $2\text{Cr} + \text{S} \rightarrow \text{Cr}_2\text{S}_3,$  а також азотом, кремнієм, бором та деякими металами. За умов зниження температури активно взаємодіє з фтором [14].

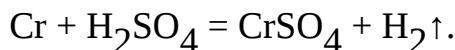
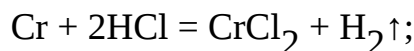
Хром проявляє високу хімічну стійкість до дії води, лугів, але за наявності окисників реагує із лужними розплавами, наприклад:



Також при підвищенні температурного режиму за присутності кисню хром взаємодіє з лугами або карбонатами лужних металів:



Хром розчинний у розбавлених хлоридній і сульфатній кислотах, в результаті чого утворюються синьо-блакитні розчини солей Cr(II):



Внаслідок окиснення йонів хрому(II) до хрому(III) під дією повітря блакитне забарвлення переходить у зелене [17].

Особливістю хрому є пасивування у концентрованих  $\text{HNO}_3$  і  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . В результаті реакції з азотною кислотою хром втрачає здатність розчинятися як в хлоридній, так і в сульфатній кислотах. Однак після тривалого кип'ятіння в хлоридній кислоті активність хрому підвищується і відбувається виділення водню, яке продовжується і в холодних кислотах [18].

Загальноприйнятою є теорія про те, що важкі метали-окисники токсичні і пригнічують ріст мікроорганізмів, так як вони створюють окисно-відновні системи з високими значеннями редокс-потенціалу  $E_h$ . За їх присутності відбувається зміна метаболізму на побічний процес відновлення металу. Наприклад, хромат ( $\text{CrO}_2^{-4}$ ) перемикає зброджування глюкози у факультативних і облігатних анаеробів на відновлення хромату, що призводить до різкої зміни  $E_h$  (з  $-300$  до  $+100$  мВ). Це

призводить до енергетичного виснаження клітин і їх загибелі. Але це не виключає можливість існування мікроорганізмів, які використовують метали-окисники в якості акцепторів електронів і цим самим здатні вилучати токсичний хром з середовища [19].

У виборі оптимальних шляхів біовилучення важких металів мікроорганізмами доцільно використовувати термодинамічне прогнозування. Розроблена і розрахунково обґрунтована концепція термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами, згідно з якою існує принципова можливість відновлення будь-якого металу мікроорганізмами. Доведена можливість росту мікроорганізмів при надвисоких концентраціях токсичних металів-окисників, таких як  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_2^{-4}$  і  $\text{Cu}^{2+}$  [20].

Авторами в роботі [19] доведено, що всі метаболічні окислювально-відновні процеси, необхідні мікроорганізмам в процесі життєдіяльності, відбуваються в області значень редокс-потенціалу  $E_h$ , при яких вода виступає термодинамічно стійким розчинником. Цю область обмежують дві окислювально-відновні реакції: відновлення протона до молекулярного водню і окислення кисню води (або іона гідроксилу) до молекулярного кисню (рис. 1.1). Ширина інтервалу значень  $E_h$ , всередині якого вода термодинамічно стійка, не залежить від рН і становить 1,228 В. При рН 7 область окисно-відновної стійкості води знаходиться між потенціалами  $-414$  і  $+814$  мВ.

Номер	Реакція	$E'_0$ , мВ*
1	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4e = 2\text{H}_2\text{O}$ , $E_h = 1,228 - 0,0591 \cdot \text{pH} - 0,0295 \cdot \lg P_{\text{H}_2}^{**}$	+814
2	$2\text{H}^+ + 2e = \text{H}_2$ , $E_h = 0,000 - 0,0591 \cdot \text{pH} - 0,0591 \cdot \lg P_{\text{H}_2}$	-414

Рис. 1.1. Рівняння реакцій зони термодинамічної стійкості води

Обґрунтовано [20], що стандартний редокс-потенціал реакції відновлення  $\text{CrO}_4^{2-}$  до  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  становить +555 мВ (рис. 1.2), тобто він знаходиться в зоні термодинамічної стабільності води.

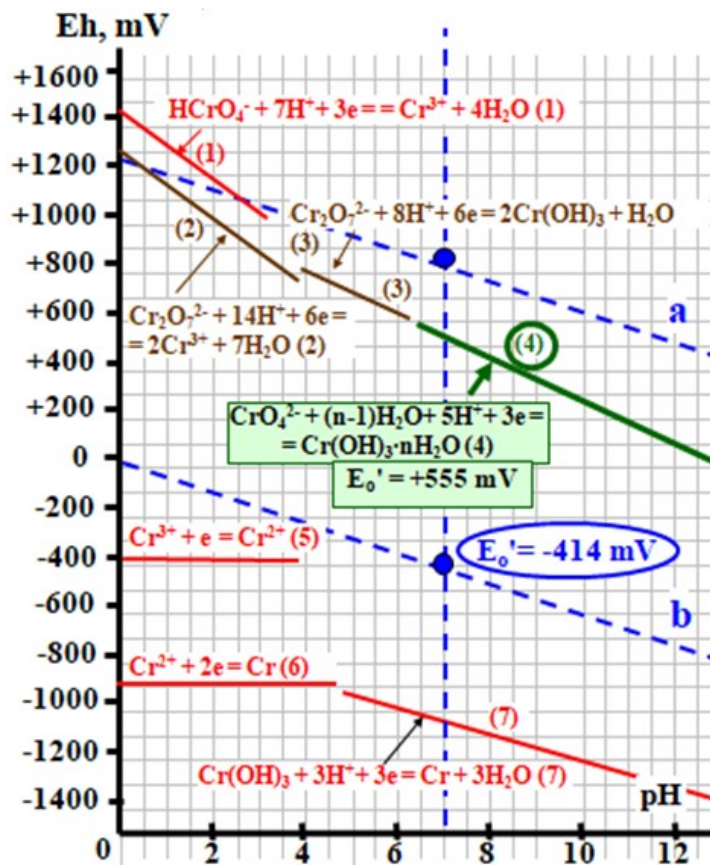
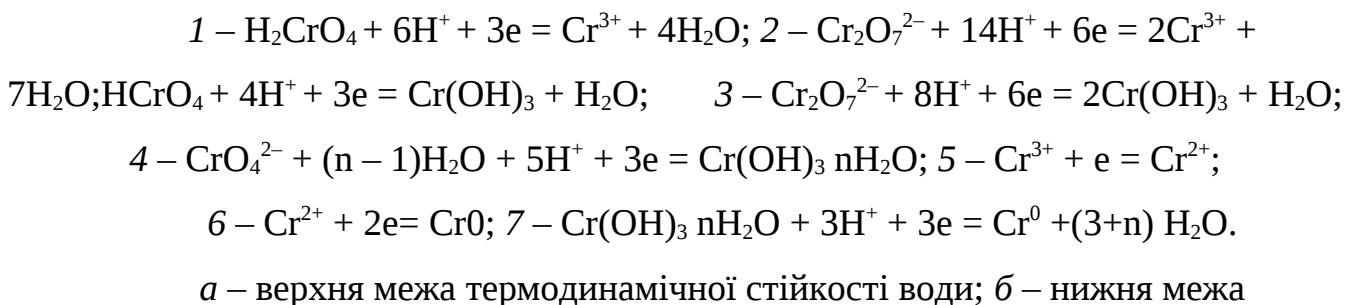


Рис. 1.2. Редокс-потенціал сполук хрому [21]:



При збільшенні концентрації Cr(VI) з  $1,0 \cdot 10^{-8}$  до 1,0 моль/л редокс-потенціал збільшується лише на 178 мВ (з +410 до +588 мВ) і не виходить за межі вказаної зони (рис. 1.3) [20].



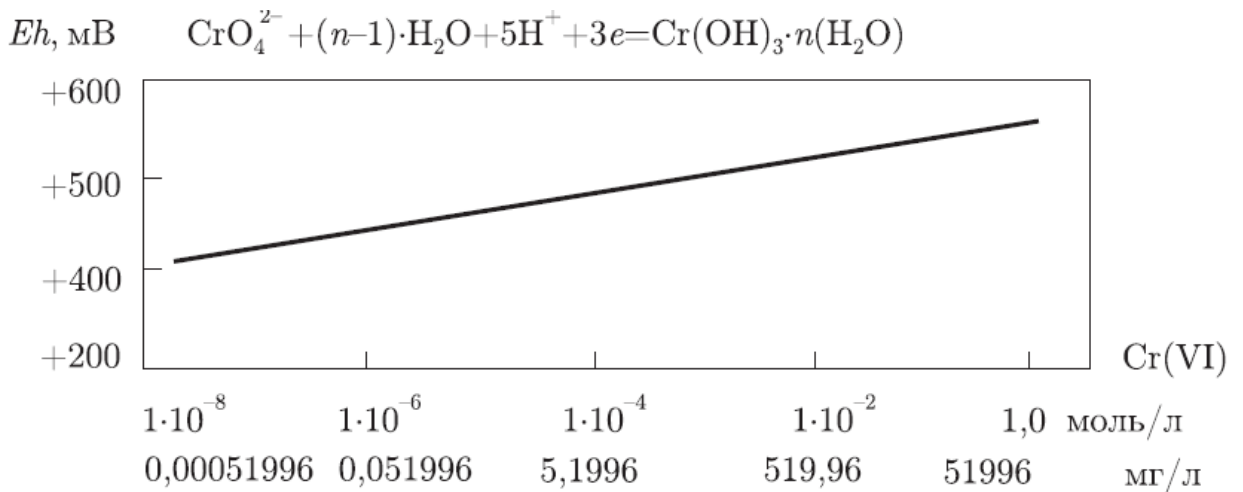
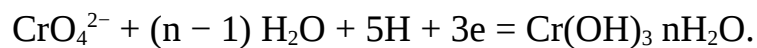


Рис. 1.3. Залежність величини редокс-потенціалу хрому (Eh, мВ) від його концентрації в воді (моль/л і мг/л) в реакції відновлення

Це свідчить про те, що навіть при одномолярній концентрації (51900 мг/л Cr(VI), що відповідає 133800 мг/л  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) можливе життя мікроорганізмів. Варто зауважити, що такі мікроорганізми не тільки можуть рости при надвисоких концентраціях хроматів, але і відновлювати його до нерозчинного гідроксиду хрому(III):



## 1.2. Вплив хрому на метаболізм мікроорганізмів

Мікроорганізми постійно перебувають у навколишньому середовищі різних токсичних металів, які можуть бути сприятливими або згубними для їх росту, залежно від хімічної чи фізичної природи та стану окислення іонів металів [22].

Хром відноситься до групи мікроелементів і є важливою живильною речовиною для живих організмів [15]. Як і всі живі організми, мікроорганізми часто чутливі як до дефіциту, так і до надлишкової кількості сполук хрому [23]. У невеликих кількостях Cr(VI) бере участь в обміні речовин, зокрема у перетворенні глюкози і ліпідів, відіграє важливу роль в реакціях транспорту електронів у біологічних системах, стабілізації третинної структури білків та конформації ДНК і РНК [24].

Хром існує в природі в двох стабільних валентних станах – Cr(VI) і Cr(III). Cr(VI) переважно присутній у природних водоймах, тоді як Cr(III), в основному міститься у комунальних стічних водах, багатих органічними забруднювачами [25]. Cr(III) виявляє високу спорідненість до органічних сполук, присутніх у ґрунті, і негайно утворює комплекси з органічною речовиною, утворюючи осади аморфного гідроксиду. Тоді як висока рухливість та розчинність у воді Cr(VI) дозволяють йому бути присутнім у водних середовищах, тим самим роблячи його біодоступним у навколишньому середовищі [22].

Cr(VI) токсичний і мутагенний для більшості мікроорганізмів. В результаті дії Cr(VI) спостерігаються зміни в морфології грампозитивних та грамнегативних бактерій. Він спричиняє подовження та збільшення клітин та інгібує ділення, що врешті-решт є причиною гальмування росту клітин [3]. Cr(III) впливає на реплікацію ДНК, викликає мутагенез та змінює структуру та активність ферментів, реагуючи з їх карбоксильними та тіоловими групами [26]. Потрапляючи в клітини дріжджів, наприклад *Saccharomyces cerevisiae* [22], через неспецифічний аніон-носіє, систему пермеази, яка транспортує різні аніони, такі як сульфат і фосфат Cr(VI) спричиняє окислювальне пошкодження білків.

В багатьох видів бактерій було продемонстровано, що іони хрому активно перетинають біологічні мембрани за допомогою шляху поглинання сульфату, що відображає хімічну аналогію між двома оксианіонами [27]. Вперше цей процес був продемонстрований в *Salmonella typhimurium*, а пізніше в *E. coli*, *Pseudomonas fluorescence*, та *Alkaligenes eutrophus* [22]. Перетинаючи клітинну мембрану по шляху поглинання сульфату, Cr(VI) утворює активні проміжні продукти Cr(V) та/або Cr(IV), вільні радикали і Cr(III) в якості кінцевого продукту, внаслідок чого в цитоплазмі виникають різноманітні токсичні ефекти (рис. 1.4) [28].

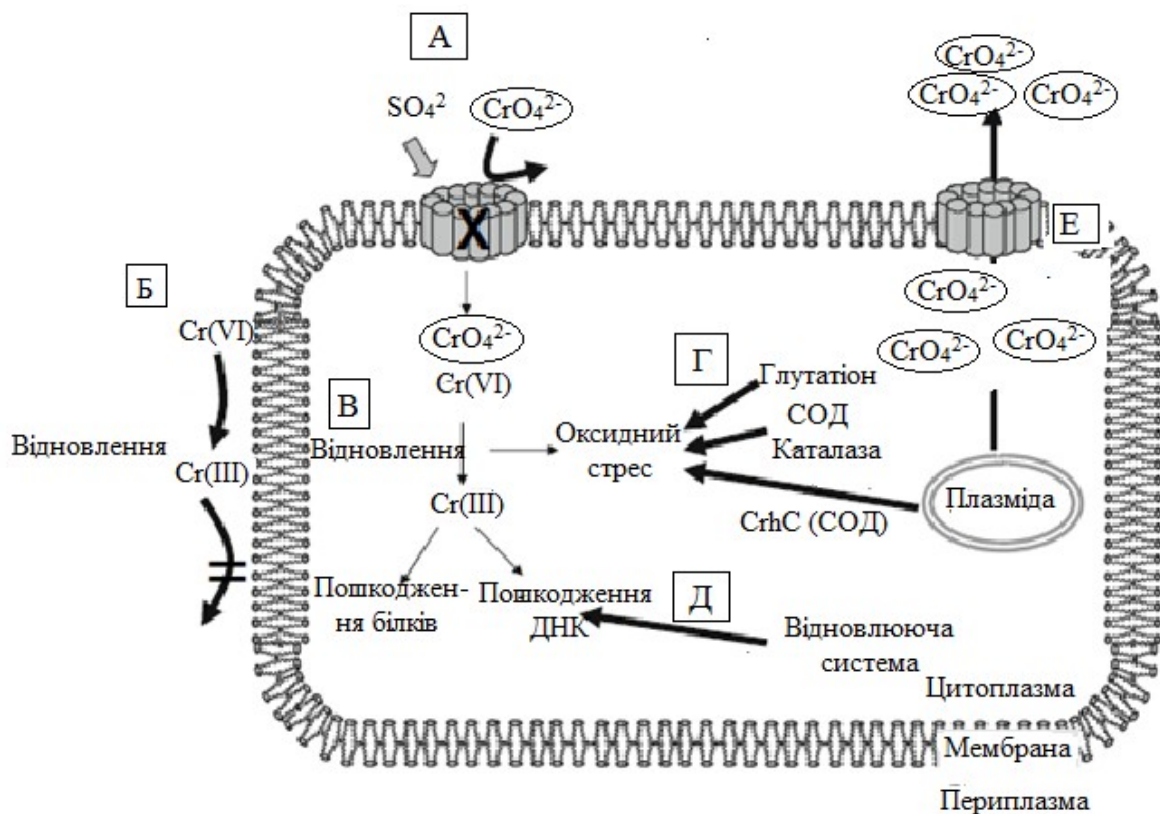


Рис. 1.4. Механізми транспортування хромату, токсичності та стійкості в бактеріальних клітинах

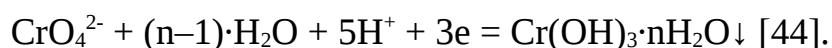
Хромати потрапляють в клітини мікроорганізмів сульфат транспортним шляхом (А). У такому випадку в хромосомі, що кодує цей транспорт, відбувається мутація (Х), внаслідок чого транспорт хрому зменшується. Відбувається позаклітинне відновлення Cr(VI) до Cr(III) (Б). Хромати, які потрапляють в клітину піддаються внутрішньоклітинному відновленню (В), що може породжувати окислювальний стрес, а також пошкодження білка та ДНК. Токсична дія хроматів мінімізується за рахунок детоксифікуючих ферментів (супероксиддисмутаза та каталаза), які беруть участь у захисті клітини від окисного стресу (Г). Також в клітині наявні системи відновлення ДНК, що захищають від пошкоджень, спричинених похідними Cr (Д). Хромати з цитоплазми видаляються за допомогою транспортерів, що кодуються плазмідною (Е) (механізми пошкодження та стійкості позначаються відповідно тонкими і жирними стрілками) [29].

### 1.3. Виявлення механізмів стійкості мікроорганізмів до іонів хрому

Відомо багато мікроорганізмів, стійких до токсичності хроматів [30]. Вони належать до різних таксонів, включаючи *Bacillus* sp. [31], *Pseudomonas* sp. [32], *Escherichia coli* [33], *Aspergillus* sp. [34], *Arthrobacter* sp. [35], *Trichoderma* sp. [36], *Enterobacter* sp. [37], *Ochrobactrum* sp. [38], *Raoultella* sp. [39], *Cellulosimicrobium* sp., *Exiguobacterium* sp. [40], і виділені з різних умов навколишнього середовища.

#### 1.3.1. Фізіологічні механізми стійкості мікроорганізмів до іонів хрому

Мікроорганізми здатні виживати в токсичних умовах середовищ, забруднених Cr(VI), за допомогою різних фізіологічних механізмів детоксикації: біоаккумуляції та біотрансформації [41]. Біоаккумуляція – це фізико-хімічний процес, за якого Cr(VI) накопичується у клітинах мікроорганізмів за механізмом стереохімічної аналогії з макроелементами. Стереохімічна аналогія – це близькість або рівність іонних радіусів макроелементів і токсичних металів. Хромати (сполуки  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) є стереохімічними аналогами сульфатів, адже іонний радіус цих сполук дорівнює 0,300 нм [27]. Саме тому хромати накопичуються у мікробних клітинах внаслідок зчепленого транспорту з  $\text{SO}_4^{2-}$  [42]. Біотехнологічно перспективним механізмом вилучення Cr(VI) з розчину є біотрансформація, що полягає у відновленні розчинного Cr(VI) до нерозчинних сполук Cr(III) [43]. Відновлення Cr(VI) до Cr(III) відбувається за реакцією:



Механізми взаємодії мікроорганізмів з Cr включають активні чи пасивні процеси, які схематично показані на рис. 1.5 [45].

Деякі компоненти протоплазми бактеріальних клітин, такі як НАДН (НАД(Ф)Н у деяких видів), флавопротеїни та інші гемепротеїни, легко відновлюють Cr(VI) до Cr(III). Бактеріальне відновлення Cr(VI) може відбуватися безпосередньо через ферментативну активність або опосередковано не ферментативними шляхами,

утворюючи такі сполуки, як глутатіон, цистеїн тощо, які можуть відновлювати Cr(VI). Шляхи бактеріального відновлення Cr(VI) представлено на рис. 1.6 [42].

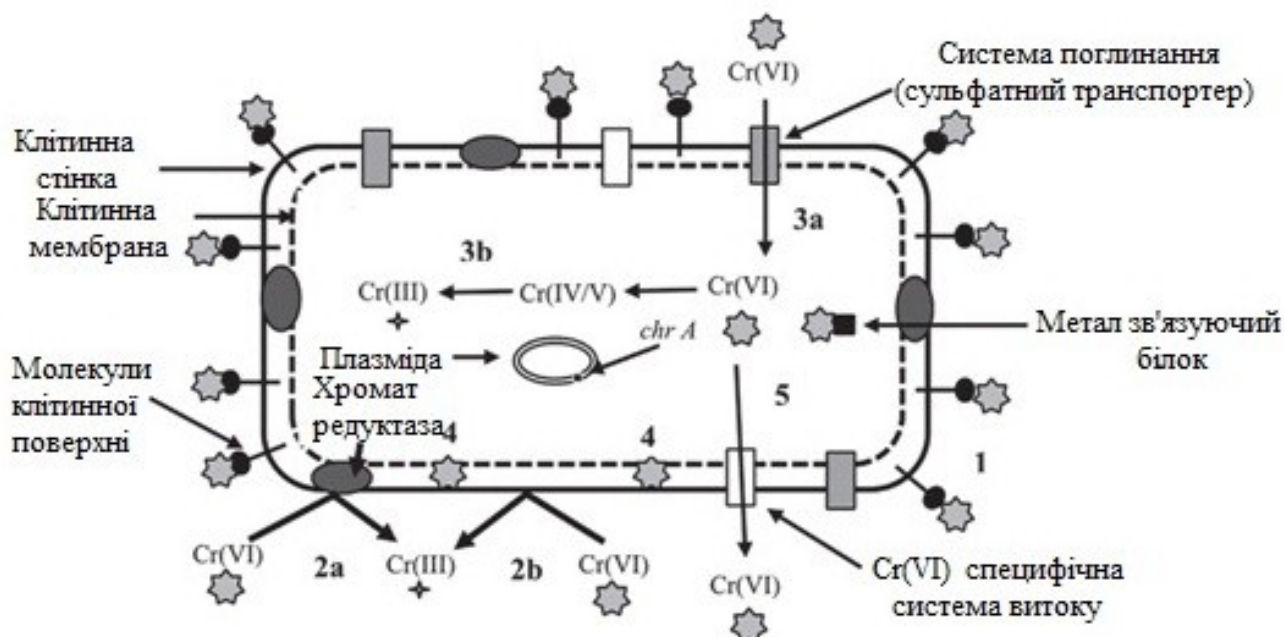


Рис. 1.5. Механізми стійкості мікроорганізмів до хрому: 1 – адсорбування Cr(VI) на поверхні клітини з утворенням хімічних зв'язків з відповідними функціональними групами; 2a – адсорбування Cr(VI) з подальшим відновленням до Cr(III) (фермент хроматредуктаза); 2b – спонтанне відновлення Cr(VI) до Cr(III) (безферментативне); 3a – поглинання Cr(VI) за допомогою сульфатних транспортерів; 3b – внутрішньоклітинне відновлення Cr(VI) до Cr(III) через нестабільні проміжні продукти Cr(V/IV); 4 – накопичення Cr(VI) всередині клітинної стінки; 5 – видалення Cr(VI) з клітини через специфічну для хрому систему витоку

Останнім часом приділяють особливу увагу потенційному використанню стійких до хрому бактерій, що містять хроматредуктази, які каталізують відновлення Cr(VI) до Cr(III), в процесі біоремедіації. Різні хроматредуктази, такі як ChrR, YieF, NemA та LpDH, були виявлені в бактерій і знаходяться або в розчинних фракціях (цитоплазмі), або пов'язані з мембраною бактеріальної клітини. Умови

відновлення, при яких ці ферменти функціонують, можуть бути або аеробними, або анаеробними, або іноді і тими, і тими.

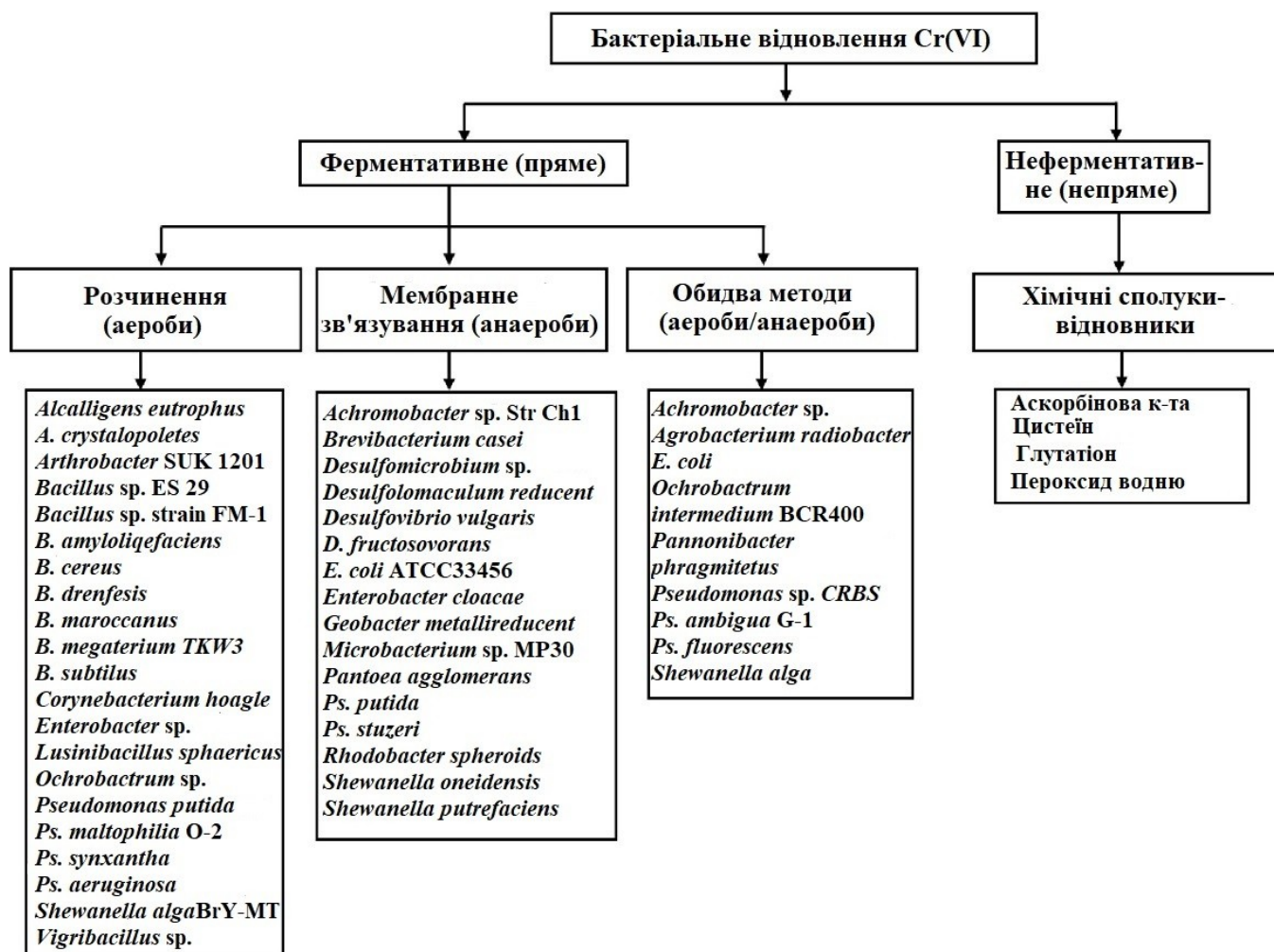


Рис. 1.6. Шляхи бактеріального відновлення Cr(VI) (прямого та непрямого)

Ензиматичне відновлення Cr(VI) до Cr(III) передбачає перенесення електронів від донорів електронів, таких як НАД(Ф)Н до Cr(VI) та одночасне генерування активних видів кисню (АВК) [42].

Так, зміни, викликані в бактеріальних штамів в умовах стресу, дають уявлення про стратегії стійкості до металу. Наприклад, у роботі [46] було виділено хромстійку грам-негативну бактерію *Alcaligenes faecalis* VITSIM2. Під час дослідження спостерігали зміну форми бактеріальної клітини, що пояснюється стабілізацією клітинної мембрани та клітинної стінки. Цим самим мікроорганізми зменшують рух металів, які не виконують біологічні функції, по оболонці клітин. Клітинна стінка

служить першою лінією захисту і контролює взаємодію між клітиною та токсикантом. Грам-негативні оболонки складаються із зовнішньої мембрани та периплазми, що містить пептидоглікан, карбоксильні групи якого є основним місцем зв'язування металу шляхом зміни мембранної проникності за допомогою стабілізації клітинної мембрани та клітинної стінки. Таким чином, моніторинг змін хімічного складу клітинної стінки дав підказки про роль клітинної стінки в стійкості до металу.

Ще одним механізмом, що перешкоджає проникненню металів, є хелатування важких металів фосфатами. Здатність прокаріотів синтезувати та руйнувати фосфати важлива для стійкості важких металів, згідно з якою іони металів стимулюють гідроліз фосфатів, а фосфати, в свою чергу, зв'язують метали з нерозчинними металевими фосфатними комплексами, які транспортуються з клітин і осаджуються на їх поверхні [46].

### 1.3.2. Молекулярно-генетичні особливості хромрезистентних мікроорганізмів

Відомо, що хромат-редуктази, виявлені в хромостійких бактеріях, каталізують відновлення шестивалентного хрому Cr(VI) до тривалентного хрому Cr(III). Ця властивість може бути обумовлена наявністю гена хроматредуктази [47]. Гени, що відповідають за резистентність до хромату були локалізовані та секвеновані, послідовності генів були депоновані у базі даних генів Національного центру інформації про біотехнології (NCBI) (табл.1.1) [48].

На сьогоднішній день для розробки системи відновлення Cr(VI) застосовуються методи генної інженерії. Наприклад, в роботі [49] наведена розробка системи відновлення Cr(VI) на основі іммобілізованої хроматоредуктази: сконструйоване злиття гена *E. coli* *pemA* та гена полігідроксиалканоатсинтази *phaC* *Ralstonia eutropha*, що дало можливість синтезувати функціоналізовані полігідроксиалканоатні гранули високого рівня, що демонструють на їх поверхні стабільну та активну редуктазу хромату *pemA*. Коли ці гранули поєднувались з глюкозодегідрогеназою *Bacillus subtilis* або форміатдегідрогеназою *Candida boidinii*,

як кофакторний регенеруючий партнер, спостерігалися високі рівні трансформації хромата з необхідними лише низькими початковими концентраціями дорогого кофактора NADH, при цьому загальна реакція забезпечується споживанням дешевих субстратів глюкози або мурашиної кислоти відповідно. Ця система є хорошою перспективою як економічне рішення для виділення Cr(VI) *ex situ*.

Таблиця 1.1

Гени хромрезистентних мікроорганізмів, записаних в базі генів NCBI

Домен	Хроматрезистентні/відновлюючі організми	Кількість хроматних генів	
<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i> (1263)	<i>b-proteobacteria</i>	564
		<i>g-proteobacteria</i>	388
		<i>a-proteobacteria</i>	253
		<i>d-proteobacteria</i>	55
		<i>e-proteobacteria</i>	5
	<i>Firmicutes</i> (532)	<i>Bacillales</i>	218
		<i>Clostridiales</i>	212
		Інші	102
	Група бактерій CFB ( <i>cytophaga-flavobacteria-bacteroides</i> )		103
	<i>Actinobacteria</i>		98
	<i>Spirochetes</i>		98
	<i>Mycoplasmas</i>		73
	<i>Cyanobacteria</i>		66
	<i>Thermotogales</i>		33
	<i>Fusobacteria</i>		16
<i>Deinococcales</i>		16	
Інші		68	
<i>Eukarya</i>	<i>Fungi</i>	112	
	<i>Animal</i>	15	
	Інші	42	
<i>Archea</i>	-	18	

Також було отримано штам *E.coli* [50], який продукує мутантний фермент, названий ChrR6. Цей фермент був отриманий за допомогою спрямованого еволюційного підходу методом ланцюгової реакції і продемонстрував у 200 разів більшу активність ніж фермент ChrR *E.coli* природного типу.



Ці дослідження в сукупності демонструють, що ферменти з генетично модифікованих бактерій представляють перспективний підхід до біоремедіації забруднених Cr(VI) стічних вод у широкому діапазоні умов навколишнього середовища.

#### **1.4. Перспективи використання хромрезистентних мікроорганізмів в процесах мікробного вилучення хроматів**

Звичайні методи видалення Cr(VI) із забруднених середовищ передбачають використання великої кількості хімічних речовин і утворення токсичного мулу. Тому важливо використовувати екологічні технології, в яких використовувався б потенціал біологічного світу. Серед кількох життєздатних підходів біотрансформація Cr(VI) до відносно нетоксичного Cr(III) хромостійкими бактеріями пропонує економічний та екологічний варіант його детоксикації [51].

У багатьох дослідженнях описано хромрезистентні мікроорганізми, що можуть використовуватися в біоремедіації. Так, у роботі [52] показано високу ефективність видалення Cr(VI) грибами *Aspergillus niger*, виділеними із забруднених хромом ґрунтів на території заводу гальванічного обладнання у Вейхай (провінція Шаньдун, Китай). Ефективність видалення Cr(VI) становила 99% за 84 год для розчинів з початковою концентрацією Cr(VI) 50 мг/л. Біоремедіація шестивалентного хрому в даному випадку відбувалася за механізмами біоаккумуляції та відновлення до нерозчинного Cr(OH)<sub>3</sub>↓. Грибковий міцелій з іммобілізованими сполуками хрому(VI), а також утворений Cr(OH)<sub>3</sub>↓ осаджували з розчину.

В Абеокуті (штат Огун, Нігерія) було виділено шість штамів хромрезистентних бактерій PZ1, PZ2, PZ3, PZ4, PZ5, PZ6. Їх було ідентифіковано як *Pseudomonas* spp. (PZ1, PZ6), *Streptococcus* spp. (PZ2, PZ4), *Bacillus* spp. (PZ3), *Micrococcus* spp. (PZ5). Визначено, що виділені штами мають різну стійкість до хрому: PZ1 – 300 мг/л, PZ2 – 400 мг/л, PZ3 – 700 мг/л, PZ4 – 700 мг/л, PZ5 – 600 мг/л, PZ6 – 400 мг/л. Серед усіх штамів лише *Streptococcus* spp. PZ4 продемонстрував здатність до видалення шестивалентного хрому. Максимальна ефективність

видалення Cr(VI) становила 85% за 120 год з початковою концентрацією Cr(VI) 100 мг/л [53].

Хромрезистентний штам *Shewanella* sp. KR2 [54] був виділений із сільськогосподарських ґрунтів неподалік шахт видобутку хромової руди в місті Сабзевар (Іран). Здатність до вилучення хроматів виділеними бактеріями *Shewanella* sp., оцінювали за засвоєнням хрому з різними концентраціями Cr(VI) від 50 до 500 мг/л в аеробних умовах (рН 7.0, 37°C). Максимальне видалення хрому (89%) через 20 хв було отримано *Shewanella* sp. в середовищі, що містить 50 мг/л Cr(VI).

Штам *Serratia proteamaculans* [55], виділений з забрудненої хромом ділянки на березі річки Себу далі по течії після місця впадання в неї ріки Фес (Марокко), стійкий до концентрації Cr(VI) 500 мг/л. Оптимальні умови відновлення Cr(VI) *S.proteamaculans* рН 7,0 та температура 30°C. Ефективність відновлення Cr(VI) знижується зі збільшенням концентрації Cr(VI) з 100 до 400 мг/л, що говорить про ферментативне відновлення хрому.

У дослідженні [56] було виділено два бактеріальні штами *Bacillus thuringiensis* (Cr-S1) та *Bacillus pumilus* (Cr-S2) на пластинах з поживним агаром, збагачених Cr(VI) в концентрації 100 мг/л. Мінімальна інгібіторна концентрація хрому для Cr-S1 становила 500 мкг/мл, тоді як для Cr-S2 – 400 мг/л. Максимальний ріст Cr-S1 та Cr-S2 спостерігали при температурі 37°C та рН 8,0 та 7,0 відповідно. Обидва бактеріальні штами, *B. thuringiensis* (Cr-S1) та *B. pumilus* (Cr-S2) оцінювали на придатність до біоремедіації Cr(VI) в культуральному середовищі, що містить 100 мкг/мл хрому. Обидва штами показали високу ефективність вилучення хроматів – 87,04% та 90,1% протягом 24 годин.

### **1.5. Мікробні технології отримання H<sub>2</sub> при бродінні органічних відходів та його використання**

Водень – екологічно чисте паливо, продуктом згорання якого є лише вода, а не парникові газы. Крім того, енергетична маса водню вища, ніж у інших видів палива, а також водень може вироблятися з поновлюваних субстратів, а саме органічних

відходів, зокрема твердих побутових відходів та стічних вод [57]. Біологічні технології отримання водню включають прямий і непрямий біофотоліз та фотоферментацію, а також процеси, що відбуваються за відсутності світла, тобто темнове бродіння, біоелектроліз та біоконверсія окису вуглецю [58].

Згідно з літературними джерелами промислове виробництво водню становить 50 млн т на рік і це значення зростає близько на 10% кожного року [59]. Напротязі 2008-2013 рр. для отримання 40-50% світового об'єму  $H_2$  застосовували природний газ, у 30% – нафту, важкі вуглеводні і лігроїн, близько у 18% – вугілля, 4% водню отримували в процесі електролізу і 0,1-1% з біомаси (рослинна та тваринна сировина) [60, 61]. Сьогодні, основну частину водню отримують за рахунок термічних процесів з природним газом і вугіллям [62,63] та електролізу води [63,64].

Одержання водню з поновлювальних джерел (метод біологічного виробництва) набуло актуальності на початку 90-х років ХХ ст. [65]. В Україні дослідження отримання біоводню перебувають на початковій стадії і, здебільшого, вони зосередженні на зброджуванні та фотоферментації [66]. Перевагою одержання біоводню, порівняно з фізико-хімічними методами є використання поновлюваної сировини та мікробних методів, які працюють за температури навколишнього середовища та атмосферному тиску.

Одним з економічно вигідних процесів отримання  $H_2$  є прямий біофотоліз. Це пояснюється тим, що для утворення біоводню необхідні лише вода і сонячне світло:  $2H_2O + h\nu \rightarrow 2H_2 + O_2$ . Зазвичай використовують прісноводні види зелених мікроводоростей, а також морські форми [67, 68]. Недоліком такої технології є висока чутливість гідрогенази до  $O_2$ , тож необхідно постійно видаляти його з фотобіореактора, що потребує розробки додаткових технологій. Тож, можна сказати, що процес прямого біофотолізу води на сьогоднішній день є лише теоретично вигідним, далеким від практичного застосування і потребує подальших фундаментальних досліджень та технологічного вдосконалення.

Ще однією новою технологією є непрямий біофотоліз води. Ця технологія передбачає використання в основному представників родів *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Calothrix*, *Gleocapsa*, *Synechococcus*. Для росту ціанобактерій потрібно менше

поживних речовин, ніж для мікроводоростей. Найбільш вивченими продуцентами  $H_2$  є ціанобактерії роду *Anabaena* (наприклад, *A. variabilis*) [69] та зелені мікроводорості *Chlamydomonas*.

Серед мікробних технологій отримання  $H_2$  найбільш перспективною є технологія темної ферментації органічного субстрату в біоводень. Вона привертає увагу дослідників по всьому світу, оскільки не вимагає великих витрат енергії та хімічних речовин порівняно з іншими хімічними шляхами, не кажучи вже про те, що використання харчових відходів як сировини може допомогти зменшити глобальну проблему накопичення відходів. Проте в даний час знання про виробництво водню з харчових відходів темним бродінням все ще обмежені в лабораторних масштабах [70].

Виробництво  $H_2$  шляхом зброджування рідких та твердих органічних відходів може бути проведене за допомогою як угруповань воденьутворювальних мікроорганізмів, отриманих з природних та техногенних джерел, так і за допомогою чистих культур. Всі ці мікроорганізми відрізняються за специфічністю до субстратів, оптимальним діапазоном рН середовища та температури, виходом  $H_2$  [67, 65, 71].

Природні мікробні угруповання (МУ)  $H_2$ -утворювальних бактерій є найбільш перспективними для застосування у промислових біотехнологіях. Вони можуть зброджувати нестерильний субстрат. Це зменшує витрати на підготовку сировини, собівартість процесу та дає змогу використовувати ширший спектр сировини [72]. Натомість собівартість використання чистих субстратів (глюкоза, сахароза та інші) є високою, адже включає в себе ціну за субстрат та витрати на його стерилізацію. Природні МУ можуть бути виділені з осаду стічних вод [73-75], зброджених відходів [76, 77], відстояного мулу [78], компосту [79-81], гною [80], ґрунту [82] та ін.

Перевагами використання чистих культур є: субстратна специфічність, можливість простої регуляції метаболічними шляхами через зміну умов росту, вища ефективність утворення  $H_2$  завдяки зниженню виходу небажаних побічних продуктів, а також відтворюваність процесу. З іншого боку існує висока вірогідність

контамінації. Таким чином, використання чистих культур вимагає стерильності, що значно збільшує собівартість утворення  $H_2$  [83].

Такі види як *C. butyricum* [84], *C. acetobutyricum* і *C. beijerinckii* [85], *C. thermocellum* [86], *C. paraputrificum* [87] та інші активно досліджуються на предмет утворення  $H_2$  із модельних та відновлювальних субстратів (рідкі та тверді харчові відходи). Особливий інтерес мають дослідження утворення  $H_2$  термофільними та гіпертермофільними бактеріями за високих температур, адже підвищення температури підвищує ефективність утворення  $H_2$  [83].

Для отримання біоводню можливо використання будь-яких природних органічних субстратів [83]. Доведено, що найбільш ефективними субстратами є вуглеводи [80], які у значних кількостях містяться в органічних відходах і біомасі (рослинна і тваринна сировина) [63].

Основними параметрами, від яких залежить вихід  $H_2$  є фізико-хімічні фактори – рН та  $E_h$  середовища, парціальний тиск газів, час утримання середовища. Оптимальні значення рН для максимального виходу  $H_2$  в різних літературних джерелах коливаються від 5,0-6,0 до 8,0-9,0. Важливим є контроль та підтримка рН на оптимальному рівні, адже зниження рН інгібує утворення водню [88].

Для підвищення утворення водню у середовище необхідно вносити  $Fe^{2+}$ , адже фермент гідрогеназа є залізовмісним. Наприклад у роботі [89] повідомлено, що за періодичного отримання водню з крохмалю *C. pasteurianum* була встановлена оптимальна концентрація  $Fe^{2+}$  10 мг/л. Під час водневого зброджування важливим є внесення додаткового джерела азоту, в якості якого можна використовувати відходи виробництва кукурудзяного крохмалю [90].

В якості додаткових відновників для зниження  $E_h$  та  $O_2$  найчастіше використовують аргон, азот, і L-цистин·HCl. Але, застосування таких відновників є відносно дорогим, і тому економічно не вигідним для промислового виробництва  $H_2$ . Авторами [91] було запропоновано використання *E. aerogenes* разом з *Clostridium* замість дорогих хімічних відновників для ефективного виробництва  $H_2$  за зброджування крохмалю.

До сьогодні, в літературних джерелах не повідомляється про стабільний промисловий процес отримання  $H_2$  за зброджування органічних відходів. Лише у кількох дослідженнях проводилась зброджування вуглеводів в пілотних установках [92]. У 2005 році в Китаї був проведений перший повномасштабний демонстраційний проект для отримання  $H_2$ . В CSTR-реакторі об'ємом  $100\text{ м}^3$  (робочий об'єм  $64,5\text{ м}^3$ ) водень отримували з м'ясових стічних вод протягом року. Середня питома швидкість утворення  $H_2$  становила  $334\text{ м}^3/\text{добу}$  ( $5,26\text{ м}^3\text{ H}_2/\text{м}^3$  реактора/добу). У подальшому  $H_2$  використовували для вироблення електроенергії в паливних елементах [93].

Технологічна схема, що включає в себе одночасне біоелектрохімічне отримання  $H_2$  та очищення стічних вод солодового заводу та каналізаційних очисних споруд була розроблена Щурською К.О. у 2014 р. Орієнтовна вартість такого водню становить  $52\text{ грн/кг}$  [66]. У 2015р. Голуб Н.Д. було проведено випробування технологічної схеми отримання  $H_2$  з целюлозовмісної сировини за допомогою багатокомпонентної анаеробної асоціації з донних відкладень та компосту. Вихід  $H_2$  становив  $16\text{ кг/т}$  соломи зернових культур, а також до  $140\text{ кг H}_2/\text{добу}/1000\text{ м}^3$  стічної води пивзаводу. Додатково можна отримувати  $12\text{ кг H}_2/\text{добу}/1000\text{ м}^3$  в біоелектрохімічному паливному елементі [94].

До основних переваг утворення  $H_2$  шляхом бродиння відносять: можливість безперервності процесу утворення  $H_2$ ; широкий спектр і дешевизна субстратів; утворення цінних побічних продуктів (спиртів, летких жирних кислот та ін.); відсутність технологічних витрат на аерацію. Недоліками є низький (у порівнянні з теоретичним) вихід  $H_2$  та емісія  $CO_2$ . Методом регуляції метаболічних шляхів: зменшенням утворення спиртів та кислот; підтриманням низького  $pH_2$ ; видаленням  $CO_2$  можливо вирішити дані проблеми. Необхідні додаткові дослідження не лише для оптимізації окремих стадій, але й для інтеграції їх в єдиний технологічний ланцюг процесів підготовки сировини і видалення небажаних кінцевих продуктів, перш за все органічних кислот [84].

Як для України, так і для інших країн розробка нових біотехнологій отримання відновлюваних енергоносіїв, зокрема,  $H_2$ , є дуже актуальною

проблемою [95-97]. В Україні не було розроблено жодної біотехнології, яка б передбачала одержання  $H_2$  за рахунок переробки твердих харчових відходів. Причинами цього є відсутність системного підходу до створення універсальних мікробних технологій отримання  $H_2$ .

В результаті оцінки фізіологічних властивостей різних воденьутворювальних мікроорганізмів можна зробити висновок, що найбільш ефективно  $H_2$  утворює угруповання спороутворюючих бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*, які широко поширенні в екосистемах. Клостридії містять низькопотенціальні ферредоксини ( $E_0' = -420...-490$  мВ), які дають змогу утворювати  $H_2$  за будь-яких його концентрацій у газовій фазі [98, 99]. Тому накопичення  $H_2$  не призводить до інгібування його утворення за механізмом зворотнього зв'язку. Саме тому селекціоновані угруповання послідовно здійснюють аеробну (*Bacillus*) та анаеробну (*Clostridium*) швидку деструкцію широкого спектру полімерів як рослинного, так і тваринного походження. Ефективність утворення  $H_2$  може бути підвищена завдяки цілеспрямованій, контрольованій регуляції мікробного метаболізму.

Використання такої технології висвітлено у роботах авторів [100]. Авторами запропоновано зброджування змішаних харчових відходів методом темної ферментації в горизонтальному ферментері об'ємом робочої камери 20 л. Для зброджування використовували суміш різних харчових відходів, загальна маса яких становила 19 кг та розроблений раніше гранульований мікробний препарат, що складається з активних водень-утворюючих бактерій та регуляторів їх метаболізму. Найвищої ефективності зброджування було досягнуто за умов періодичного перемішування протягом 10 хв з перервою в 20 хв. Деструкція відходів за таких умов відбувалася за 4 доби, а вихід водню становив 123 л/кг відходів при концентрації у газовій фазі 41%.

## 1.6. Висновки до розділу

З'ясовано, що хром пластичний тугоплавкий метал світло-сірого кольору з характерним металевим блиском. Іони хрому у незначних концентраціях необхідні

для функціонування енергетичного метаболізму мікроорганізмів, але при високих концентраціях, мають згубний вплив на мікроорганізми. Хром виявляє канцерогенну та мутагенну дію на клітини мікроорганізмів.

Значення стандартного редокс-потенціалу реакції відновлення  $\text{CrO}_4^{2-}$  до  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (+555 мВ) знаходиться всередині зони термодинамічної стійкості води (-414 мВ - +814 мВ при рН 7). Отже, можна прогнозувати не тільки існування мікроорганізмів, стійких до високих концентрацій іонів  $\text{Cr}^{6+}$ , а й здатних до біоремедіації шестивалентного хрому з середовищ шляхом відновлення його до  $\text{Cr}^{3+}$ .

Стійкість мікроорганізмів до хрому(VI) забезпечується фізіологічними (біоакумуляція та біотрансформація) та генетичними механізмами. Стійкі до токсичності хроматів мікроорганізми належать до різних таксонів, включаючи *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Aspergillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Trichoderma* sp., *Enterobacter* sp., *Ochrobactrum* sp., *Raoultella* sp., *Cellulosimicrobium* sp., *Exiguobacterium* sp.

Розглянуто мікробні технології отримання  $\text{H}_2$  при бродінні органічних відходів. Виявлено методи бродіння, їх переваги та недоліки, субстрати зброджування, найбільш ефективні угруповання бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*, які утворюють  $\text{H}_2$  і широко поширені в екосистемах.

Мікробні механізми детоксикації сполук хрому можуть слугувати основою для розробки нових технологій видалення Cr із забруднених середовищ: стічних вод, забруднених ґрунтів, що є економічною та екологічною альтернативою фізико-хімічним методам детоксикації.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Підготовка посуду, поживних середовищ та стандартних розчинів токсичних сполук хрому(VI)

Для дослідження здатності синтезувати водень при зброджуванні крохмалевмісних субстратів дослідженим анаеробним штамом воденьутворюючих бактерій культивування здійснювали у скляних флаконах об'ємом 250 мл, закритих корком та металевим ковпачком.

У дослідах використовували градуйовані флакони об'ємом 250 мл, які закривали гумовими корками і загвинчували металевими ковпачками з отворами (рис. 2.1). Гумові корки стерилізували кип'ятінням 15-20 хв, у дистильованій воді, металеві ковпачки стерилізували УФ-променями або протирали дезінфікуючими засобами (етанолом).

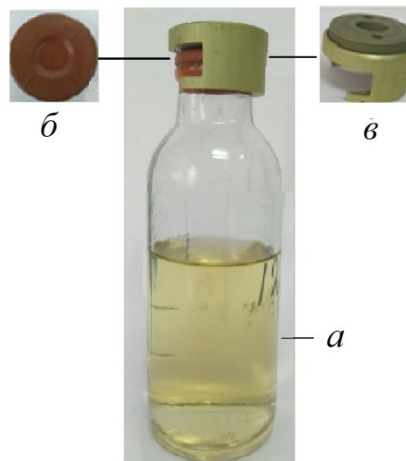


Рис. 2.1. Градуйовані флакони об'ємом 250 мл (а), закриті гумовими корками (б) і металевими ковпачками (в) з отворами

В якості поживного середовища для зброджування використовували поживний бульйон (NB) (HiMedia, Індія) з додаванням стерильної, подрібненої

картоплі. Картопля та поживний бульйон використовували як моделі органічних відходів.

Стерилізацію картоплі проводили наступним чином. Картоплю попередньо промивали від бруду абразивною губкою з розчином 5% ПАР (пральний порошок). Бульби відмивали від розчину ПАР дистильованою водою та висушували. Після цього очищали від лущиння стерильним скальпелем, стерилізували фламбуванням у полум'ї газового пальника і нарізали кубиками з розміром ребра 0,5-0,7 см (рис. 2.2). Потім, її поміщали в пластиковий контейнер і заливали стерильною гарячою дистильованою водою (80 – 90°C) пастеризували на киплячій водяній бані протягом 10 хв.



Рис. 2.2. Приготована для зброджування картопля

Для приготування 150 мл поживного бульйону у флакони, закриті ватно-марлевими пробками, об'ємом 250 мл, вносили 2 г порошку NB та 144 мл дистильованої води. Автоклавували при 1,5 атм протягом 20 хв. Потім, додавали подрібнену стерильну сиру картоплю (50,0 г) та інокулят, закривали стерильними еластичними гумовими корками (рис. 2.3). Для герметичної фіксації на флакони нагвинчували металеві ковпачки з отворами в центрі ( $d = 15-17$  мм). Отвори в центрі слугували для відбору проб газу та культуральної рідини із флаконів. Культивували за температури 30°C протягом 10 діб.



а

б

в

Рис. 2.3. Підготовки посуду, середовища та субстрату: а – флакон з середовищем NB після автоклавування; б – внесення картоплі та інокуляту; в – готові дослідні флакони

Інокулят штаму *Clostridium butyricum* GMP1 для дослідів вирощували в рідкому середовищі NB в анаеробних умовах протягом 1 доби за температури 30°C. Далі вносили по 3 мл до дослідних флаконів в стерильних умовах пластиковим шприцем («Bayer») об'ємом 5,0 мл.

Наступним етапом було приготування стандартних розчинів хрому(VI). Як вихідна сполука для приготування розчину використовувався хромат калію –  $K_2CrO_4$ . Молярна маса цієї сполуки дорівнює 194,1896 г/моль. Зважаючи на те, що певну частку сполуки складають калій, необхідно було визначити коефіцієнт перерахунку для того, щоб розрахувати концентрацію за катіоном  $Cr^{6+}$  у розчині. Для цього сумарну молярну масу сполуки розділили на молярну масу хрому (51,9961 г/моль). Отримали 3,7346.

Для приготування 250 мл стандартного розчину хромату з концентрацією  $Cr^{6+}$  – 30 г/л у мірний стакан внесли 28 г солі  $K_2CrO_4$  та розчинили у 200 мл води. Після повного розчинення розчин перелили у колбу Мора об'ємом 250 та довели об'єм до мітки дистильованою водою. Розчин мав рН = 8,2. Отриманий розчин перелили у герметичний флакон для подальшого аналізу.

Для дослідження готували розчини хрому з концентрацією 50 мг/л та 100 мг/л. Для цього у колбу Мора об'ємом 250 мл вносили 0, 417 мл та 0,833 мл відповідно

стандартного розчину хрому(VI) з концентрацією 30 г/л і доводили до мітки дистильованою водою.

## **2.2. Культивування анаеробних мікроорганізмів за модифікованою методикою Хангейта**

Для культивування анаеробних мікроорганізмів використовували модифіковану методику Хангейта у присутності низькопотенціального редокс-буфера (-150...-200 мВ) – цитрату заліза (II) та індикаторів редокс-потенціалу – резазуринату натрію.

Попередньо готували стандартний розчин заліза (II) [101] з рН 5,0-5,1 –20 г/л. Для приготування 100 мл розчину у флакон об'ємом 200 мл вносили 74 мл дистильованої води, закривали пробкою та 5 хв продували аргоном зі швидкістю 0,5 л/хв. Після цього у стерильних умовах та у потоці аргону вносили 17,32 г трьохзаміщеного цитрату натрію. Після розчинення кристалів цитрату натрію у флакон вносили 8,66 г кристалів  $\text{FeSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Отриману суміш продували аргоном протягом 5 хв та герметично закривали гумовою коркою та металевим ковпачком з 5 мм отвором в центрі для відбору відновника. Проколовши гумову пробку голкою ( $d = 0,5$  мм), у флакон вводили аргон до надлишкового тиску 0,4-0,5 атм. Закритий флакон ставили на водяну баню, воду доводили до кипіння та стерилізували в такому режимі флакон 10 хв. Для культивування анаеробних бактерій відновник вносили у середовище в концентрації 200-1000 мг/л  $\text{Fe}^{2+}$ .

Для спостереження за зміною умов зброджування субстратів від аеробних (високопотенційних,  $E_h \geq -30-50$  мВ) до облигатно-анаеробних (низькопотенційних,  $E_h \leq -100$  мВ) значень ОВП до середовища додають редокс-індикатор. Окисно-відновний потенціал визначали за зміною забарвлення індикатору резазурину у середовищі. Він має дві фази зміни кольору:

– перша фаза, при  $E_h = -50$  мВ, фіолетовий резазурин незворотно відновлюється до резорурфіну, що має яскравий червоно-рожевий колір;

– друга фаза, при  $E_h = -100$  мВ, резорурфін відновлюється до безбарвної сполуки – лейкорезорурфіну [101].

Розчин індикатору редокс-потенціалу (ОВП) готували з розрахунку 1 мл/л 0,1% р-ну, стерилізували при 0,5 атм та додавали у середовище після внесення всіх компонентів.

Для отримання інокуляту мікробного препарату проводили серію десятикратних розведень мікробного препарату (рис. 2.4). Під час цього колбу та пеніцилінові флакони безперервно продували аргонем для запобігання потрапляння кисню у газову фазу лабораторного посуду.

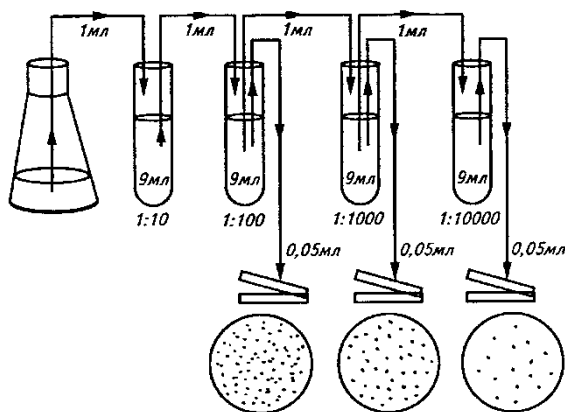


Рис. 2.4. Схема приготування розведень і посіву мікроорганізмів

За стандартною методикою [102] для приготування розведень стерильну воду або фізіологічний розчин попередньо розливали по 9 мл у стерильні сухі пробірки. Потім 1 мл досліджуваної суспензії стерильною піпеткою переносили у пробірку з 9 мл стерильної води – це перше розведення у 10 разів ( $10^{-1}$ ). Отримане розведення ретельно перемішували новою стерильною піпеткою, набираючи в піпетку й випускаючи з неї отриману суспензію. Цю процедуру виконували 3-5 разів, потім тією же піпеткою відбирали 1 мл отриманої суспензії й переносили в другу пробірку – одержуючи друге розведення ( $10^{-2}$ ). У такий же спосіб готували і наступні розведення. Ступінь розведення залежить від густини досліджуваної популяції мікроорганізмів.

Для отримання ізольованих колоній облигатних анаеробних мікроорганізмів готували агаризоване поживне середовище у флаконах. Модифікований авторами [103] метод Хангейта полягає у використанні скляних флаконів об'ємом 120 мл ( $d = 5$  см,  $h = 7$  см) замість спеціальних пробірок Хангейта. Флакони були з різьбою на горловині, які закривали еластичними гумовими пробками та для герметичної фіксації пробок нагвинчували пластикові або металеві ковпачки з отворами в центрі ( $d = 3-7$  мм). Отвори в центрі слугували для відбору проб газу та культуральної рідини. У флакони під час безперервного продування стерильним аргонем вносять 10 мл агаризованого середовища, інокульованого з десятикратних послідовних розведень культуральної рідини. Флакони герметично закривають гумовими пробками і одразу ж починають обертати руками під струменем холодної води в горизонтальному положенні до повного застигання агару. Середовище утворює на стінках флакона тонкий рівномірний агаровий циліндр, на поверхні та у шарі якого ростуть ізольовані колонії анаеробних бактерій (рис. 2.5). Шприцем через пробку вносять дозу  $H_2S$  (0,1-0,5 мл/10 мл середовища), що забезпечує знебарвлення резазурину ( $Eh \leq -100$  мВ).

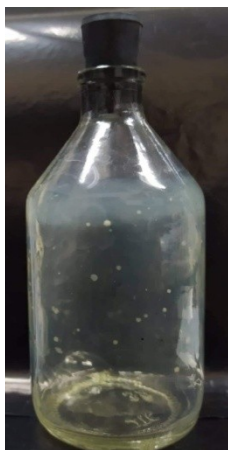


Рис. 2.5. Ріст колоній анаеробних мікроорганізмів на агаризованих середовищах у флаконах

Резазурин (0,1%) використовували в якості редокс-індикатора (знебарвлюється при  $Eh \leq -100$  мВ). Факультативні та облигатні анаероби

культивували протягом 10 днів за температури 30°C, а їх кількість визначали прямим підрахунком КУО у флаконах.

### **2.3. Визначення ефективності біовилучення токсичних сполук хрому(VI) мікробною масою**

Здатність біовилучення сполук хрому (VI) мікробною масою визначали якісно та кількісно.

Якісну реакцію проводили з 1,5-дифенілкарбазидом (ДФК). Реакція базується на взаємодії дифенілкарбазиду з хромом(VI) в розчині реагент відновлює шестивалентний хром до тривалентного з утворенням окисленої форми реагенту – діфенілкарбазона, який з іонами Cr(III) при рН = 1 утворює позитивно заряджений, стійкий, комплекс діфенілкарбазоната хрому (III), фіолетового кольору з максимумом поглинання 540 нм [104]. Отже, ми спостерігали, що за наявності хромату Cr(VI) розчин міняв свій колір: зі знебарвлюваного забарвлювався у фіолетовий колір (рис. 2.6).



Рис. 2.6. Якісна реакція на Cr(VI) з ДФК

Для кількісного визначення концентрації Cr(VI) використовували фотоколориметричний метод [105]. Визначення проводили на фотоколориметрі «КФК – 2 МП», використовували кювети з довжиною оптичного шляху 0,5 см і зелений світлофільтр ( $\lambda = 540$  нм).

Для визначення концентрації відновного хрому у зразках досліді стерильним шприцем відбирали 3 мл проби та центрифугували на міні-центрифузі «EZeeMini

D1008» при  $g=7\ 000$  об/хв протягом 10 хв. Відбирали 1 мл супернатанту та вносили у пробірку. Потім додавали 3 мл дистильованої води, 0,5 мл концентрованої азотної кислоти та 0,5 мл ДФК (0,5%).

Оптичну густину розчинів хрому визначали за побудованою калібрувальною кривою (табл. 2.1).

Для побудови калібрувальної кривої готували головний робочий розчин з концентрацією  $Cr^{6+}$  – 100 мг/л. Шляхом розведення цього розчину готували серію робочих розчинів з концентраціями  $Cr^{6+}$  0.001, 0.003, 0.005, 0.007, 0.01, 0.012, 0.015, 0.02, 0.025 мг/мл з додаванням 0,5 мл концентрованої азотної кислоти та 0,5 мл ДФК (0,5%) у кожную пробу.

Таблиця 2.1

Значення оптичної густини за різних концентрацій  $Cr(VI)$  для побудови калібрувального графіка

Концентрація $Cr(VI)$ мг/мл	Оптична густина
0,001	0,034
0,003	0,120
0,005	0,197
0,007	0,238
0,010	0,291
0,012	0,412
0,015	0,531
0,020	0,624
0,025	0,845

Для приготування контролю порівняння використовували дистильовану воду (4 мл), з додаванням 0,5 мл концентрованої азотної кислоти та 0,5 мл ДФК (0,5%). Отримані дані оптичної густини використовували для побудови калібрувальної кривої (рис. 2.7).



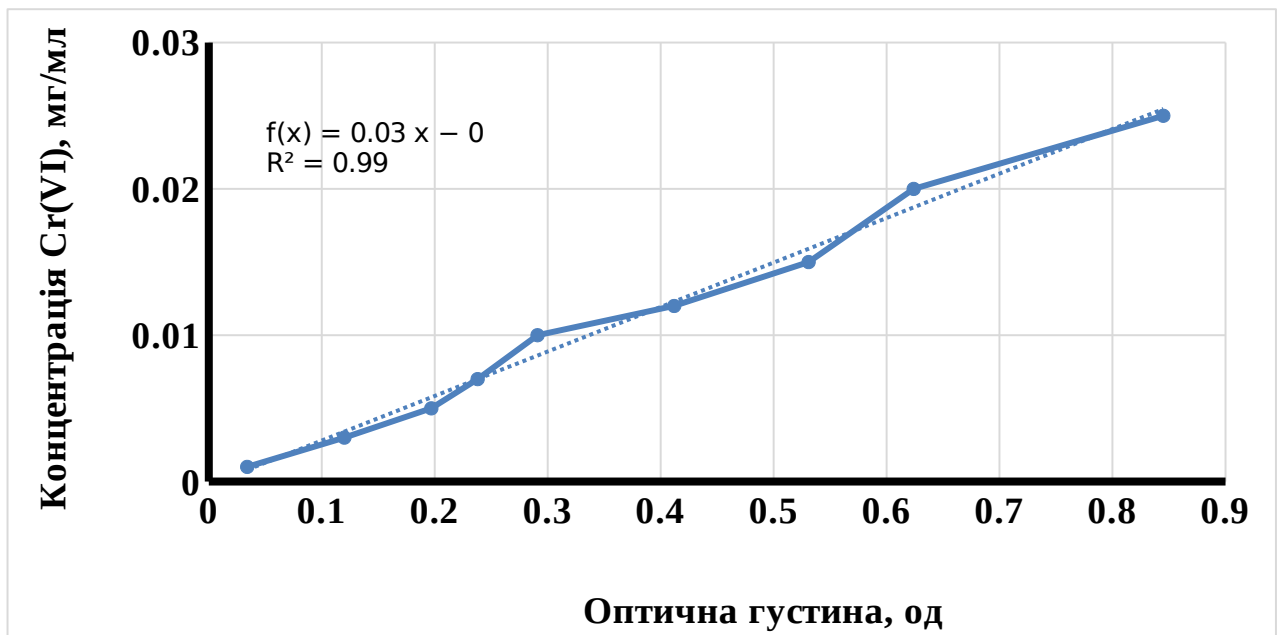


Рис. 2.7. Калібрувальна крива залежності оптичної густини від концентрації Cr(VI) в розчині

За калібрувальною кривою визначали концентрацію відновного хрому у 1,0 мл досліджуваного зразка за формулою отриманою з графіка [106]:

$$C = 0,030 \times D, \quad (2.1)$$

де:  $C$  – концентрація хрому у 1,0 мл досліджуваного зразка мг/мл;

$D$  – оптична густина досліджуваного розчину, од.

## 2.4. Методи дослідження динаміки зброджування органічних відходів

Динаміку зброджування органічних відходів визначали за такими параметрами як рН, Eh, об'єм та склад газової суміші. Завершення процесу визначали за візуальною оцінкою припинення газоутворення, зменшенням концентрації водню в газовій суміші. Контролювали параметри один раз на добу.

### 2.4.1. Визначення рН та Eh за зброджування субстрату

Визначення рН і Eh проводили потенціометрично за допомогою комбінованого йоніміра універсального «ЕВ-74». Для вимірювання рН

використовували електродну пару – скляний вимірювальний електрод та хлорсрібний електрод порівняння ЕВЛ-1МЗ.

Редокс-потенціал (Eh) визначали платиновим електродом ЕПВ-1 і хлорсрібним електродом порівняння ЕВЛ-1МЗ (рис. 2.9б). Для відбору зразків культуральної рідини використовували стерильні пластикові шприци («Bayer») об'ємом 5,0 мл.

#### 2.4.2. Вимірювання об'єму газу під час зброджування субстрату

Під час зброджування субстрату вимірювали об'єм газу після визначення складу газової фази газохроматографічним методом. Для визначення об'єму газу використовували герметичний газгольдер, обладнаний трубками та металічними голками для видалення газу. Після кожного вимірювання газгольдер повністю заповнювали водою задля уникнення похибок при обчисленні складу газової фази.

### **2.5. Газохроматографічний метод визначення газової фази при бродінні харчових відходів**

В процесі мікробної деструкції органічних сполук визначали склад газової фази методом газової хроматографії.

Відбір проб газів та культуральної рідини здійснювали пластиковими стерильними шприцями (фірма «Bayer») об'ємом 2,5 мл. Проби відбирали, проколюючи голкою шприца гумову пробку флакону. Пробки та голку шприців, перед тим, ретельно стерилізували, протираючи спиртом та опалюючи у полум'ї пальника. Об'єм синтезованого газу вимірювали по шкалі шприца (видавлювання поршня шприца надлишковим тиском газу).

Склад газової фази визначали за стандартною методикою на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД [107]. Використовували дві сталеві колонки – одна (I) для аналізу  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$  і  $CH_4$ , інша (II) – для аналізу  $CO_2$ . Параметри колонок: I –  $l = 3$  м,  $d = 3$  мм, сорбент 13X (NaX); II –  $l = 2$  м,  $d = 3$  мм, сорбент Porapak-Q; температура

колонок, випарника і детектора + 50 °С, струм детектора – 50 мА. Газ-носій – аргон; швидкість потоку газу – 30 мл/хв. Вміст газів (у %) розраховували за за площиною піків, що реєструвались самописцем полярографа використовуючи формулу:

$$C = K \cdot S \cdot M, \quad (2.2)$$

де С – концентрація газу, %;

К – коефіцієнт, який пов'язує піки вимірювання одного газу при різній чутливості, %/мм<sup>2</sup>. Коефіцієнт визначається щоразу при калібрування приладу повірочними газовими сумішами;

S – площа піку, мм<sup>2</sup>;

M – чутливість детектора, при якій проба газу проходила через колонку.

## 2.6. Статистичні методи обрахунку результатів досліджень

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакетів прикладної програми Microsoft Excel та Origin8. Дані представлені у вигляді середніх значень з довірчими інтервалами, статистична значимість відмінностей визначалася за коефіцієнтом Стьюдента (р <0,05).

## 2.7. Висновки до розділу

Отже, в ході виконання експериментальної частини дипломної роботи вихідним матеріалом слугували анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1, крохмалевмісний субстрат (картопля) як модель харчових відходів. Динаміку росту штаму вивчали, використовуючи потенціометричні (зміни рН, Eh), газохроматографічні методи (синтез водню), фотокolorиметричні (біовилучення токсичних сполук хрому (VI)) та модифікований метод Хангейта (культивування на твердих середовищах). Наведено також, мікробіологічні (посів, культивування), фізико-хімічні (приготування середовищ, центрифугування, визначення біовилучення токсичних сполук Cr(VI)) та статистичні методи дослідження – для підрахунку одержаних експериментальних даних.

### РОЗДІЛ 3

## ДЕСТРУКЦІЯ ХАРЧОВИХ ВІДХОДІВ ТА МІКРОБНОГО ВИЛУЧЕННЯ ХРОМАТІВ ЯК ПІДҐРУНТЯ ПРИРОДООХОРОННИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ

Деструкцію харчових відходів та мікробне вилучення хроматів з крохмалевмісного субстрату проводили за схемою яка наведена на рис. 3.1.



Рис. 3.1. Схема експериментальних досліджень за темою роботи

### 3.1. Властивості анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 – деструктора харчових відходів

Штам *Clostridium butyricum* GMP1 був взятий з музею мікроорганізмів у відділі біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного. Цей штам анаеробних бактерій, був виділений з небезпечних багатокомпонентних органічних відходів при зброджуванні [108].

За морфологією клітини грампозитивні прямі, рухливі палички, розміром 0,8-1,0 × 2,5-3,1 мкм. Клітини поодинокі, в парах, у коротких або довгих ланцюжках. Спори овальні, не роздувають клітину (рис.3.2).

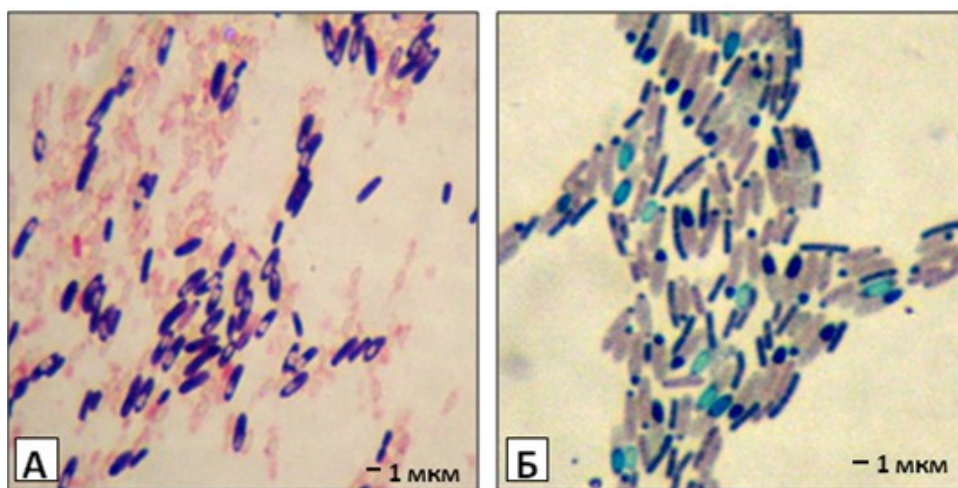
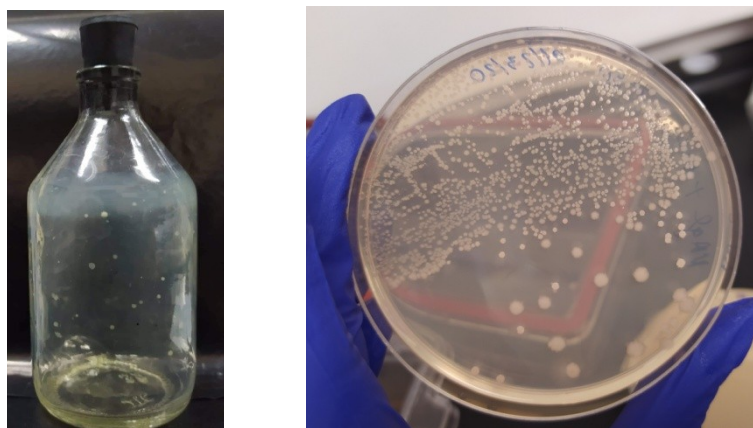


Рис. 3.2. Морфологія клітин *Clostridium butyricum*: А – фарбування за Грамом (спори овальні всередині клітини); Б – фарбування за Шефером-Фултоном (спори – світло-зелені, клітини – рожеві та блідо-рожеві)

Колонії – 1-3 мм в діаметрі, від круглих до неправильної форми, опуклі; блискучі, непрозорі, білі, гладенькі (рис.3.3.)



а

б

Рис. 3.3. Штам *Clostridium butyricum* GMP1: а – виділення колоній чистої культури у флаконі на твердому середовищі методом Хангейта; б – виділення колоній чистої культури на чашках Петрі в анаеростаті за методом Хангейта

Штам активно зброджує вуглеводи. В результаті цього утворюються:  $H_2$ , бутират, ацетат, етанол. Оптимальними умовами процесу зброджування є рН=6,0-7,0 та  $E_h = -250 \dots -330$  мВ. Тривалість деструкції становить 6 діб, максимальна [108].

### **3.2. Визначення метаболічної активності анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів**

На першому етапі дослідження було проведено водневе зброджування крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів. Було показано високу ефективність бродіння органічних сполук (рис. 3.4). З графіка видно, до 24 години культивування значення рН зменшились з 7,3 до 5,5. Редокс-потенціал також різко знизився з +320 мВ до -295 мВ, що є оптимальними умовами для синтезу водню.

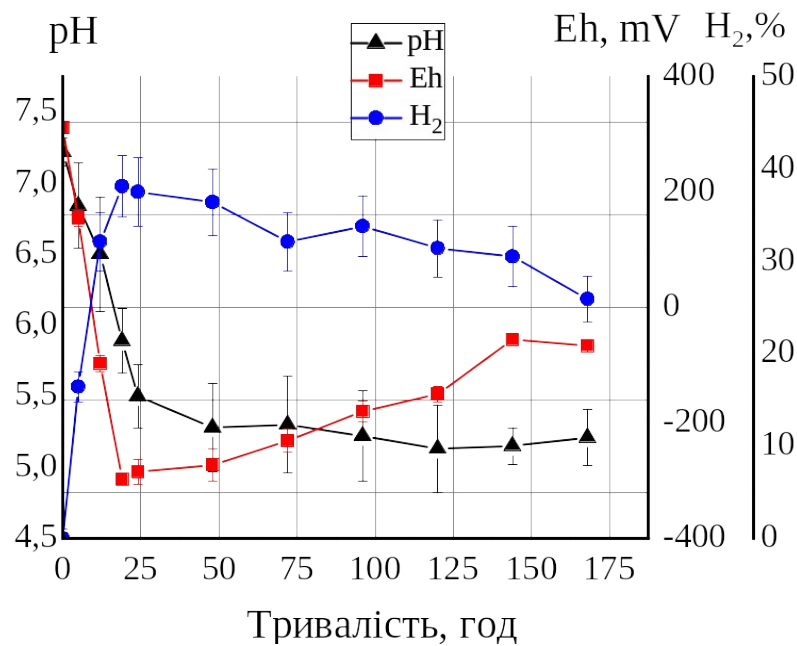


Рис. 3.4. Динаміка росту *Clostridium butyricum* GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів

Синтез H<sub>2</sub> інтенсивно розпочався через 5 годин бродіння. Його концентрація досягла 17,2 ±2,0%. Максимальна концентрація H<sub>2</sub> (38,1±2,0 %) спостерігалась на 19 годину бродіння (рис. 3.5).

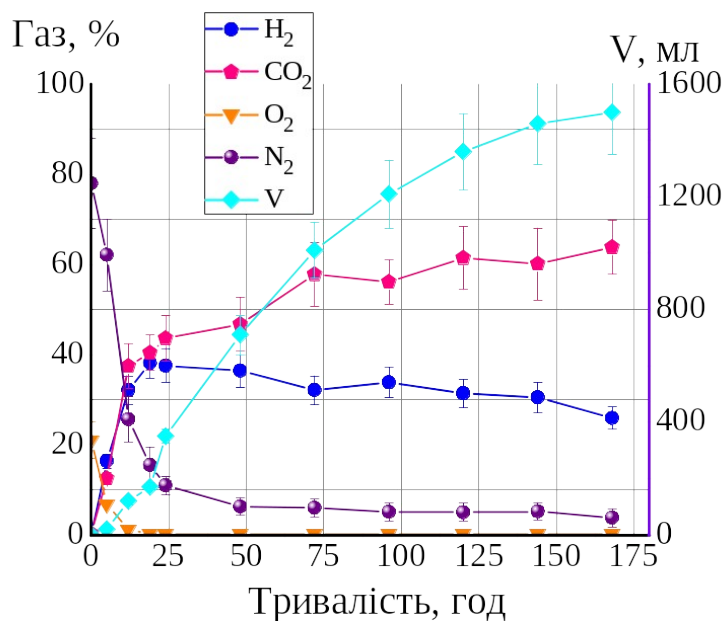


Рис. 3.5. Склад газової фази під час деструкції крохмалевмісного субстрату *Clostridium butyricum* GMP1

Активність штаму *Clostridium butyricum* GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату спостерігати і візуально (рис. 3.6).

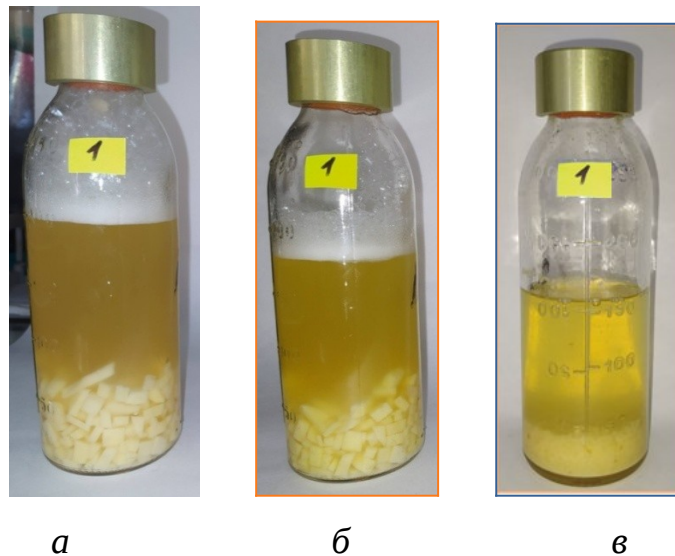


Рис. 3.6. Ріст *C. butyricum* GMP1 на крохмалевмісних відходах:

а – 1 доба; б – 3 доба; в – 6 доба

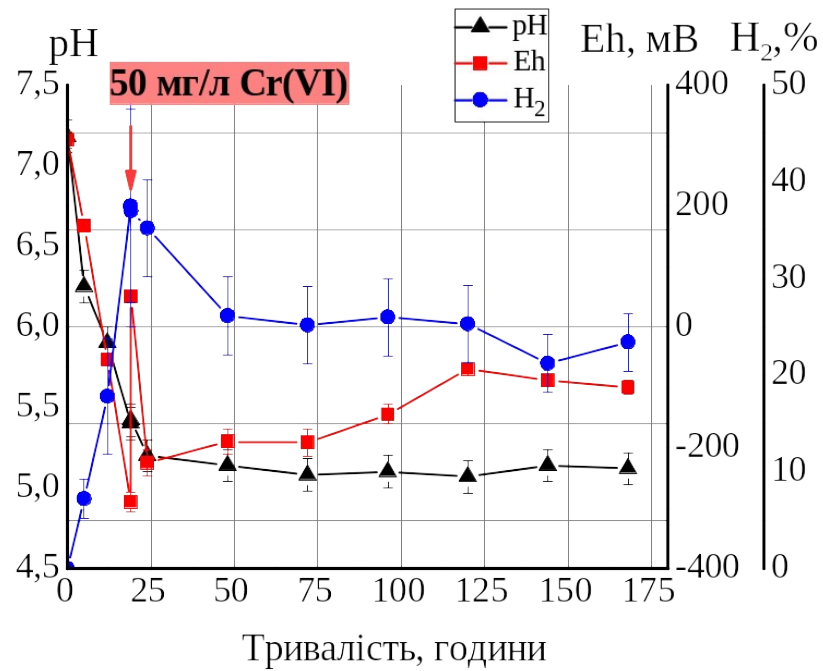
На 1-2 добу на поверхні середовища накопичувалась піна, бульбашки газу, на 3-4 добу спостерігали поступову деструкцію картоплі з осадженням на дні флаконів високодисперсного детриту, кількість зброджуваного субстрату (картоплі) за 5-6 діб культивування зменшилось приблизно до 20%. Отже, можна вважати тривалість деструкції (Т) = 6.

### 3.3. Визначення метаболічної активності анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату, з одночасним додаванням у реактор різних концентрацій хроматів

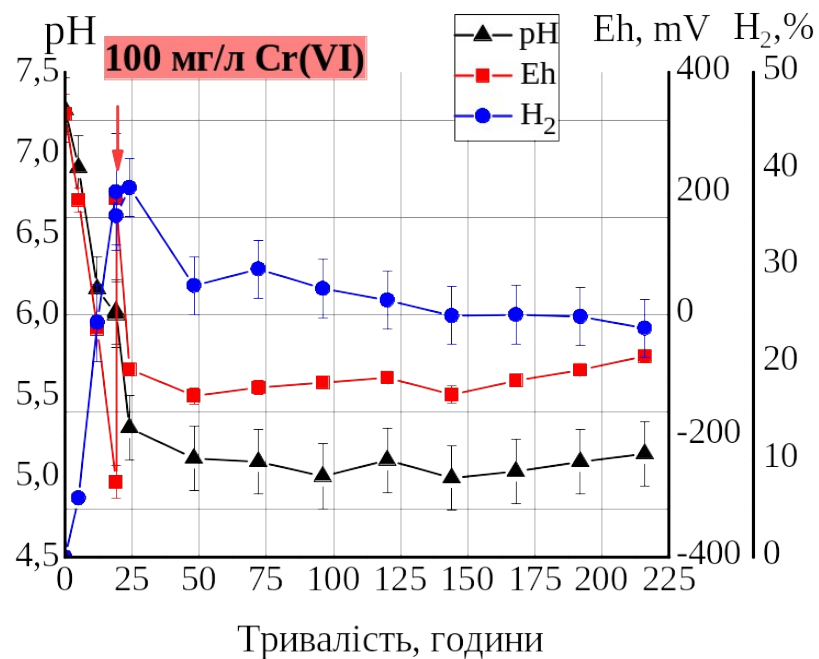
Приготовані розчини хромату з концентраціями 50 та 100 мг/л вносили у флакони на 19 годину ферментації, коли процес бродіння був найбільш інтенсивним (рис. 3.7, а,б). Одразу після додавання 50 мг/л Cr(VI), окислювально-відновний потенціал різко збільшився з -290 мВ до +50 мВ (рис. 3.7, а), також при внесенні 100 мг/л Cr(VI) з -276 мВ до +192 мВ (рис. 3.7,б). Додавання 50 та 100 мг/л Cr(VI)



не пригнічувало ріст *Clostridium butyricum* GMP1, майже не впливало на концентрації водню у газовій фазі (рис. 3.8 а,б) та рН культурального середовища.



а

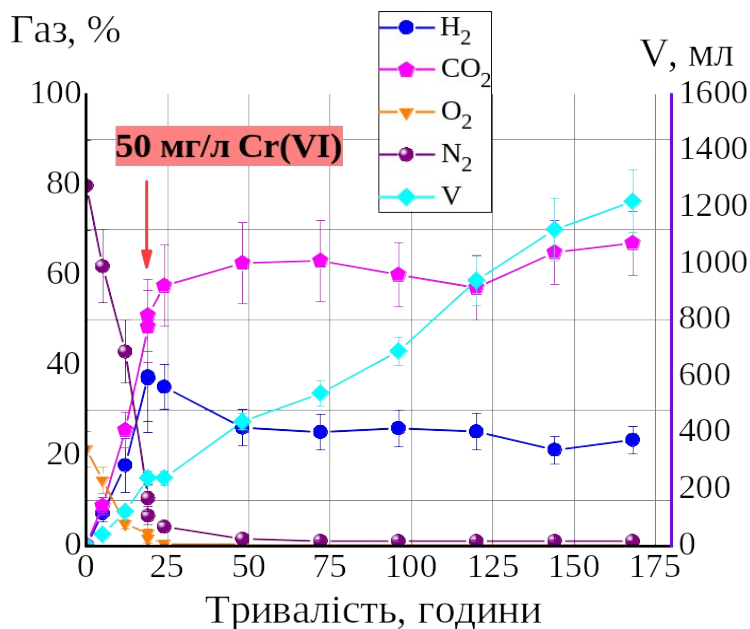


б

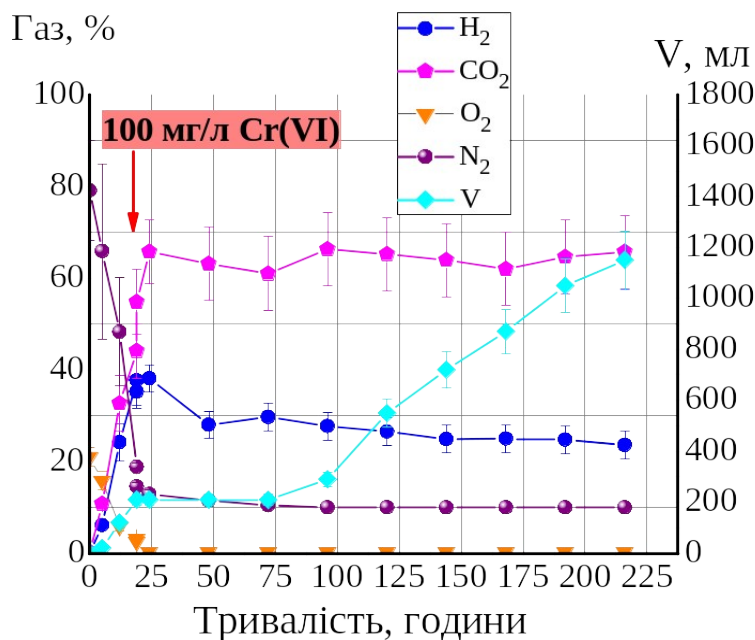
Рис. 3.7. Вплив певних концентрацій Cr(VI) на метаболічну активність *Clostridium butyricum* GMP1 при деструкції крохмалевмісного субстрату:

а –50 мг/л; б –100 мг/л

Вплив Cr(VI) на синтез водню був незначним. Відразу після додавання 50 мг/л хромату він зменшився лише на 0,3 % (рис. 3.8 а), при внесенні 100 мг/л Cr(VI) – на 1,4 % (рис. 3.8 б). Через 48 годин концентрація H<sub>2</sub> у газовій фазі зменшилась на 10% та 8% відповідно, порівняно з контрольною пробою [108].



а



б

Рис. 3.8. Склад газової фази під час внесення певних концентрацій Cr(VI) при деструкції крохмалевмісного субстрату *Clostridium butyricum* GMP1:

а – 50 мг/л; б – 100 мг/л

### 3.4. Ефективність біовилучення Cr(VI) анаеробним штамом *Clostridium butyricum* GMP1 за зброджування крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів

Отримані умови бродіння були оптимальними для дослідження ефективності відновлення металів, зокрема Cr(VI). За концентрації Cr(VI) 50 мг/л ефективність вилучення становила 99,6%, а швидкість вилучення – 4 години. За концентрації Cr(VI) 100 мг/л ефективність вилучення, так само, висока – 99,5%, а тривалість вилучення підвищувалася у 2,5 рази – до 10 годин (рис. 3.9). Облігатно-анаеробному штаму *Clostridium butyricum* GMP1 знадобилося всього 20 хв, щоб відновити 90 % хромату з 50 мг/л до 5 мг/л Cr(VI) та 80 % хромату зі 100 мг/л до 20 мг/л Cr(VI).

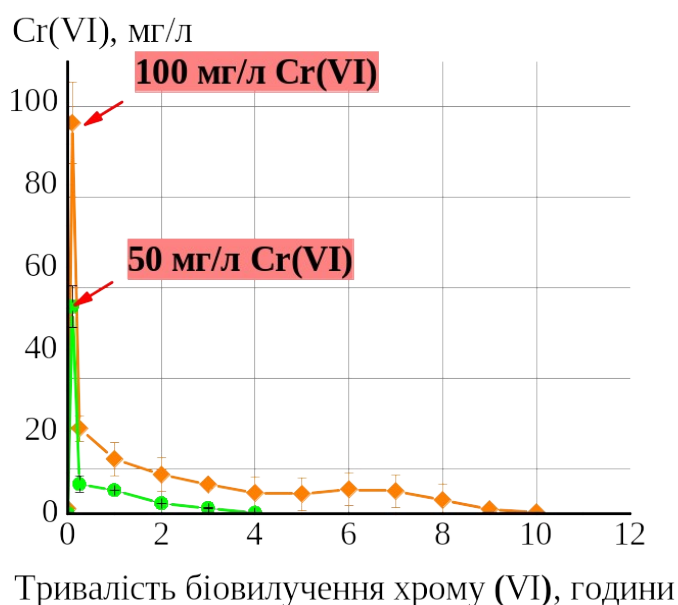


Рис. 3.9. Ефективність біовилучення Cr(VI) штамом *Clostridium butyricum* GMP1 під час деструкції крохмалевмісного субстрату

Як було термодинамічно передбачено авторами [21], високий ОВП металу давав можливість для його ефективного вилучення. Це було доведено експериментально [108].

### 3.5. Висновки до розділу

Для дослідження процесів деструкції харчових відходів та біовилучення токсичних сполук Cr(VI) використовували облигатно-анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1. Охарактеризовано властивості облигатно-анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1– деструктора овочевих та харчових відходів. Виявлено, що це грампозитивні палички, рухливі, спороутворюючі, синтезують H<sub>2</sub>, етанол, ацетат і більшу кількість бутирату за рН = 6,0-7,0; Eh= –250... –330 мВ; тривалість деструкції T = 6 діб.

Властивості облигатно-анаеробного штаму *C.butyricum* GMP1 підтвердилися при зброджуванні крохмалевмісного субстрату як моделі харчових відходів. Синтез водню інтенсивно розпочався вже через 5 годин бродіння, і досяг максимальної концентрації H<sub>2</sub> 38,1±2,0 % на 19 годину бродіння за рН=5,5 і Eh= –295 мВ.

Разом з цим, облигатно-анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1 є хромрезистентним штамом, який не тільки здатен виживати за високих концентрацій токсичних сполук Cr(VI), а й відновлювати його до нетоксичної форми Cr(III). Так, за концентрацій Cr(VI) 50 мг/л та 100 мг/л ефективність вилучення становила 99,5±1,0 %, а швидкість вилучення – 4 та 10 годин відповідно.

## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

#### **4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів**

У ході виконання експериментальної частини дипломної роботи у відділі біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного було проаналізовано умови праці в лабораторії і виділено шкідливі та небезпечні виробничі фактор, що можуть мати негативний вплив на здоров'я і працездатність людини. Згідно з ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у лабораторії діяли фізичні та хімічні небезпечні виробничі фактори. Серед фізичних небезпечних виробничих факторів слід виокремити такі як підвищена температура повітря робочої зони, підвищений рівень шуму на робочому місці, підвищений рівень ультрафіолетової радіації [109].

Основними джерелами фактору підвищення температури можна назвати роботу термостатів, автоклавів, сушильних шаф, дистиляторів та електричних плиток. Більшість цього обладнання працює протягом усього робочого дня (8 год), а термостати – цілодобово. У теплу пору року такий режим роботи вказаних приладів призводить до підвищення температури повітря робочого приміщення до 35-39°C при відносній вологості 45-60%, що негативно впливає на організм працівника [110].

Серед основних джерел шуму у приміщенні лабораторії газовий хроматограф ЛХМ-8-МД, холодильник побутовий «Gorenje», шафа сушильна електрична СШ-30 термостат електричний сухоповітряний ТС-80М,. Відповідно до ДСН 3.3.6.037-99 норма рівня звуку для приміщень, у яких проводяться висококваліфіковані роботи, вимірювальні та аналітичні роботи, становить 50 дБА [111]. Фактичне значення шуму при виконанні робіт в лабораторії перевищує встановлені норми і становить 58,9 дБА.

В ході виконання експериментальної частини дипломної роботи по дослідженню закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів використовували ультрафіолетові стерилізатори, якими оснащені ламінарні бокси у лабораторії. Допустимі значення густини УФ-променів для діапазону 220 – 280 нм становлять 0,001 Вт/м<sup>2</sup>.

До хімічних речовин, що застосовувалися працівником згідно з ГОСТ 12.0.003-74 належать токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. До них відноситься спирт етиловий, що застосовували для дезінфекції інструментів і робочих поверхонь у ході проведення дослідів. Його відносять до 4-го класу небезпеки. За ГОСТ 12.1.005-88 гранично допустима концентрація етилового спирту у повітрі робочої зони становить 1000 мг/м<sup>3</sup> [112].

#### **4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів**

За умов використання відповідного комплексу заходів та способів, до яких відносять санітарно-технічні, будівельно-планувальні, організаційно-технологічні та ін. заходи колективного захисту, у лабораторії проводиться нормалізація несприятливих умов мікроклімату.

Для оптимізації значень температури на робочих місцях, які мають відповідати вимогам ДСН 3.3.6.042-99, проводиться раціональне планування приміщення і відповідне розміщення в лабораторії устаткування залежно від їх тепло-, холодо- та вологовиділення. З метою зменшення термічного навантаження на працівників передбачається максимальна механізація, автоматизація та дистанційне управління технологічними процесами і устаткуванням.

Зважаючи на значну площу закслених поверхонь для зниження впливу підвищених температур у лабораторіях впроваджують відповідні заходи, спрямовані на захист від перегрівання при потраплянні прямих сонячних променів в теплий

період року. Під час підвищення температури внутрішніх поверхонь огорожуючих конструкцій до рівня, що перевищує допустимі норми, робочі місця віддаляють від таких конструкцій на відстань більше 1 м.

Для виробничих приміщень, в яких спостерігається явний надлишок тепла передбачається використання природної вентиляції (аерації) з розташуванням аераційних ліхтарів та шахт безпосередньо на одній осі над основними джерелами. У випадку, якщо такий варіант є не ефективним або неможливим, передбачають встановлення механічної загальнообмінної вентиляції. За наявності у лабораторії одиничних джерел тепловиділень, проводиться оснащення обладнання локальною витяжною вентиляцією у вигляді відповідних відсмоктувачів, витяжних зонтів та ін.

Відповідно до вимог, в лабораторіях відділу біології екстремофільних мікроорганізмів наявна система вентиляції, у вигляді загальнообмінних витяжних вентиляцій та місцевих вентиляційних систем, що передбачає використання витяжних шаф. З метою підтримування комфортних умов праці в лабораторії в теплу пору року використовується система кондиціонування. Такі системи вентиляції забезпечують підтримування відповідних до вимог ДСН 3.3.6.042-99 значень температур та вологості повітря. Також з метою забезпечення уникнення теплового опромінювання працівників сушильна шафа та термостат оснащені відповідною термоізоляцією.

Для забезпечення відповідного рівня шуму, які відповідають ГОСТ 12.1.029-80 в лабораторіях відділу біології екстремофільних мікроорганізмів передбачене застосування колективних та індивідуальних заходів та засобів захисту [113]. Засоби індивідуального захисту від шуму використовуються з метою перекривання найбільш чутливих каналів проникнення звуку в організм – вуха. Ці засоби забезпечують попередження розладів нервової системи, що можуть виникати в результаті дії інтенсивного подразника, яким є шум. Серед засобів захисту від шуму найбільш широкоживаними є навушники, протишумові вкладки та шумозаглушувальні шоломи.

В лабораторіях відділу біології екстремофільних мікроорганізмів колективний захист від негативного впливу шуму забезпечують за рахунок організаційно-

технічних заходів. Такі заходи забезпечуються дотриманням правил технічної експлуатації, проведенням планово-попереджувальних оглядів та ремонтів, а також віддалене розташування обладнання від робочих місць. Також, для забезпечення відповідного рівня шуму в лабораторії пропонується ввести додаткові акустичні заходи – звукоізоляція та звукопоглинання (встановлення звукоізоляційних кожухів).

Під час роботи УФ-стерилізатора робота в боксі не проводиться. З метою нейтралізації шкідливого впливу використовують захисний екран або спеціальні захисні маски для забезпечення захисту від опіків шкіри та слизової очей, що може викликати УФ-випромінювання. З метою зниження шкідливого впливу УФ-випромінювання при ввімкнених УФ-лампах застосовується екранування джерела УФ променів флінтгласом [114].

Також співробітникам лабораторії додатково рекомендовано застосовувати мазей, до складу яких входять речовини-світлофільтри. В лабораторіях відділу біології екстремофільних мікроорганізмів передбачено застосування відповідних засобів захисту від УФ-випромінювання. У разі використання спецодягу та засобів захисту обличчя, рук, які не пропускають випромінювання (шкіра, тканини з плівковим покриттям тощо), допустима інтенсивність в області і УФ-С не повинна перевищувати  $1 \text{ Вт/м}^2$  [114].

З метою захисту працівників від несприятливого впливу хімічних речовин у лабораторіях відділу біології екстремофільних мікроорганізмів необхідно здійснювати наступні заходи:

- удосконалювати і розробляти нові технологічні процеси, які не передбачають використання шкідливих хімічних речовин;
- за можливості замінювати шкідливі речовини менш шкідливими;
- встановлювати концентрації хімічних речовин у сумішах;
- проводити комплексну механізацію та автоматизацію процесів, що супроводжуються шкідливими виділеннями;
- працювати з шкідливими речовинами з використанням місцевої вентиляції для їх відсмоктування безпосередньо від місця утворення;



- використовувати індивідуальні засоби (спецодяг, окуляри, шоломи, маски, протигази та респіратори, антисептичні пасти і т. д.);
- контролювати стан повітряного середовища на робочих місцях;
- проводити періодичні профілактичні медичні огляди.

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 [115]. Мінімальне число персоналу в лабораторії при виконанні небезпечних робіт та вночі повинне бути не менше двох осіб.

Нижче представлено розрахунок загальнообмінної вентиляції для нормалізації температури робочого приміщення – лабораторії відділу біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного. Особливо небезпечним та шкідливим виробничим фактором є підвищення температурного режиму робочих приміщень. У лабораторії відділу біології екстремофільних мікроорганізмів основна частина дослідницької роботи проходила у теплу пору року. Основними джерелами цього фактору в лабораторії були термостат, сушильна шафа, дистилятор, автоклав та електричні плити. У теплу пору року інтенсивний режим роботи вище вказаних приладів призводила до підвищення температури повітря робочого приміщення до 35–39°C при відносній вологості 45% – 60%. Це негативно впливає на організм працівників лабораторії.

Відомо, що інтенсивність теплового опромінення відносно працюючих від відкритих джерел (нагрітий метал, скло, «відкрите» полум'я та ін.) не повинна перевищувати 140 Вт/м<sup>2</sup> [116]. З огляду на те, що у лабораторії наявні щонайменше 5 джерел додаткового тепловиділення, ми можемо розрахувати повітрообмін ( $L_n$ ) для забезпечення нормалізації температурного режиму робочого приміщення.

У випадку вирішення проблеми надмірного тепла на робочому місці необхідний повітрообмін визначається, виходячи з умов асиміляції теплових надлишків об'ємом повітря, що подається, м<sup>3</sup>/год [117].

$$L_n = \frac{Q_{\text{надл}}}{c \cdot \rho_{\text{пр}} \cdot (t_{\text{вид}} - t_{\text{пр}})}, \quad (4.1)$$

де  $Q_{\text{надл}}$  – надлишкові тепловиділення, Вт;

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

$\rho_{\text{пр}}$  – густина припливного повітря, в розрахунках беремо 1,4 кг/м<sup>3</sup>;

$t_{\text{вид}}$  – температура повітря, яке видаляється з приміщення, °К;

$t_{\text{пр}}$  – температура повітря, яке подається в приміщення, °К.

Зважаючи на індивідуальні значення джерел додаткового тепловиділення у лабораторії сумарне значення  $Q_{\text{надл}}$  становить 65 Вт, що дорівнює 234000 Дж. Температура повітря, яке видаляється з приміщення ( $t_{\text{вид}}$ ) – 39 °С або 312,15 °К, температура повітря, яке подається в приміщення ( $t_{\text{пр}}$ ) – 20 °С або 293,15 °К. Розрахуємо необхідний повітрообмін  $L_n$ , що забезпечить оптимальні умови праці.

$$L_n = \frac{Q_{\text{надл}}}{c \cdot \rho_{\text{пр}} \cdot (t_{\text{вид}} - t_{\text{пр}})} = \frac{234000}{1,01 \cdot 1,4 \cdot (312,15 - 293,15)} = 8709,89 \quad \text{м}^3/\text{год}$$

Під час виконання науково-дослідних робіт, зважаючи на невеликий об'єм приміщення лабораторії, необхідною та достатньою умовою успішної роботи є забезпечення приміщення системою кондиціонування повітря з індивідуальним регулюванням температури та об'єму повітря, що подається.

#### **4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки під час дослідженні закономірностей процесу одночасної деструкції харчових відходів та мікробного вилучення хроматів**

У ході виконання експериментальної частини дипломної роботи у лабораторії відділу біології екстремофільних мікроорганізмів можливе виникнення різних джерел пожежі: перенавантаження електричного обладнання (холодильник, автоклав, ламінарний бокс) та пошкодження електропроводки; займання легкоокисних органічних та неорганічних речовин, контакт з вогнем або з окисниками внаслідок порушення правил зберігання легкозаймистих речовин, використання відкритого полум'я, прямий удар блискавки в будівлю [118].

Під час роботи з газовим пальником можливе «проскакування» полум'я, що може призвести до загоряння ватно-марлевих або гумових пробок чи інших предметів чи легкозаймистих речовин. Можливе загоряння паперу, в ході процесу стерилізації посуду в сухожаровій шафі.

На випадок пожежі у робочому приміщенні у відповідних місцях завжди повинні бути вогнегасник; пожежний рукав; шухляда з піском; азбестова ковдра; 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 відділу біології екстремофільних мікроорганізмів 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 захищуваного 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 відділу біології екстремофільних мікроорганізмів:

- приміщення з різною пожежною небезпекою розділені протипожежними перегородками з гіпсокартону із заповненням мінеральними плитами (межа 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 [119].

#### **4.4. Висновки до розділу**

У ході виконання експериментальної частини дипломної роботи у відділі біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного було проаналізовано умови праці в лабораторії і виділено шкідливі та небезпечні виробничі фактори, що можуть мати негативний вплив на здоров'я і

працездатність людини. Визначено, що згідно з ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у лабораторії діяли фізичні (підвищена температура повітря робочої зони, підвищений рівень шуму на робочому місці, підвищений рівень ультрафіолетової радіації) та хімічні (токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори) небезпечні виробничі фактори.

Запропоновано розрахунок загальнообмінної вентиляції для нормалізації температури робочого приміщення – лабораторії відділу біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного. Розрахований повітрообмін становить 8709,89 м<sup>3</sup>/год.

## РОЗДІЛ 5

### ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

#### 5.1. Наслідки забруднення навколишнього середовища хроматами

Важкі метали, зокрема сполуки хроматів, є одними з найнебезпечніших токсикантів. Не зважаючи на це кількість сполук хрому(VI), що викидаються в навколишнє середовище, постійно збільшується внаслідок промислової діяльності та технологічних розробок, створюючи значну загрозу навколишньому середовищу та здоров'ю населення через їх токсичність, накопичення в харчовому ланцюзі та стійкість у природі [120].

Серед джерел забруднення хрому цемент, лаки, фарби та пігменти, барвники, батареї, поліграфічна продукція, відходи виробництва вогнетривкої цегли, відходи шкіряної промисловості, відходи хімічної промисловості, металургійного шлаку, шламу стічних вод, відходи виробництва керамічної продукції, відходи виробництва електронних пристроїв, металу виробу з нержавіючої сталі, гальванічні відходи. Хромати потрапляють в водойми, ґрунт, проникають в тканини рослин, де довгий час здатен акумуляватися. Зважаючи на ці фактори встановлюються суворі норми щодо скиду стоків, в яких він міститься у поверхневій воді [121].

Більшість країн, включаючи країни Європейського Союзу, запровадили максимально дозвану межу загальної кількості хрому в поверхневих та питних водах на рівні 0,05 мг/л. Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) з урахуванням проблем людини та довкілля встановлений максимальний рівень шестивалентного хрому в системі підземних вод 50 мг/л [122].

Особливо негативний вплив сполуки хрому(VI) проявляють у водному середовищі через їх високу розчинність. Після надходження до водних об'єктів хромати не усуваються, а лише перерозподіляються між компонентами водних екосистем. Надлишковий вміст Cr(VI) порушує процеси життєдіяльності організмів і загалом пригнічує виробничі процеси у водних екосистемах [123]. Вміст його у водних об'єктах

змінюється залежно від деяких екологічних факторів: рН, наявності окисників, температури води, типу донних відкладень та ґрунту тощо [124]. Тому забруднення водного середовища, спричинене антропогенною діяльністю, є глобальним процесом.

Так, в штаті Колорадо в результаті техногенної аварії відбулося забруднення однієї з найбільш мальовничих річок Анімас (рис. 5.1) [125]. Токсична вода, насичена важкими металами, зокрема хромом, вилилась в річку з численних покинутих шахт.



а

б

Рис. 5.1. Річка Анімас штат Колорадо: до (а) та після (б) забруднення

У день аварії було проведено розслідування на покинутій шахті приблизно за 50 миль на північ від місця забруднення. З'ясувалося, що з шахти під назвою Золотий король, що була занедбана майже століття, протягом багатьох років витікала токсична вода зі швидкістю від 50 до 250 галонів на хвилину. Агентство планувало знайти джерело витіку в надії одного разу його затримати. Натомість, коли робітники використовували екскаватор для злому вільного матеріалу, несподіваний потоп помаранчевої води прорвався. Зараз річка закрита на невизначений час, а людей застерігають триматися від неї подалі [125].

Серйозна аварія із забрудненням шлаком Cr відбулася 13 серпня 2011 року в місті Квінг в провінції Юньнань. Причиною цієї аварії став незаконний скид в гори та річку Наньпан, розташовану біля джерела річки Чжуцзянь 5000 тонн необробленого Cr-шлаку, виробленого компанією Lvliang Chemical Industry Co., Ltd., (рис. 5.2). Це призвело до перевищення концентрації Cr(VI) в річці Наньпан, приблизно в 2000 разів. Вплив шлаку

Cr на навколишнє середовище та здоров'я людей після такої катастрофи триватиме довгі роки. В селі Сінрон, що є найближчим до хімічної промисловості, його також називають «мертвим селом», зросла кількість людей, хворих раком, а через споживання забрудненої хроматами водою загинули загалом 77 корів та овець [120].



Рис. 5.2. Річка, забруднена шлаком Cr, виробленого компанією Lvliang Chemical Industry Co., Ltd. (колір води став жовтим)

Схожа ситуація склалася в Актюбинській області (Казахстан) [126]. Цей регіон є одним з найважливіших промислових регіонів країни, де на протязі довгих років активно функціонують підприємства, що спеціалізуються на добуванні і переробці хромвмісних руд. Розвиток промисловості привів до деградації навколишнього середовища, що різко відобразилось на стані здоров'я населення. Згідно з думкою казахстанських дослідників, на території області сформувалась стійка біохімічна провінція, що призвело до підвищення рівня поширення хроматів.

Через атмосферне повітря і талу воду можливо забруднення сполуками хрому ґрунту і рослин, вирощених на ньому. Це стало причиною підвищення рівня захворюваності органів дихання, травлення, злоякісними пухлинами, гастритами, пневмонією, бронхітом, а також порушення імунітету і обміну речовин.

Крім токсичного впливу на метаболічні процеси живих організмів, з'єднання Cr(VI) є генотоксичними через їх високу розчинність у воді. Вони спричиняють пошкодження та реплікацію ДНК, мутацію генів, хромосомні аномалії. Внутрішньоклітинне відновлення шестивалентного хрому призводить до утворення



реактивних проміжних сполук Cr(V) та Cr(IV), а також вільних гідроксил радикалів [3].

Це обумовлює необхідність розробки екологічних технологій, які використовували б невикористаний потенціал біологічного світу для відновлення контамінованих середовищ, що містять Cr(VI).

## **5.2. Рівень біологічної безпеки при мікробному вилученні хроматів з харчових відходів**

Експериментальну частину дипломної роботи виконували на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України у відділі біології екстремофільних мікроорганізмів. Для дослідження біовилучення хроматів та деструкції харчових відходів використовували облигатно-анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1. Цей штам відноситься до непатогенних мікроорганізмів. Загалом, бактерії виду *C. butyricum* є мешканцями ґрунту, а також поширені в прокислому молоці та сирах.

Зважаючи на вищесказане, при мікробному вилученні хроматів встановлюється перший рівень біологічної безпеки (BSL-1). Перший рівень біологічної безпеки передбачає роботу із досить добре вивченими, які не викликають захворювань і є максимально безпечними щодо персоналу лабораторії й навколишнього середовища. Лабораторії можуть бути не відокремлені від загальних схем руху в будівлі, а роботу зазвичай виконують на відкритих столах, використовуючи стандартні мікробіологічні методи. Для персоналу лабораторії передбачається проходження спеціальної підготовки для виконання мікробіологічних досліджень у лабораторії, а студенти можуть проводити всі маніпуляції виключно під наглядом викладача або працівника лабораторії, який має освіту в галузі мікробіології [127].

Під час роботи у BSL-1-лабораторіях працівники повинні дотримуватися загальних гігієнічних заходів:

- обов'язковим пунктом є наявність медичного халату;
- дозволено взувати лише закрите взуття;
- у ході виконання маніпуляцій, під час проведення яких, можливе утворення інфікованих бризок, слід застосовувати захисні окуляри або екрани;
- під час роботи з мікроорганізмами, а також з небезпечними хімічними речовинами необхідно одягати рукавички. У випадку проведення стандартних лабораторних процедур за умови дотримання правил гігієни рукавички дозволено не використовувати. Правильна гігієна рук передбачає ретельне миття водою з милом або обробленням спиртом [127].

Також працівники мають дотримуватись стандартних правил роботи в лабораторії [128]:

- мити руки ввійшовши в лабораторію та виходячи з неї;
- довге волосся має бути зібране у хвостик або гульку;
- у лабораторії забороняється носіння звисаючих прикрас;
- перед експериментальною роботою та після неї за допомогою відповідного засобу необхідно продезінфікувати робочий стіл;
- використання дезінфікуючих засобів необхідно здійснювати згідно з інструкціями виробника;
- забороняється заносити у лабораторію їжу, напої (включаючи воду) чи пляшки з водою;
- забороняється користуватися особистими речами (косметика, мобільні телефони, калькулятори, ручки і т.д.);
- забороняється піпетувати за допомогою рота;
- необхідно чітко маркувати всі контейнери і лабораторний посуд;
- під час роботи слід мінімізувати використання гострих предметів та використовувати їх відповідно до правил безпеки;

– слід застосовувати відповідне приладдя (лабораторні штативи для пробірок) під час перенесення культур у лабораторії; зберігання штативів з пробірками після завершення роботи з ними слід проводити у захищених від протікання контейнерах;

– з метою зберігання чи транспортування культур, що є збудниками інфекцій слід використовувати спеціальні герметичні контейнери;

– необхідно організувати відповідне (безпечне) знезараження та переробку зараженого матеріалу або організувати ліцензовану утилізацію відходів відповідно до локальних та державних норм та правил;

– прибирання розбитого скла слід виконувати за допомогою віника (щітки) і лопатки, забороняється торкатись осколків пальцями;

– дозволено використовувати виключно лабораторне письмове приладдя;

– працівникам (студентам), що мають пригнічений імунітет (у тому числі вагітним та тим, що планують завагітніти), а також тим, які проживають з такою особою або піклуються про неї, рекомендовано проконсультуватися з лікарем для визначення безпечної для них міри участі у лабораторній роботі;

– рекомендовано розділяти час для конспектування та обговорення і роботу з небезпечними або інфекційними матеріалами;

– рекомендовано використовувати мікропальники або одноразові петлі замість пальників Бунзена.

Відповідно до робіт у BSL-1-лабораторіях встановлюються вимоги до приміщень лабораторії [127, 128]:

– підлога, стіни та поверхні усіх меблів у лабораторії повинні бути виготовлені з непористого матеріалу і бути гладкими і непошкодженими;

– лабораторія повинна бути забезпечена необхідною кількістю раковин для вмивання та миття рук.

– двері лабораторії повинні замикатися;

– важливим є запобігання потраплянню в лабораторію шкідників;

– особисті речі повинні зберігатися поза межами робочої зони;

– серед обов'язкового обладнання в лабораторії повинен бути автоклав.

Вимоги до культур мікроорганізмів [127, 128]:

– дозволено використання виключно культури, отримані з референтних лабораторій або інших надійних джерел;

– заборонено культивувати невідомі мікроорганізми, оскільки вони можуть вимагати практики та обладнання BSL-2;

– необхідно зберігати документацію на культури, джерела їхнього походження і правила поводження з ними;

– щороку пересівати свіжі культури мікроорганізмів для, мінімізування спонтанних мутацій та забруднення сторонніми організмами.

Кожен працівник лабораторії в обов'язковому порядку повинен пройти інструктажі з техніки безпеки. Вимоги щодо інструктажу [127, 128]:

– інструктори і асистенти з питань техніки безпеки повинні бути працівниками установи та підпорядковуватися світовим, державним та локальним нормам з охорони здоров'я;

– необхідно проводити для інструкторів та асистентів інструктаж щодо небезпек роботи у конкретній лабораторії;

– проводити інструктаж з техніки безпеки повинен той працівник, що відповідає за біобезпеку в установі;

– за умов зміни лабораторних процедур, необхідно проводити навчання інструкторів;

– необхідно кожного року проводити інструктажі асистентів;

– слід вимагати від працівників (студентів) безпечного та відповідального поводження з мікроорганізмами;

– необхідно інформувати студентів щодо правил техніки безпеки кожної роботи перед початком цієї роботи;

– важливо наголошувати студентам про те, що важливо повідомляти про всі випадкові витoki матеріалів та травми.

### 5.3. Висновки до розділу

Хромати є одними з найнебезпечніших токсикантів. Постійно зростає кількість сполук хрому(VI), що викидаються в навколишнє середовище, постійно збільшується внаслідок промислової діяльності та технологічних розробок, створюючи значну загрозу навколишньому середовищу та здоров'ю населення через їх токсичність, накопичення в харчовому ланцюзі та стійкість у природі. Хромати спричиняють токсичну та мутагенну дію на живі організми.

Для дослідження біовилучення хроматів та деструкції харчових відходів використовували облігатно-анаеробний штам *Clostridium butyricum* GMP1. Цей штам відноситься до непатогенних мікроорганізмів. Тому при мікробному вилученні хроматів встановлюється перший рівень біологічної безпеки (BSL-1).

## ВИСНОВКИ

1. За літературними джерелами з'ясовано, що хром є одним з найбільш токсичних металів та згубно діє на живі організми. За теорією термодинамічного прогнозування трансформації важких металів було спрогнозовано не тільки існування мікроорганізмів, стійких до високих концентрацій іонів  $\text{Cr}^{6+}$ , а й здатних до біоремедіації  $\text{Cr(VI)}$  з середовищ шляхом відновлення його до нерозчинного, нетоксичного  $\text{Cr(III)}$ ↓. Виявлено, що резистентність бактеріальної клітини до  $\text{Cr(VI)}$  забезпечується фізіологічними (біоаккумуляція та біотрансформація) та генетичними механізмами. Виявлено різні таксономічні групи мікроорганізмів (бактерії, гриби, актиноміцети) здатні до ефективного видалення  $\text{Cr(VI)}$  у концентрації від 100 до 700 мг/л. Бактерії родів *Streptococcus* spp. PZ2, *Streptococcus* spp. PZ4 та *Bacillus* spp. PZ3 здатні акумулювати найбільші високі концентрації  $\text{Cr(VI)}$  – 600-700 мг/л, що робить можливим їх застосування в природоохоронних технологіях.

2. Досліджено метаболічну активність облигатно-анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1, який активно зброджує крохмалевмісний субстрат як модель харчових відходів, з інтенсивним виділенням водню (до 40% у газовій фазі). Оптимальними умовами для синтезу водню є  $\text{pH} = 6,0 \pm 5$  і  $E_h = -290 \pm 10$  мВ, тривалість деструкції субстрату 5-6 діб.

3. Одночасно з бродінням харчових відходів, з'ясовано зміни метаболічної активності облигатно-анаеробного штаму *Clostridium butyricum* GMP1 за додавання у реактор 50 та 100 мг/л хроматів (VI). Визначено, що після внесення хроматів  $E_h$  різко збільшився з  $-290$  мВ до  $+50$  мВ (50 мг/л) та з  $-276$  мВ до  $+192$  мВ (100 мг/л). Виявлено інгібування частки водню у газовій фазі на  $10 \pm 2\%$ , тривалість деструкції субстрату 6 діб та 10 діб відповідно.

4. Ефективність біовилучення хроматів облигатно-анаеробним штамом *Clostridium butyricum* GMP1 за концентрації 50 та 100 мг/л становило  $99,5 \pm 0,1\%$ , а швидкість вилучення  $\text{Cr(VI)}$  за концентрації 50 мг/л менша у 2,5 рази – 4 години, у порівнянні з концентрацією  $\text{Cr(VI)}$  100 мг/л – до 10 годин.

5. Результати роботи можливо використовувати у безвітходних природоохоронних технологіях для одночасного отримання екологічно чистого енергоносія – водню, при зброджуванні харчових відходів анаеробними мікроорганізмами-деструкторами та у вилученні сполук токсичного хрому (VI) при біоремедіації ґрунтів або очищенні стічних вод хромрезистентними мікроорганізмами. А також, при викладанні дисциплін: «Нові тенденції в природоохоронних біотехнології», «Екстремофільні мікроорганізми в біотехнології».

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

### ДЖЕРЕЛ

1. Gutierrez-Corona J. F. Microbial interactions with chromium: basic biological processes and applications in environmental biotechnology / J. F. Gutierrez-Corona, P. Romo-Rodriguez, F. Santos-Escobar, A.E. Espino-Saldan~a, H. Hernandez-Escoto // World J Microbiol Biotechnol, 2016. – Vol. 32, № 191. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2150-0>

2. Badawy W. Assessment of industrial contamination of agricultural soil adjacent to Sadat City, Egypt. / W. Badawy, O. Y. Chepurchenko, H. El Samman, M. V. Frontasyeva // Ecological Chemistry and Engineering S, 2016. – Vol. 23, № 2. – P. 297-310. DOI: <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0021>

3. Mishra S. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies / S. Mishra, N.R. Bharagava // Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2016. – Vol.34, №1. – P. 1-32. DOI: <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1096883>

4. Ishchenko V. Environment contamination with heavy metals contained in waste. / V. Ishchenko // Environmental problems, 2018. – Vol. 3, №. 1. – Режим доступу: <http://ir.lib.vntu.edu.ua/handle/123456789/22840>

5. Vendruscolo F. Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms / F. Vendruscolo, G. L. d. R. Ferreira, N. R. A. Filho // International Biodeterioration & Biodegradation, 2016. – Vol. 119. – P. 87-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.008>

6. Gong Y.-F. Comparison of Cr(VI) removal by activated sludge and dissolved organic matter (DOM): importance of UV light / Y.-F. Gong, J. Song, H.-T. Ren, X. Han // Environ Sci Pollut Res, 2015. – Vol. 22. – P. 18487–18494. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5182-3>

7. Fernandez P. M. Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives / P.M. Fernandez, S.C. Vinarta, A.R.



Bernal, Cruz E. L., L. I. C. Figueroa // *Chemosphere*, 2018. – Vol. 208. – P. 139-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.166>

8. Wang Y. Structural and Genetic Diversity of Hexavalent Chromium-Resistant Bacteria in Contaminated Soil. / Y. Wang, L. Chai, Q. Liao, C. Tang, Y. Liao, B. Peng, Z. Yang // *Geomicrobiology Journal*, 2016. – Vol. 33, №3-4. – P. 222-229. DOI: <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1054006>

9. Wang P. Isolation and Characterization of Heavy Metal-Resistant Bacterias Capable of Removing Cr(VI) / P. Wang, Y. Ma, C. Wang, S. Zhang, S. Cheng // *Polish Journal of Environmental Studies*, 2015. – Vol. 24, №. 1. – P. 339-345

10. Joutey N.T. Mechanisms of Hexavalent Chromium Resistance and Removal by Microorganisms / N.T. Joutey, H. Sayel, W. Bahafid, N. El Ghachtouli // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015. – Vol. 233. – P. 46-63. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9_2)

11. Планеті загрожує катастрофа через харчові відходи. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: URL: [https://zik.ua/news/2018/10/24/planeti\\_zagrozhuie\\_katastrofa\\_cherez\\_harchovi\\_vidhody\\_1432949](https://zik.ua/news/2018/10/24/planeti_zagrozhuie_katastrofa_cherez_harchovi_vidhody_1432949).

12. Сагдєєва О. А. Дослідження процесів компостування харчової складової твердих побутових відходів / О.А. Сагдєєва, Г.В. Крусір, А.Л. Цикало, Г. Лойєнбергер // *Науково-технічний журнал «Техногенно-екологічна безпека»*. 2018. – № 4. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1244572>

13. Буяльська Н. П. Неорганічна хімія. Конспект лекцій для студентів напрямів підготовки: 6.030510 – "Товарознавство і торговельне підприємництво", 6.070106 – "Автомобільний транспорт", 6.051801 – "Деревооброблювальні технології", 6.091302 – "Метрологія та вимірювальна техніка" / Н.П. Буяльська // Чернігів: ЧДТУ, 2012. – 191 с. Режим доступу: [https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/neorg\\_him\\_konspekt/index.html](https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/neorg_him_konspekt/index.html)

14. Садогурська К.В. Хром і нанохром: властивості, перспективи застосування у медичній практиці. / К.В. Садогурська, В.Г. Каплуненко, І.С. Чекман // *Український медичний часопис*, – 2014. – № 1. – С. 14-16. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/UMCh\\_2014\\_1\\_4](http://nbuv.gov.ua/UJRN/UMCh_2014_1_4)

15. Смирнова Г.Ф. Особенности метаболизма бактерий, устойчивых к высоким концентрациям хроматов / Г.Ф. Смирнова, В.С. Подгорский // Мікробіологічний журнал, 2013. – Т. 75, № 2. – С. 3–9. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol\\_2013\\_75\\_2\\_2](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2013_75_2_2).

16. Степаненко О.М. Загальна та неорганічна хімія / О.М. Степаненко, Л.Г. Рейтер, В.М. Ледовських, С.В. Іванов // Підруч. для студ. вищ. навч. закл. ВТФ Перун. Ірпінь, 2004. – 479 с. URI: <http://er.nau.edu.ua/handle/NAU/16542>

17. Прикладна хімія. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://kofanova.pp.ua/phim-2-5-2.html>

18. Удодов І.О. Перехідні метали: Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / І.О. Удодов, В.В. Приседський // Донецьк: Вид-во НТМТ, 2016. – 167 с. Режим доступу: <http://koh.feht.donntu.org/sites/default/files/images/met.pdf>

19. 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. URI: <http://dSPACE.nbuv.gov.ua/handle/123456789/4142>

20. Таширев А. Б. Экспериментальное обоснование термодинамического прогнозирования редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями ( $Hg^{2+}CrO_4^{2-}$  и  $Cu^{2+}$ ) / А. Б. Таширев, Н. А. Матвеева, А. А. Таширева, В. А. Романовская // Доповіді Національної академії наук України, 2008. – № 5. – С. 174-180. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/dnanu\\_2008\\_5\\_32](http://nbuv.gov.ua/UJRN/dnanu_2008_5_32)

21. Сіома І. Б. Знешкодження токсичного хромату під час збродження екологічно небезпечних харчових відходів ґрунтовими мікроорганізмами / І. Б. Сіома, О. Б. Таширев // Вісник аграрної науки, 2015. – № 7. – С. 49-53. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vaan\\_2015\\_7\\_12](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vaan_2015_7_12)

22. Rizvi F.Z. Chromate-Reducing Profile of Bacterial Strains Isolated from Industrial Effluents / F.Z. Rizvi, W. Kanwal, M. Faisal // Pol. J. Environ. Stud, 2016. – Vol. 25, №. 5. – P. 2121-2128. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/61881>

23. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies / S. Mishra, N.R. Bharagava // Journal of Environmental Science and Health, Part C., 2016. – Vol.34, №1. – P. 1-32. DOI: <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1096883>

24. Шоляк К. В. Поширення хромрезистентних мікроорганізмів у стічних водах / К. В. Шоляк, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь // Агроекологічний журнал, 2013. – № 3. – С. 81-85. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/agrog\\_2013\\_3\\_17](http://nbuv.gov.ua/UJRN/agrog_2013_3_17).

25. Elahi A. Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater / A. Elahi, I. Arooj, D.A. Bukhari, A. Rehman // Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. –№104. – P. 3729–3743. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10533-y>

26. Viti C. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi / C.Viti, E. Marchi, F. Decorosi, L. Giovannetti // Microbiology reviews. – 2014. – Vol.38. – P. 633–659. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12051>

27. Tashyrev O. Autecology and taxonomy of bacteria isolated from extreme environments / O. Tashyrev, V. Romanovskaya, P. Rokitko, H. Tashyreva, I. Prytula, O. Suslova, V. Govorukha, Ie. Prekrasna, G. Gladka // Мікробіологічний журнал, – 2017. – т. 79, № 1. – С. 100-113.

28. Thatoi H. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review / H. Thatoi, S. Das, J. Mishra, B.P. Rath, N. Das // Journal of Environmental Management, 2014. – Vol. 146. – P. 383-399. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>

29. Ramirez-Díaz M. I. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds / M. I. Ramirez-Díaz, C. Díaz-Perez, E. Vargas // Biometals, 2008. – Vol. 21. – P. 321–332. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>

30. Enhancement of toxic Cr(VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. / A. K. Nayak, S. S. Panda, A. Basu, A. Dhal // International Journal of Phytoremediation, 2018. – Vol. 20, № 7. – P. 682–691. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1413332>

31. Pan X., Investigation of Cr(VI) reduction and Cr(III) immobilization mechanism by planktonic cells and biofilms of *Bacillus subtilis* ATCC-6633 / X. Pan, Z. Liu, Z. Chen, Y. Cheng, D. Pan, J. Shao, Z. Lin, X. Guan // *Water Research*, 2014. DOI: <http://www.10.1016/j.watres.2014.01.066>
32. Viti C. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi / C. Viti, E. Marchi, F. Decorosi, L. Giovannetti // *Microbiology reviews*, 2014. – Vol. 38. – P. 633–659 DOI: <http://www.10.1111/1574-6976.12051>
33. Robins K. J. *Escherichia coli* Nem Is an Efficient Chromate Reductase That Can Be Biologically Immobilized to Provide a Cell Free System for Remediation of Hexavalent Chromium / Robins K.J., Hooks D. O., Rehm B.H.A., David F. // *PLoS ONE*. 2013. – Vol. 8, № 3. DOI: <http://www.10.1371/journal.pone.0059200>
34. Bhattacharya A. Alleviation of hexavalent chromium by using microorganisms: insight into the strategies and complications / A. Bhattacharya, A. Gupta, A. Kaur, D. Malik // *Water Science & Technology*, 2019. DOI: <http://www.10.2166/wst.2019.060>
35. Huang Y. A thorough survey for Cr-resistant and/or -reducing bacteria identified comprehensive and pivotal taxa / Y. Huang, H. Feng, H. Lu, Y. Zeng // *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017. – Vol. 117. – P. 22-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.010>
36. Chang F. Discrepant hexavalent chromium tolerance and detoxification by two strains of *Trichoderma asperellum* with high homology / F. Chang, C. Tian, S. Liu, J. Ni // *Chemical Engineering Journal*, 2016. – Vol. 298. – P. 75-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.023>
37. Pattnaik S. Exploration of NPK Activity Showing Chromium Resistant Bacteria from Sukinda Mining Area / S. Pattnaik, D. Dash, D.P. Samantaray // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2017. – Vol. 6, № 12. – P. 535-542. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.065>
38. Batool R. Evaluation of Cr(VI) remediation potential of *Eichornia* sp in conjunction with chromium-resistant bacterial strains / R. Batool, T. Tabassum, M. Ali // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2017. – Vol. 16, № 5. – P. 1005-1011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v16i5.6>

39. Pramanik K. Characterization of PGP Traits of a Hexavalent Chromium Resistant *Raoultella* sp. Isolated from the Rice Field near Industrial Sewage of Burdwan District, WB, India / K. Pramanik, P. K. Ghosh, A. Ghosh, A. Sarkar, T. K. Maiti // Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 2016. – Vol. 25, № 3. – P. 313-331. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15320383.2016.1137861>
40. Rehman F. Toxic hexavalent chromium reduction by *Bacillus pumilis*, *Cellulosimicrobium cellulans* and *Exiguobacterium* / F. Rehman, M. Faisal // Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4155-1>
41. Differential expression of antioxidant enzymes under arsenic stress in *Enterobacter* sp. / R. Jobby, K. Shah, R. Shah, P. Jha, N. // Desai Environ. Prog. Sustain. Energy. 2016. – Vol. 35. – P. 1642–1645. DOI: <https://doi.org/10.1002/ep.12406>
42. Thatoi H. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review / H. Thatoi, S. Das, J. Mishra, B.P. Rath, N. Das // Journal of Environmental Management, 2014. – Vol. 146. – P. 383-399. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>
43. Malaviya P. Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters / Malaviya P., Singh A. // Critical Reviews Microbiology, Early Online, 2014. – Vol. 24. – P. 607-633. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.974501>
44. Bhattacharya A. Alleviation of hexavalent chromium by using microorganisms: insight into the strategies and complications / A. Bhattacharya, A. Gupta, A. Kaur, D. Malik // Water Science & Technology, 2019. – Vol. 79, № 3. – P. 411–424. DOI: <https://doi.org/10.2166/wst.2019.060>
45. Jobby R. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: A comprehensive review / R. Jobby, P. Jha, A. K. Yadav, N. Desai Chemosphere, 2018. – № 207. – P. 255–266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.050>
46. Matilda S.C. Metal induced changes in trivalent chromium resistant *Alcaligenes faecalis* VITSIM2 / S.C. Matilda, C. Shanthi // Journal of Basic Microbiology, 2017. – Vol.9999. – P. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201600596>

47. Sanjay M.S. Isolation and identification of chromium reducing bacteria from tannery effluent // M.S. Sanjay, D. Sudarsanam, G. A. Raj, K. Baskar // Journal of King Saud University – Science, 2020. – Vol. 32. – P. 265–271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.001>

48. Pradhan S.K. Bacterial chromate reduction: a review of important genomic, proteomic and bioinformatic analysis / S.K. Pradhan, N.R. Singh, B.P. Rath, H.N. Thatoi // Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2016. – Vol. 46. – P. 1659-1703. DOI: <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1258912>

49. Robins K. J. Escherichia coli Nem Is an Efficient Chromate Reductase That Can Be Biologically Immobilized to Provide a Cell Free System for Remediation of Hexavalent Chromium / K.J. Robins, D.O. Hooks, B.H.A. Rehm, D.F. Ackerley // PLoS ONE, 2013. – Vol.8, № 3. DOI: <http://www.10.1371/journal.pone.0059200>

50. Mohamed M.S.M. Reduction of chromium-VI by chromium-resistant *Escherichia coli* FACU: a prospective bacterium for bioremediation / M.S.M. Mohamed, N.I. El-Arabi, A. El-Hussein, S. A. El-Maaty, A. A. Abdelhadi // Folia Microbiologica, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00771-y>

51. Malaviya P. Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters / P. Malaviya, A. Singh // Critical Reviews Microbiology, Early Online, 2014. – P. 1–27. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.974501>

52. Gu Y. Mechanism of Cr(VI) reduction by *Aspergillus niger*: enzymatic characteristic, oxidative stress response, and reduction product / Y. Gu, W. Xu, Y. Liu, G. Zeng, J. Huang, X. Tan, H. Jian, X. Hu, F. Li, D. Wang // Environ Sci Pollut Res, 2014. – Vol. 22. – P. 6271–6279. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3856-x>

53. . Wani P. A. Bioreduction of Cr(VI) by Heavy Metal Resistant *Pseudomonas* Species / P.A. Wani, O.H. Ayoola // Journal of Environmental Science and Technology, 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 122-130. DOI: <https://doi.org/10.3923/jest.2015.122.130>

54. Kheirabadi M. Fast chromium removal by *Shewanella* sp.: an enzymatic mechanism depending on serine protease / M. Kheirabadi, R. Mahmoodi, N. Mollania, M. Kheirabadi // International Journal of Environmental Science and Technology, 2019. –Vol. 17. – P. 143–152. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02338-y>

55. Tahri J. N. Hexavalent chromium removal by a novel *Serratia proteamaculans* isolated from the bank of Sebou River (Morocco) / J. N. Tahri, W. Bahafid, H. Sayel, S. Ananou, N. El Ghachtouli // Environmental Science and Pollution Research, 2013. – Vol. 21, № 4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2249-x>

56. Jahan N. Molecular Identification and Characterization of Heavy Metal Resistant Bacteria and Their Role in Bioremediation of Chromium / N. Jahan, M. Idrees, M. T. Zahid, N. M. Ali, M. Hussain // British Microbiology Research Journal, 2016. – Vol. 13, №6. – P. 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2016/22909>

57. Salema A. H. Two-stage anaerobic fermentation process for bio-hydrogen and biomethane production from pre-treated organic wastes / A. H. Salema, T. Mietzela, R. Brunstermanna, R. Widmanna // Bioresource Technology, 2018. – 265. – P. 399–406 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.017>

58. Łukajtisa R. Hydrogen production from biomass using dark fermentation / R. Łukajtisa, I. Hołowacza, K. Kucharskaa, M. Glinkab, P. Rybarczyka, A. Przyjaznyc, M. Kamińska // Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018. – № 91. – P. 665–694 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>

59. Winter C. J. Into the hydrogen energy economy-milestones / C. J. Winter // Int. J. Hydrog. Energy, 2005. – 30. – P. 681–685.

60. Das D. Recent developments in biological hydrogen production processes / D. Das, N. Khanna, T. N. Veziroğlu // Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 2008. – Vol. 14, № 2. – P. 57–67.

61. Gupta S. K. Trends in biohydrogen production: major challenges and state-of-the-art developments / S. K. Gupta [et al.] // Environmental Technology, 2013. – Vol. 34, № 13–14. – P. 1653–1670.

62. Kim H. Y. A low cost production of hydrogen from carbonaceous wastes / H. Y. Kim // Int. J. Hydrogen Energy, 2003. – № 28. – P. 1179–1186.

63. Kapdan I. K. Bio-hydrogen production from waste materials / I. K. Kapdan, F. Kargi // Enzyme and Microbial Technology, 2006. – Vol. 38. – P. 569–582.

64. Тарасов Б. П. Водородная энергетика: прошлое, настоящее, виды на будущее / Б. П. Тарасов, М. В. Лотоцкий // Рос. хим. ж, 2006, Т. L, № 6. – С. 5–18.

65. Nath K. Biohydrogen production as a potential energy resource – Present state-of-art / K. Nath, D. Das // *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2004. – Vol. 63. – P. 729–738.

66. Щурська К.О. Обґрунтування параметрів біотехнологічного процесу отримання водню: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.20 / К.О. Щурська // Націонал. техн. ун-т України "Київський політехнічний інститут". – К., 2014. – 24, с.

67. Levin D. B. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application / D. B. Levin, L. Pitt, M. Love // *Int. J. Hydrog. Energy*, 2004. –Vol. 29. – P. 173–185.

68. Sen U. Status of biological hydrogen production / U. Sen, M. Shakdwipee, R. Banerjee // *Journal of scientific and industrial research*, 2008. – Vol. 67. – P. 980–83.

69. Цыганков А. А. Получение водорода биологическим путем / А. А. Цыганков // *Рос. хим. Ж*, 2006. – L, № 6. – С. 26–33.

70. Jarungrumlert T. Scaling-up bio-hydrogen production from food waste: Feasibilities and challenges / T. Jarungrumlert, C. Prommuak, N. Putmai, P. Pavasant // *International journal of hydrogen energy xxx*, 2018. – Vol. 43, I. 2. – P. 634-648 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.013>

71. Wang J. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review / J. Wang, W. Wan // *Int. J. Hydrog. Energy*, 2009. – Vol. 34, № 2.– P. 799–811.

72. Valdez-Vazquez I. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime / I. Valdez-Vazquez [et al.] // *Int. J. Hydrog. Energy*, 2005. – 30. – P. 1383–1391.

73. Chang J.-S. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors / J.-S. Chang, K.-S. Lee, P.-J. Lin // *Int. J. Hydrog. Energy*, 2002. – 27. – P. 1167–1174.

74. Chen C. C. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process / C. C. Chen, C. Y. Lin, M. C. Lin // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002. – 58. – P. 224–228.

75. Noike T. Continuous hydrogen production from organic municipal wastes / T. Noike [et al.] // *Water Science & Technology*, 2005. – Vol. 52, № 1-2. – P. 145–151.



76. Koutrouli E. C. Mesophilic biohydrogen production from olive pulp / E. C. Koutrouli [et al.] // Proc. Saf. Environ. Prot., 2006. – 84. – P. 285–289.

77. Sparling R. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters / R. Sparling, D. Risbey, H. M. Poggi-Varaldo // Int. J. Hydrog. Energy, 1997. – 22. – P. 563–566.

78. Lin C. Y. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora / C. Y. Lin, C. H. Lay // Int. J. Hydrog. Energy, 2005. – 30. – P. 285–292.

79. Khanal S. K. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products / S. K. Khanal [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2004. – 29. – P. 1123–1131.

80. Lay J.-J. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge / J.-J. Lay [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2003. – 28. – P. 1361–1367.

81. Morimoto M. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora / M. Morimoto [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2004. – № 29. – P. 709–713.

82. Матвеева Н. А. Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов / Н. А. Матвеева [та ін.] // Мікроб. журнал, 2011 – Т. 73, № 1. – С. 36–43.

83. Ntaikou I. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review / I. Ntaikou, G. Antonopoulou, G. Lyberatos // Waste Biomass Valor, 2010. – Vol. 1. – P. 21–39.

84. Chong M. L. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent / M. L. Chong [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2009. – № 34. – P. 764–771.

85. Lin P.-Y. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation / P.-Y. Lin [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2007. – № 32. – P. 1728–1735.

86. Chong M.-L. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation / M.-L. Chong [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2009. – Vol. 34, № 8. – P. 3277–3287.

87. Evvyernie D. Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen producing bacterium / D. Evvyernie [et al.] // J. Biosci. Bioeng, 2000. – 89. – P. 596–601.

88. Dabrock B. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum* / B. Dabrock, H. Bahl, G. Gottschalk // Appl. Environ. Microbiol, 1992, – Vol. 58, № 4. – P. 1233–1239.

89. Liu G. Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria / G. Liu, J. Shen // J. Biosci. Bioeng, 2004. – 98. – P. 251–256.

90. Yokoi H. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes / H. Yokoi [et al.] // Biomass Bioenergy, 2002. – 22. – P. 89–395.

91. Yokoi H. H<sub>2</sub> production from starch by mixed culture of *Clostridium buytricum* and *Enterobacter aerogenes* / H. Yokoi [et al.] // Biotechnol. Lett., 1998. – 20. – P. 143 – 147.

92. Ren N. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilotscale bioreactor system / N. Ren [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy, 2006. – 31. P. 2147–2157.

93. Wang A.-J. Biohydrogen production from anaerobic fermentation / A.-J. Wang, G.-L. Cao, W.-Z. Liu // Adv. Biochem. Engin./Biotechnol, 2012. – 128. – P. 143–163

94. Голуб Н.Б. Науково-технологічні основи конверсії відновлюваної сировини у біоводень, біометан та біодизель: автореф. дис. ... докт. техн. наук: 03.00.20 / Голуб Наталія Борисівна // Націонал. техн. ун-т України "Київський політехнічний інститут". – К., 2015. – 43 с.

95. Походенка В. Д. Фундаментальні проблеми водневої енергетики [Текст]: монографія / [Андрійчук І. Л. та ін.]; за ред. В. Д. Походенка, В. В. Скорохода, Ю. М. Солоніна; НАН України. – К.: КІМ, 2010. – 495 с.

96. Sharma S. Hydrogen the future transportation fuel: From production to applications / S. Sharma, S. K. Ghoshal // Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015. – № 43. – P. 1151.

97. Dutta S. A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource / S. Dutta // Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2014. – № 20. – P. 1149.

98. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк . – М.: Мир, 1982. – 204 с.

99. Кондратьева Е.И. Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез / Е.И. Кондратьева. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1972. – 51 с.

100. Таширев О.Б. Розробка біотехнології отримання молекулярного водню при максимальній деструкції харчових відходів / О.Б. Таширев, В.М. Говоруха, О.А. Гаврилюк, І.Б. Сіома, Н.А. Матвєєва, Г.О. Таширева, Л.С. Ястремська, О.Ю. Белікова // Фундаментальні аспекти відновлювано-водневої енергетики і паливно-комірчанних технологій. – К.: «КІМ», 2018. – с. 15-25

101. Притула И.Р, Таширев А.Б. Усовершенствование метода выделения водородобразующих бактерий рода *Clostridium* // Микробиологичний журнал, 2012 – Т. 74 , № 6. – С. 58 – 64.

102. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук, Н.Н. Колотилова // Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

103. Таширев А. Б. Техника выделения изолированных колоний анаэробных бактерий во флаконах / А. Б. Таширев, Я.Н. Данько, Д. В. Чернышенко // Микробиол. Журн, 1988. – 50, № 4. – С. 89–90.

104. Quantitative Determination of Chromium by Diphenylcarbazide Method [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://jascoinc.com/wp-content/uploads/2017/09/APP-Note-UV0004-Chromium-Quantitative-Determination.pdf>

105. Ястремська Л. С. Лабораторний зошит із загальної мікробіології і вірусології / уклад. Л. С. Ястремська. – К. : НАУ, 2017. – 144 с.

106. Воронич О. Г. Аналіз технічних об'єктів: Навчально-методичний посібник / О. Г. Воронич, Я. Р. Базель, Я. І. Студеняк, М. В. Фершал // Ужгород, 2016. – 72 с.

107. Другов Ю. С. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха: 6-е изд. / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – М.: Лаборатория знаний, 2020. – с. 531

108. Novorukha V. M. Interaction of obligate anaerobic destroyer of solid organic waste *Clostridium butyricum* GMP1 with soluble compounds of toxic metals Cr(VI), Mo(VI) and W(VI) / V.M. Novorukha, O.A. Havryliuk, G.V. Gladka, I.O. Bida, O.B. Tashyrev // BIOTECHNOLOGIA ACTA. English, 2020. – V. 13, № 5. – P. 73-86. – DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech13.05.073>

109. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/gost-12-0-003-74-ssbt>

110. Постанова № 42 від 01.12.99 - Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99.

111. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.

112. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

113. ГОСТ 12.1.029-80 “Система засобів безпеки праці. Засоби і методи захисту від шуму. Класифікація”.

114. ГОСТ 12.4.080-79 ССБТ. Светофильтры стеклянные для защиты глаз от вредных излучений на производстве. Технические условия.

115. Дроздов С.Г. 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.

116. Мушников В.С. 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.

117. Гурець Л.О. Методичні вказівки до дипломного проекту «Розрахунок загальнообмінної вентиляції» з розділу «Охорона праці» / Л.О. Гурець, О.П.Будьоний.– Суми: Видавництво СумДУ, 2010. – 23с.
118. Захаров Л. П. Техника безопасности в химических лабораториях / Л. П. Захаров. – Л.: Химия, 1985. – 184 с.
119. Иванов Б. И. Пожарная безопасность в химических лабораториях / Б. И. Иванов. – М.: Химия, 1988. – 112 с.
120. Gao Y. Chromium Contamination Accident in China: Viewing Environment Policy of China / Y. Gao, J. Xia // Environmental Science & Technology, 2011. – № 45. – pp. 8605–8606 DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es203101f>
121. Ishchenko V. Environment contamination with heavy metals contained in waste / V. Ishchenko // Environmental problems, 2018. – Vol. 3, №. 1. – Режим доступу: <http://ir.lib.vntu.edu.ua/handle/123456789/22840>
122. Jin W. Recent advances in electrochemical detection of toxic Cr(VI) / W. Jin, K. Yan // The Royal Society of Chemistry, 2015. – Vol. 5 DOI: <https://doi.org/10.1039/c5ra03480a>
123. Yanovych D. O., Chromium in Hydroecosystems and its Impact on the Aquatic Biota (a Review) / D. O. Yanovych, T. M. Shvets // Hidrobiologicheskii Zhurnal, 2017. – Vol. 53, №. 2. – pp. 70–87 DOI: <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v53.i4.70>
124. Environmental Agency Uncorks Its Own Toxic Water Spill at Colorado Mine [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [https://www.nytimes.com/2015/08/11/us/durango-colorado-mine-spill-environmental-protection-agency.html?\\_r=0](https://www.nytimes.com/2015/08/11/us/durango-colorado-mine-spill-environmental-protection-agency.html?_r=0)
125. Bakshia A. A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes / A. Bakshia, A.K. Panigrahi // Toxicology Reports, 2018. – № 5. – С. 440–447 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.007>
126. Сеитова Г.С. К вопросу социально-гигиенической оценки состояния здоровья населения г. Актобе / Г.С.Сеитова, С.И. Альмурзаева // Қазақстан Ақтөбе мемлекеттік университетінің хабаршысы, 1997. – № 186

127. Голубнича В. М. Біобезпека та біозахист у біологічних лабораторіях 1-го та 2-го рівнів біобезпеки : монографія / В. М. Голубнича, М. В. Погорєлов, В. В. Корнієнко. – Суми : Сумський державний університет, 2016. – 123 с.

128. Основи біобезпеки для науково-дослідних установ біологічного профілю. – Львів : Растр-7, 2017. – 218 с.