

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет
«Дніпровська політехніка»

Навчально-науковий інститут природокористування
Кафедра екології та технологій захисту навколишнього середовища

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА
кваліфікаційної роботи ступеня бакалавр

студентки Горбун Марії Володимирівни
(ПІБ)

академічної групи 091-20-1
(шифр)

спеціальності 091 «Біологія»
(код і назва спеціальності)

за освітньо-професійною програмою – «Біологія»

на тему «ЕКСТРАКЦІЯ ДНК З КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ В
ҐРУНТАХ З ВИСОКОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ МИШ'ЯКУ ДЛЯ
ФІТОРЕМЕДАЦІЇ ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ»

(назва за наказом ректора)

Керівники:'	Прізвище, ініціали	Оцінка	Підпис
кваліфікаційної роботи	Бучавий Ю.В.		
розділів:			
Теоретичного	Бучавий Ю.В.		
Практичного	Бучавий Ю.В.		
Техніка безпеки	Столбченко О.В.		
Рецензент			
Нормоконтролер	Ґрунтова В.Ю.		

Дніпро
2024

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет
«Дніпровська політехніка»

ЗАТВЕРДЖЕНО:
завідувач кафедри ЕТЗНС
Борисовська О.О.
«__»_____ 2024 року

ЗАВДАННЯ
на кваліфікаційну роботу ступеня **бакалавра**

студентці Горбун М.В. академічної групи 091-20-1
(прізвище та ініціали) (шифр)
спеціальності 091 «Біологія»
за освітньо-професійною програмою – Біологія
(офіційна назва)

на тему **«ЕКСТРАКЦІЯ ДНК З КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ
В ҐРУНТАХ З ВИСОКОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ МИШ'ЯКУ ДЛЯ
ФІТОРЕМЕДАЦІЇ ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ»**, затверджену наказом
ректора НТУ «Дніпровська політехніка» № 453-с від 21.05.2024

Розділ	Зміст	Термін виконання
Теоретичний	Провести аналіз літературних джерел щодо проблематики забруднення ґрунтів важкими металами та методів виявлення мікроорганізмів в ґрунтах	10.10.2023- 31.01.2024
Практичний	Визначити наявність та кількість мікроорганізмів, здатних витримати життя в зразках ґрунтів з високою концентрацією миш'яку	01.02.2024- 31.05.2024
Техніка безпеки	Охарактеризувати небезпеку від впливу важких металів для здоров'я людини, навести правила поводження з хімічними речовинами з лабораторіях, та рекомендації з надання першої допомоги при нещасних випадках під час досліджень	03.06.2024- 23.06.2024

Завдання видано _____
(підпис керівника)

Бучавий Ю.В.
(прізвище, ініціали)

Дата видачі _____

Дата подання до екзаменаційної комісії _____

Прийнято до виконання _____ Горбун М.В.
(підпис студента) (прізвище, ініціали)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 89 с., 11 рис., 15 табл., 5 додатків, 111 літературних джерел.

Об'єкт дослідження: зразки ґрунту із високою концентрацією важких металів, ґрунтова мікробіота.

Предмет дослідження: екстракція ДНК та ПЦР тест на специфічні ферменти *Arsenate reductase (glutaredoxin)* та *Arsenate oxidase*.

Мета роботи: вивчення біорізноманіття мікроорганізмів, за допомогою методів біологічних досліджень, в місцях з очікуваною високою концентрацією *As*, на наявність в них ферментів здатних на обробку *As*, такі як *Arsenate reductase (glutaredoxin)* та *Arsenate oxidase* з метою в майбутньому покращити методи фітореMediaції територій України.

У вступі обґрунтовано проблеми забруднення земель важкими металами та доцільність використання сучасних методів біологічних досліджень щодо визначення культур мікроорганізмів зразках ґрунту для подальшого відновлення земельного фонду України.

Теоретичний розділ містить огляд досліджень присвячених проблемам забруднення ґрунтів, оцінці вмісту важких металів та мікроорганізмів в ґрунтах на основі сучасних методів досліджень та устаткування.

Практичний розділ містить методики збору зразків ґрунту на досліджених територіях та екстракції ДНК мікроорганізмів в лабораторних умовах.

В розділі охорона праці наведено характеристики небезпеки від впливу важких металів для здоров'я людини, правила з утилізації хімічних реактивів з лабораторій, перша допомога при нещасних випадках під час досліджень.

У висновках наведені основні результати роботи та практичні рекомендації.

ВАЖКІ МЕТАЛИ, ФІТОРЕМАДІАЦІЯ ЗЕМЕЛЬ, БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ, ДНК, МІКРООРГАНІЗМИ, ЗАБРУДНЮВАЛЬНІ РЕЧОВИНИ, ГРУНТИ

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ДОСЛІДЖЕНЬ ЩОДО ПРОБЛЕМ ЗАБРУДНЕННЯ ГРУНТІВ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ТА МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ГРУНТАХ	9
1.1 Проблема забруднення ґрунтів важкими металами	9
1.2 Миш'як та його властивості	13
1.3 Механізми токсичності та канцерогенності	16
1.4 Фіторемідація ґрунтів	20
1.5 Використання мікроорганізмів у біоремедіації	21
1.6 Арсенатредуктаза і арсеніт оксидаза.....	21
Висновки до розділу 1	23
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ, МАТЕРІАЛИ ТА ХІД ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ...	25
2.1 Методика збору зразків ґрунту з різних частин міста.....	25
2.2 Плавка ґрунтових зразків.....	27
2.3 Перевірка зразків на кислотність та солоність	29
2.4 Процедура екстракції ДНК зі зразків ґрунту	32
2.5 Використання спектрофотометра NanoDrop 2000с для вимірювань	34
2.6 Гель електрофорез.....	36
2.7 Праймер тест	39
2.8 Microwave	40
2.9 Фотометричне визначення фосфатів, нітратів і амонію в ґрунтах і ґрунтовий розчин	41
2.10 Узагальнені результати аналізу мікробіому ґрунтів	47
Висновки до розділу 2	55
РОЗДІЛ 3 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПІДЧАС ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Загальні положення.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Перша допомога при нещасних випадках в лабораторії... не определена.	Ошибка! Закладка не определена.

3.3 Вимоги щодо утилізації хімічних реактивів	Ошибка! Закладка не определена.
ВИСНОВКИ	56
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	57
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	58
Додаток А Результати дослідження ICP-MS	Ошибка! Закладка не определена.
Додаток Б Відгук наукового керівника.....	Ошибка! Закладка не определена.
Додаток В Рецензія	Ошибка! Закладка не определена.
Додаток Г Довідка на перевірку текстових запозичень	Ошибка! Закладка не определена.
Додаток Д Відгуки керівників розділів кваліфікаційної роботи	Ошибка!
	Закладка не определена.

ВСТУП

Неможливо переоцінити, наскільки важливим є стан навколишнього середовища та його покращення для сучасного світу, і тому, поки ми не знайдемо вирішення поточних і майбутніх проблем, людство не зможе добросовісно розвивати інші аспекти нашого життя. Наша країна не повинна залишатися позаду, коли йдеться про ці рішення, важливо не лише відновлювати та відновлювати, але й покращувати, щоб рухатися вперед.

Посилення індустріалізації та ведення сільського господарства призвели до широкого забруднення ґрунту важкими металами (ТМ), що стало серйозною екологічною проблемою в усьому світі [1, 2]. ТМ є виключно стабільними суб'єктами з періодом напіврозпаду понад 20 років [3, 4]. Видобуток корисних копалин і пов'язані з ним різні методи поводження впливають на введення забруднюючих речовин і ТМ у навколишнє середовище, що значною мірою визначає питому рухливість різних металів у навколишньому середовищі. Через розширення індустріалізації та тривожний вплив органічного циклу забруднення важкими металами стає проблематичною проблемою, яка потребує ефективного вирішення, щоб пом'якшити його вплив. Важкі метали – це, по суті, великі метали, які не піддаються біологічному розкладанню, які накопичуються в навколишньому середовищі та становлять ризик для здоров'я людини та навколишнього середовища, забруднюючи, наприклад, ґрунт і воду [5]. У живій органічній істоті ці елементи накопичуються в тканинах тіла через процес, відомий як біоаккумуляція, і вони переміщуються з нижчого на вищий трофічний рівень із підвищеною концентрацією — явище, відоме як біозбільшення. Через негативну дію важких металів у ґрунті стає менше ґрунтових організмів [6].

Ґрунт є важливою складовою екосистеми. Ґрунт має здатність поглинати та випромінювати, тому є вразливим до забруднення з різних джерел. Постійний розвиток урбанізації призводить до будівництва, сільського господарства, кладовищ і транспортних викидів. Ґрунт, де ми живемо, де ми займаємося сільським господарством, не захищена від цих металів. Важкі

метали потрапляють у ґрунти як із вихідних речовин (літосфери), так і внаслідок різноманітної діяльності людини. Є деякі фактори, які впливають на присутність і поділ цих металів у землі; це склад материнських порід, ступінь вивітрювання, хімічні, фізичні та біологічні особливості ґрунту, а також залежить від кліматичних умов. Діяльність людини є основною причиною і поступово зростає з кожним днем, що призводить до погіршення навколишнього середовища [7].

Важкі метали є металоїдами з біологічною токсичністю. Найпоширенішими є миш'як (*As*), кадмій (*Cd*), хром (*Cr*), мідь (*Cu*), ртуть (*Hg*), свинець (*Pb*), цинк (*Zn*).

Забруднення ґрунтів миш'яком є глобальною проблемою для навколишнього середовища, сільського господарства та охорони здоров'я через токсичну та канцерогенну природу *As*. Кілька антропогенних видів діяльності, таких як видобуток і металургія, спалювання вугілля, збереження деревини, дублення шкіри та використання пестицидів на основі *As* у сільському господарстві, призвели до підвищених концентрацій *As* у ґрунті. Таким чином, рекультивация та відновлення забруднених *As* ґрунтів є обов'язковими для забезпечення безпечних продуктів харчування та здорових ґрунтів [8].

Завдяки своїй ролі в біогеохімічному циклі миш'яку (*As*) мікроорганізми та рослини пропонують значний потенціал для розробки інноваційних біотехнологічних застосувань, здатних усунути забруднення *As*. Це можливе використання в процесах біоремедіації та фітоменеджменту ґрунтується на їх здатності каталізувати різні реакції біотрансформації, що призводять до, напр. осадження, розчинення та секвестрація *As*, стабілізація в кореневій зоні та видалення пагонів *As*.

З одного боку, геномні дослідження мікроорганізмів та їхніх спільнот корисні для розуміння їхньої метаболічної діяльності та взаємодії з *As*. З іншого боку, наші знання про молекулярні механізми та долю *As* в рослинах були покращені лабораторними та польовими експериментами. Такі дослідження відкривають нові шляхи для розробки екологічно чистих варіантів біообробки,

націлених на *As*, який у всьому світі становить серйозний ризик для багатьох екосистем і здоров'я людини[9].

Таким чином, **метою цього дослідження** було вивчення біорізноманіття мікроорганізмів, за допомогою методів біологічних досліджень, в місцях з очікуваною високою концентрацією *As*, на наявність в них ферментів здатних на обробку *As*, такі як *Arsenate reductase (glutaredoxin)* та *Arsenate oxidase* з метою в майбутньому покращити методи фітореградації територій України.

Об'єкт дослідження: зразки ґрунту із високою концентрацією важких металів, ґрунтова мікробіота.

Предмет дослідження: екстракція ДНК та ПЦР тест на специфічні ферменти *Arsenate reductase (glutaredoxin)* та *Arsenate oxidase*.

Методи досліджень: узагальнення, синтез, камеральні роботи, лабораторні експерименти, методи молекулярної біології.

Завдання роботи:

1. Провести аналіз літературних джерел щодо проблематики забруднення ґрунтів важкими металами та методів виявлення мікроорганізмів в ґрунтах.
2. Визначити наявність мікроорганізмів, здатних витримати життя в зразках ґрунтів з високою концентрацією миш'яку.
3. Охарактеризувати небезпеку від впливу важких металів для здоров'я людини, наведено правила поведження з хімічними реактивами з лабораторіях, та рекомендації з надання першої допомоги при нещасних випадках підчас досліджень.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ДОСЛІДЖЕНЬ ЩОДО ПРОБЛЕМ ЗАБРУДНЕННЯ ГРУНТІВ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ТА МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ГРУНТАХ

1.1 Проблема забруднення ґрунтів важкими металами

Важкі метали визначаються як металеві елементи, які мають відносно високу щільність порівняно з водою [9]. Відомо, що важкі метали є природними домішками, що присутні у ґрунті, але завдяки діяльності людини, індустріалізації, концентрація віх елементів значно виросла і продовжує рости на сьогодні. Швидкий та інтенсивний ріст промисловості, особливо в містах та поряд з підприємствами привів до зростання їхнього вмісту та потрапляння, вплив на біосферу, її різноманіття, гідро та атмосферу. У результаті, важкі метали є пріоритетними забруднювальними речовинами земельних ресурсів як в Україні так і в світі. В умовах такого інтенсивного впливу людини, захисна система ґрунтів не проміжна витримати навантаження, що призводить до значного зниження родючості, якості агропродукції та її безпечності для людини і тварин.

Проблема забруднення ВМ України детально розглядається в [89]. Огляд розглядає поточну ситуацію із забрудненням важкими металами в різних регіонах України та можливе забруднення важливої культури. Припускають, що силовий конфлікт 2022 року в Україні може стати причиною розвитку забруднених територій *Pb*, *Ni*, *Cr*, *Cu*. Особливо така тенденція небезпечна для регіонів України з високим рівнем важких металів, де військовий конфлікт перебував в активній фазі: Донецьк, Запоріжжя, Київ, Луганськ, Суми, Харків, Херсонська, Чернігівська, Миколаївська, Житомирська, Дніпропетровська, Одеська області. Пшениця, кукурудза, ячмінь, ріпак, соняшник були представлені та обговорені можливості їх вирощування як основні сільськогосподарські культури України. Авторами було рекомендовано використовувати сучасні технології фіторе mediaції із застосуванням сівоzmіни заводи гіперакумуляторів важких металів на цих ділянках.

Науковці розділяють важкі метали на 2 типи, в залежності від їх властивостей, джерела потрапляння.

1. Літогенні (природні).

2. Антропогенні, що потрапляють в ґрунт в наслідок людського впливу.

Забруднення ґрунту, в цілому, має локальний характер, пов'язаний з відстанню до промислових центрів. Звичайно, що більше забруднень буде знайдено біля великих виробництв, магістралей.

Потрапляючи в ґрунт, важкі метали здатні мігрувати, переходити до інших хімічних сполук, деякі з яких важкорозчинні, закріплюватися у середовищі. У ґрунтового середовищі ВМ можуть знаходитися у декількох станах: необмінному, обмінному або водорозчинному.

Рослини та мікроорганізми, що знаходяться в цьому середовищі мають межу протидії підвищення концентрації ВМ. Коли ця межа перетинається, це призводить до значного пригнічення і далі загибелі локальної біосфери. Подальше збільшення концентрації згодом призводить до руйнування біорізноманіття рослин, мікроорганізмів, що призводить до значного збіднення локальних ґрунтів.

Ґрунт може забруднюватися сполуками металів, органічними речовинами, пестицидами, вибуховими, токсичними речовинами та іншими шкідливими продуктам зі звалищ, промислових відходів або відходів життєдіяльності. Найнебезпечніші важкі метали, що можуть потрапити в ґрунт такими способами включають в себе: ртуть, кадмій, свинець, міді, цинк і миш'як, на який і приділяється найбільша увага в цієї роботі. Збільшення концентрації в ґрунтах відбувається переважно у поверхневих шарах, які споживаються сільськогосподарськими тваринами. Токсичність ВМ перешкоджає життєдіяльності біосфери ґрунту, а їх концентрація може залишатися без змін до десятиліть, у деяких випадках, століть.

Дослідження впливу ВМ на біорізноманіття ґрунтів та механізми забруднення ними наводяться в багатьох наукових роботах, але я звернула увагу на [85–87].

Робота [85] дуже детально звертає увагу на найтоксичніші ВМ, такі як: миш'як, кадмій, хром, свинець і ртуть. Ці металеві елементи вважаються системними токсикантами, які, як відомо, спричиняють пошкодження багатьох органів, навіть при менших рівнях впливу. Вони також класифікуються як канцерогени для людини (відомі чи ймовірні) відповідно до Агентства з охорони навколишнього середовища США та Міжнародного агентства з дослідження раку. Дослідження містить детальний аналіз їх появи в навколишньому середовищі, виробництва та використання, потенціалу впливу на людину та молекулярних механізмів токсичності, генотоксичності та канцерогенності.

Важкі метали також розглядаються як мікроелементи через їх присутність у слідових концентраціях (діапазон часток на мільярд до менше ніж 10 частин на мільйон) у різних екологічних матрицях [10]. На їх біодоступність впливають такі фізичні фактори, як температура, асоціація фаз, адсорбція та секвестрація. На нього також впливають хімічні фактори, які впливають на видоутворення при термодинамічній рівновазі, кінетику комплексоутворення, розчинність у ліпідах і коефіцієнти розподілу октанол/вода [11]. Біологічні фактори, такі як видові характеристики, трофічні взаємодії та біохімічна/фізіологічна адаптація, також відіграють важливу роль [12].

Основні важкі метали виконують біохімічні та фізіологічні функції в рослинах і тваринах. Вони є важливими складовими кількох ключових ферментів і відіграють важливу роль у різних окислювально-відновних реакціях [13]. Наприклад, мідь є важливим кофактором для кількох пов'язаних із окислювальним стресом ферментів, включаючи каталазу, супероксиддисмутазу, пероксидазу, цитохром-с-оксидази, фероксидази, моноаміноксидазу та дофамін- β -монооксигеназу [14–16]. Отже, це важлива поживна речовина, яка входить до ряду металоферментів, які беруть участь у формуванні гемоглобіну, метаболізмі вуглеводів, біосинтезі катехоламінів і зшиванні колагену, еластину та кератину волосся. Здатність міді переходити між окисненим станом $Cu(II)$ і відновленим станом $Cu(I)$ використовується

купроферментами, що беруть участь в окисно-відновних реакціях [14–16]. Однак саме ця властивість міді також робить її потенційно токсичною, оскільки переходи між $Cu(II)$ і $Cu(I)$ можуть призводити до утворення супероксидних і гідроксильних радикалів [14–17]. Крім того, надмірний вплив міді був пов'язаний з пошкодженням клітин, що призводить до хвороби Вільсона у людей [16, 17]. Подібно до міді, кілька інших важливих елементів необхідні для біологічного функціонування, однак надмірна кількість таких металів викликає пошкодження клітин і тканин, що призводить до різноманітних несприятливих ефектів і захворювань людини. Для деяких, включаючи хром і мідь, існує дуже вузький діапазон концентрацій між корисними та токсичними ефектами [17, 28]. Інші метали, такі як алюміній (Al), антимон (Sb), миш'як (As), барій (Ba), берилій (Be), вісмут (Bi), кадмій (Cd), галій (Ga), германій (Ge), золото (Au), індій (In), свинець (Pb), літій (Li), ртуть (Hg), нікель (Ni), платина (Pt), срібло (Ag), стронцій (Sr), телур (Te), талій (Tl), олово (Sn), титан (Ti), ванадій (V) і уран (U) не мають встановлених біологічних функцій і вважаються неосновними металами [20].

Повідомлялося, що в біологічних системах важкі метали впливають на клітинні органели та компоненти, такі як клітинна мембрана, мітохондріальна, лізосома, ендоплазматичний ретикулум, ядра та деякі ферменти, що беруть участь у метаболізмі, детоксикації та ремонті пошкоджень [19]. Було виявлено, що іони металів взаємодіють з компонентами клітини, такими як ДНК і ядерні білки, викликаючи пошкодження ДНК і конформаційні зміни, які можуть призвести до модуляції клітинного циклу, канцерогенезу або апоптозу [17–19].

Кілька досліджень продемонстрували, що утворення активних форм кисню (АФК) і окислювальний стрес відіграють ключову роль у токсичності та канцерогенності таких металів, як миш'як [20, 21, 22], кадмій [23], хром [24, 25], свинцю [26, 27] та ртуті [28, 29]. Через високий ступінь токсичності ці п'ять елементів належать до числа пріоритетних металів, які мають велике значення для охорони здоров'я. Усі вони є системними токсикантами, які, як відомо, спричиняють ушкодження багатьох органів, навіть при менших рівнях

впливу. Згідно з даними Агентства з охорони навколишнього середовища США (*U.S. EPA*) і Міжнародного агентства з дослідження раку (*IARC*), ці метали також класифікуються як «відомі» або «ймовірні» канцерогени для людини на основі епідеміологічних та експериментальних досліджень, які показують взаємозв'язок між впливом і захворюваністю на рак у людей і тварин. Токсичність і канцерогенність, спричинені важкими металами, включають багато механістичних аспектів, деякі з яких не є чітко з'ясованими чи зрозумілими. Проте відомо, що кожен метал має унікальні особливості та фізико-хімічні властивості, які визначають його специфічні токсикологічні механізми дії. У цьому огляді наведено аналіз появи, виробництва та використання в навколишньому середовищі, можливого впливу на людину, а також молекулярних механізмів токсичності, генотоксичності та канцерогенності миш'яку, кадмію, хрому, свинцю та ртуті.

1.2 Миш'як та його властивості

Небезпечність миш'яку а також можливість екологічного його виведення наведена у статті [85,87].

У статті [87] була досліджена була як токсичність миш'яку в ґрунтах так і можливість фіторемедіація забруднених миш'яком ґрунтів за допомогою гіперакумуляюючих папоротей миш'яку. Також зроблено акцент на необхідність рекультивації та відновлення забруднених *As* ґрунтів є обов'язковими для забезпечення безпечних продуктів харчування та здорових ґрунтів.

Миш'як є поширеним елементом, який виявляється в низьких концентраціях практично в усіх матрицях навколишнього середовища [30]. Основні неорганічні форми миш'яку включають тривалентний арсеніт і п'ятивалентний арсеніт. Органічними формами є метильовані метаболіти – монометиларсонова кислота (ММА), диметиларсинова кислота (ДМА) і триметиларсин оксид. Забруднення навколишнього середовища миш'яком відбувається в результаті природних явищ, таких як виверження вулканів і ерозія ґрунту, а також антропогенної діяльності [30]. Кілька сполук, що містять

миш'як, виробляються промисловим шляхом і використовуються для виробництва продуктів сільськогосподарського призначення, таких як інсектициди, гербіциди, фунгіциди, альгіциди, овець, консерванти для деревини та барвники. Вони також використовувалися у ветеринарії для знищення стрічкових глистів у овець і великої рогатої худоби [34]. Сполуки миш'яку також використовувалися в медичній галузі протягом щонайменше століття для лікування сифілісу, фрамбезії, амебної дизентерії та трипаносомаозу [31,32]. Препарати на основі миш'яку все ще використовуються при лікуванні деяких тропічних хвороб, таких як африканська сонна хвороба та амебна дизентерія, а також у ветеринарії для лікування паразитарних захворювань, включаючи філяріатоз у собак і чорну голову у індиків і курей [33]. Нещодавно триоксид миш'яку був схвалений Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів як протипухлинний засіб при лікуванні гострого промієлоцитарного лейкозу [33]. Його терапевтичну дію пояснюють індукцією запрограмованої загибелі клітин (апоптоз) у клітинах лейкемії [21].

За оцінками, кілька мільйонів людей постійно піддаються впливу миш'яку в усьому світі, особливо в таких країнах, як Бангладеш, Індія, Чилі, Уругвай, Мексика, Тайвань, де ґрунтові води забруднені високою концентрацією миш'яку. Вплив миш'яку відбувається пероральним шляхом (проковтування), вдиханням, шкірним контактом і певною мірою парентеральним шляхом [30, 31, 34]. Концентрація миш'яку в повітрі коливається від 1 до 3 нг/м³ у віддалених місцях (подалі від викидів людини), і від 20 до 100 нг/м³ у містах. Його концентрація у воді зазвичай становить менше 10 мкг/л, хоча високі рівні можуть спостерігатися поблизу природних родовищ корисних копалин або місць видобутку. Його концентрація в різних харчових продуктах коливається від 20 до 140 нг/кг [35]. Природні рівні миш'яку в ґрунті зазвичай коливаються від 1 до 40 мг/кг, але застосування пестицидів або утилізація відходів може призвести до значно вищих значень [22]. Дієта для більшості людей є найбільшим джерелом впливу, із середнім споживанням близько 50 мкг на день. Надходження з повітря, води та ґрунту

зазвичай набагато менше, але вплив цих середовищ може стати значним у зонах забруднення миш'яком. Працівники, які виробляють або використовують сполуки миш'яку в таких сферах діяльності, як виноградарство, кераміка, виробництво скла, плавка, рафінування металевих руд, виробництво та застосування пестицидів, консервація деревини, виробництво напівпровідників, можуть піддаватися впливу значно вищих рівнів миш'яку [36]. Миш'як також був виявлений на 781 ділянці з 1300 місць небезпечних відходів, які були запропоновані *EPA* США для включення до національного пріоритетного списку [30, 36]. Вплив на людей у цих місцях може відбуватися різними шляхами, включаючи вдихання пилу в повітрі, споживання забрудненої води чи ґрунту або через харчовий ланцюг [37]. Забруднення високими рівнями миш'яку викликає занепокоєння, оскільки миш'як може спричинити ряд наслідків для здоров'я людини. Кілька епідеміологічних досліджень показали сильний зв'язок між впливом миш'яку та підвищеним ризиком як канцерогенних, так і системних наслідків для здоров'я [38]. Інтерес до токсичності миш'яку підвищився завдяки нещодавнім повідомленням про велику кількість населення в Західній Бенгалії, Бангладеш, Тайланді, Внутрішній Монголії, Тайвані, Китаї, Мексиці, Аргентині, Чилі, Фінляндії та Угорщині, які зазнали впливу високих концентрацій миш'яку в своїх п'ють воду та демонструють різні клініко-патологічні стани, включаючи серцево-судинні та периферичні судинні захворювання, аномалії розвитку, неврологічні та нейроповедінкові розлади, діабет, втрату слуху, порталний фіброз, гематологічні розлади (анемія, лейкопенія та еозинофілія) та карциному [22, 30, 32, 36]. Вплив миш'яку впливає практично на всі системи органів, включаючи серцево-судинну, дерматологічну, нервову, гепатобіліарну, ниркову, шлунково-кишкову та дихальну системи [38]. Дослідження також вказали на значно вищі стандартизовані показники смертності від раку сечового міхура, нирок, шкіри та печінки в багатьох районах, забруднених миш'яком. Тяжкість несприятливих наслідків для здоров'я пов'язана з хімічною формою миш'яку, а також залежить від часу та дози [39,40]. Хоча докази канцерогенності миш'яку для

людей здаються переконливими, механізм, за допомогою якого він продукує пухлини у людей, до кінця не вивчений [41].

1.3 Механізми токсичності та канцерогенності

Аналіз токсичних ефектів миш'яку є складним, оскільки на токсичність сильно впливають його ступінь окислення та розчинність, а також багато інших внутрішніх і зовнішніх факторів [42]. Кілька досліджень показали, що токсичність миш'яку залежить від дози впливу, частоти та тривалості, біологічного виду, віку та статі, а також від індивідуальної сприйнятливості, генетичних факторів і факторів харчування [43]. Більшість випадків отруєння людини миш'яком пов'язано з впливом неорганічного миш'яку. Неорганічний тривалентний арсеніт $As(III)$ у 2–10 разів токсичніший за п'ятивалентний арсенат $As(V)$ [5]. Зв'язуючись з тіоловими або сульфгідрильними групами білків, $As(III)$ може інактивувати понад 200 ферментів. Це ймовірний механізм, відповідальний за поширений вплив миш'яку на різні системи органів. $As(V)$ може замінити фосфат, який бере участь у багатьох біохімічних шляхах [2, 44]. Одним із механізмів, за допомогою якого миш'як виявляє свою токсичну дію, є порушення клітинного дихання шляхом пригнічення різних мітохондріальних ферментів і роз'єднання окисного фосфорилування. Більша частина токсичності миш'яку є наслідком його здатності взаємодіяти з сульфгідрильними групами білків і ферментів, а також заміщати фосфор у різноманітних біохімічних реакціях [45]. Миш'як *in vitro* реагує з сульфгідрильними групами білка, щоб інактивувати ферменти, такі як дигідроліпоїлдегідрогеназа та тіолаза, таким чином викликаючи пригнічене окислення пірувату та бета-окислення жирних кислот [46]. Основним метаболічним шляхом неорганічного миш'яку в організмі людини є метилювання. Триоксид миш'яку метилюється до двох основних метаболітів за допомогою неферментативного процесу до монометиларсонової кислоти (ММА), яка далі ферментативно метилюється до диметиларсонової кислоти (ДМА) перед виведенням із сечею [37, 44]. Раніше вважалося, що цей процес

метилування є шляхом детоксикації миш'яку, однак останні дослідження показали, що деякі метильовані метаболіти можуть бути більш токсичними, ніж арсеніт, якщо вони містять тривалентні форми миш'яку [38]. Випробування на генотоксичність показали, що сполуки миш'яку пригнічують відновлення ДНК і індукують хромосомні аберації, обмін між сестринськими хроматидами та утворення мікроядер як у клітинах людини, так і в клітинах гризунів у культурі [47–49] і в клітинах людей, які зазнали впливу [50]. Реверсійні аналізи з *Salmonella typhimurium* не дозволяють виявити мутації, спричинені сполуками миш'яку. Хоча сполуки миш'яку зазвичай сприймаються як слабкі мутагени в бактеріальних і тваринних клітинах, вони виявляють кластогенні властивості в багатьох типах клітин *in vivo* та *in vitro* [51]. За відсутності моделей на тваринах дослідження трансформації клітин *in vitro* стають корисним засобом отримання інформації про канцерогенні механізми токсичності миш'яку. Сполуки миш'яку та миш'яку є цитотоксичними та індукують морфологічні трансформації клітин ембріона сирійського хом'яка (SHE), а також клітин *C3H10T1/2* миші та клітин *BALB/3T3* [52, 53].

На основі кометного аналізу було повідомлено, що триоксид миш'яку викликає пошкодження ДНК у лімфоцитах людини [54], а також у лейкоцитах миші [55]. Також було показано, що сполуки миш'яку індукують ампліфікацію генів, зупиняють мітоз клітин, пригнічують репарацію ДНК та індукують експресію гена *c-fos* і гемоксигенази білка окисного стресу в клітинах ссавців [55, 56]. Вони були залучені як промотори та комутагени для різноманітних токсичних агентів [57]. Нещодавні дослідження в нашій лабораторії продемонстрували, що триоксид миш'яку є цитотоксичним і здатним індукувати транскрипцію значної кількості генів стресу та споріднених білків у клітинах раку печінки людини [58]. Епідеміологічні дослідження показали, що тривалий вплив миш'яку призводить до сприяння канцерогенезу. Було запропоновано декілька гіпотез для опису механізму канцерогенезу, спричиненого миш'яком. Чжао та ін. [59] повідомили, що миш'як може діяти як канцероген, індукуючи гіпометилування ДНК, що, у свою чергу, сприяє

аномальній експресії генів. Крім того, було виявлено, що миш'як є потужним стимулятором позаклітинної сигнально-регульованої протеїнкінази *Erk1* і трансактиваційної активності AP-1, а також ефективним індуктором експресії генів *c-fos* і *c-jun* [60]. Індукція *c-jun* і *c-fos* миш'яком пов'язана з активацією *JNK* [61]. Однак роль активації *JNK* арсенітом у трансформації клітин або стимулюванні пухлини незрозуміла. В іншому дослідженні *Trouba et al.* [62] прийшли до висновку, що тривалий вплив високих рівнів миш'яку може зробити клітини більш сприйнятливими до мітогенної стимуляції та що зміни в мітогенних сигнальних білках можуть сприяти канцерогенній дії миш'яку. Кілька недавніх досліджень разом продемонстрували, що миш'як може перешкоджати клітинним сигнальним шляхам (наприклад, сигнальному шляху p53), які часто беруть участь у стимулюванні та прогресуванні різноманітних типів пухлин на експериментальних моделях тварин, а також деяких пухлин людини [63, 65]. Проте конкретні зміни в шляхах передачі сигналу або фактичні мішені, які сприяють розвитку індукованих миш'яком пухлин у людей після хронічного споживання миш'яку, залишаються невизначеними. Недавні клінічні випробування виявили, що триоксид миш'яку має терапевтичну цінність у лікуванні гострого промієлоцитарного лейкозу, і існує інтерес до вивчення його ефективності при лікуванні ряду інших видів раку [66, 67]. При гострому промієлоцитарному лейкозі відома конкретна молекулярна подія, критична для утворення злоякісних клітин. Дослідження *Puccetti et al.* [68] виявили, що форсована надмірна експресія чутливості до *BCR-ABL* у клітинах лімфобластів людини призвела до значного підвищення чутливості до апоптозу, індукованого миш'яком. Вони також прийшли до висновку, що триоксид миш'яку є пухлиноспецифічним агентом, здатним вибірково індукувати апоптоз у клітинах гострого промієлоцитарного лейкозу. Кілька останніх досліджень показали, що миш'як може індукувати апоптоз через зміни в інших сигнальних шляхах клітини [69, 70]. Окрім гострого промієлоцитарного лейкозу, вважають, що миш'як має терапевтичний потенціал для мієломної хвороби [71]. Таким чином, численні дослідження хіміотерапії раку на

клітинних культурах і у пацієнтів з гострим промієлоцитарним лейкозом демонструють, що введення триоксиду миш'яку може призвести до зупинки клітинного циклу та апоптозу злоякісних клітин.

Попередні дослідження також вивчали експресію гена *p53* і мутації в пухлинах, отриманих від суб'єктів, які в анамнезі вживали миш'як. Ген *p53* бере участь у багатьох клітинних функціях, контролі клітинного циклу, репарації ДНК, диференціації, геномній пластичності та запрограмованій смерті клітин. Додаткову підтримку гіпотези про те, що миш'як може модулювати експресію генів, надали кілька різних досліджень [72, 73]. У сукупності ці дослідження надають додаткові докази того, що різні форми миш'яку можуть змінювати експресію генів і що такі зміни можуть суттєво сприяти токсичній та канцерогенній дії лікування миш'яком у людей [74]. Кілька досліджень *in vitro* в нашій лабораторії продемонстрували, що миш'як модулює синтез ДНК, експресію генів і білків, генотоксичність, мітоз і/або апоптотичні механізми в різних клітинних лініях, включаючи кератиноцити, меланоцити, дендритні клітини, дермальні фібробласти, ендотеліальні клітини мікросудин, моноцити та Т-клітини [75], клітини раку товстої кишки [76], клітини раку легенів [77], клітини лейкемії людини [78], лімфоцити Jurkat-T [79] і клітини карциноми печінки людини [80]. Дослідження [85] також показали, що окислювальний стрес відіграє ключову роль у цитотоксичності, спричиненій миш'яком, процес, який модулюється про- та/або антиоксидантами, такими як аскорбінова кислота та н-ацетилцистеїн [81–83]. Крім того, продемонстрували, що токсичність миш'яку залежить від його хімічної форми, неорганічна форма більш токсична, ніж органічна [39]. Були запропоновані різні гіпотези для пояснення канцерогенності неорганічного миш'яку. Тим не менш, молекулярні механізми, за допомогою яких цей миш'як викликає рак, все ще недостатньо вивчені. Результати попередніх досліджень показали, що неорганічний миш'як не діє через класичні генотоксичні та мутагенні механізми, а скоріше може бути промотором пухлини, який змінює шляхи передачі сигналу, залучені до росту та проліферації клітин [66].

Незважаючи на те, що нещодавно було досягнуто значного прогресу в області можливого способу(ів) канцерогенної дії миш'яку, наукового консенсусу ще не досягнуто. Недавній огляд обговорює дев'ять різних можливих способів дії канцерогенезу миш'яку: індуковані хромосомні аномалії, окислювальний стрес, зміна відновлення ДНК, зміна моделей метилювання ДНК, зміна факторів росту, посилення проліферації клітин, просування/прогресування, пригнічення *p53* та ампліфікація гена [84]. В даний час три способи (хромосомна аномалія, окислювальний стрес і зміна факторів росту) канцерогенезу миш'яку показали певний ступінь позитивних доказів як в експериментальних системах (клітини тварин і людини), так і в тканинах людини. Решта можливих способів канцерогенної дії (прогресування канцерогенезу, змінена репарація ДНК, пригнічення *p53*, зміна моделей метилювання ДНК і ампліфікація генів) не мають стільки доказів, зокрема в дослідженнях *in vivo* на лабораторних тваринах, дослідженнях *in vitro* на культивованих клітинах людини , або дані про людину з конкретних випадків чи популяційних досліджень. Таким чином, дослідження способу дії показують, що миш'як може діяти як коканцероген, промотор або прогресор канцерогенезу.

1.4 Фіторемідація ґрунтів

Фіторемідація визначається як нова технологія, яка використовує вибрані рослини для очищення забрудненого навколишнього середовища від небезпечних забруднень для покращення якості навколишнього середовища. [88]. Можливість використання рослин у ремедіації навколишнього середовища завдяки кращому розумінню взаємодії рослин і мікробів зросла в останні роки були проведені дослідження, і метод став новою альтернативою відновленню забруднених ділянок. Це екологічно чиста техніка біоремідації, яка використовує рослини як рослини-гіперакумулятори для вилучення та накопичення іонів важких металів із ґрунту в коренях, пагонах, листі, квітах, плодах. Через його переваги як екологічного процесу, а також через недоліки,

пов'язані з тривалим часом, необхідним для усунення важких металів, загрози, які токсичність важких металів може спричинити для цілісності рослин та їх здатності поглинати важкі метали [89].

1.5 Використання мікроорганізмів у біоремедіації

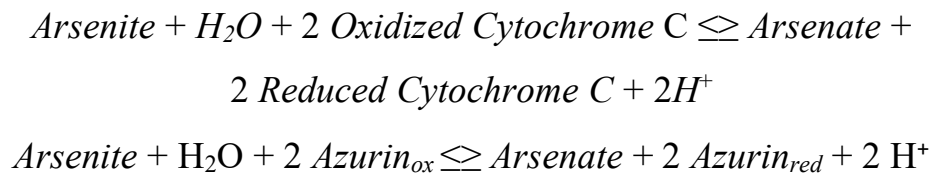
Згідно з визначенням, мікробна біоремедіація передбачає використання мікроорганізмів та/або їх похідних (ферментів або відпрацьованої біомаси) для очищення забруднень навколишнього середовища [7, 9, 10]. Що стосується мікроорганізмів, важливо відзначити, що мікроорганізми є всюди, і тому забруднювачі в різних частинах навколишнього середовища завжди контактують з мікроорганізмами [1, 2]. Мікроби розщеплюють/перетворюють забруднювачі за допомогою властивих їм метаболічних процесів з незначними змінами шляху або без них, щоб дозволити забруднювачам направлятися на нормальний мікробний метаболічний шлях для розкладання/та біотрансформації. Таким чином, прикладні методи біоремедіації зосереджені на використанні природних катаболічних можливостей мікробів для розкладання, трансформації або накопичення більшості синтетичних сполук, таких як вуглеводні (наприклад, нафта), поліхлоровані біфеніли (ПХБ), поліароматичні вуглеводні (ПАВ), радіонукліди та метали [4, 6, 7, 8]. Природне існування великої різноманітності мікробних видів розширює різноманітність хімічних забруднювачів, які розкладаються або детоксикуються.

1.6 Арсенатредуктаза і арсеніт оксидаза

Мікроорганізми, здатні до метаболізму миш'яку відіграють одну з ключових ролей в рекультивації ґрунтів і води, забрудненими їм. Різноманітність їх метаболічної активності є ключовим у біогеохімічних циклах, які можуть мати глибокий вплив на якість води та продуктивність ґрунту

Кілька таксономічно різноманітних груп організмів здатні природним чином метаболізувати миш'як. Ця різноманітна група бактерій, що дихають

миш'яком, поширена серед α -, β -, γ - та прокаріотів, ϵ -протеобактерій, грампозитивних бактерій з низьким вмістом *Firmicutes* і *Crenarchaea* (Oremland *et al.*, 2004). Такі бактерії, що метаболізують миш'як, можна класифікувати на (i) організми, що окислюють арсеніт, і (ii) організми, що відновлюють арсеніт. Здійснюється цей процес за допомогою ферментів *Arsenate reductase* та *Arsenate oxidase*. Приклад такої хімічної реакції:



Генетичні та молекулярні дослідження цих мікробів та їхніх білків мають величезний потенціал до розробки успішних стратегій ефективного впровадження програм біоремедіації. Наприклад, дослідження [101] зосереджено на досягненнях у біохімічних, молекулярних і геномних розробках у галузі бактерій, що метаболізують миш'як, охоплюючи останні розробки в розумінні структури ферментів арсенатредуктази та арсенітоксидази, їхні генні та оперонні структури та механізм їх дії, зроблена спроба надати вичерпний огляд останніх досягнень у галузі біотрансформації миш'яку. Автори роблять висновок, що дедукція метаболічного шляху миш'яку все ще в основному неповна, що вимагає вичерпного дослідження генетичної ідентифікації арсенатредуктази та арсенітоксидази в окисно-відновних перетвореннях миш'яку.

Дуже цікаве дослідження з точки зору древності та походження віх ферментів було проведено у статті Арсенітоксидаза, стародавній біоенергетичний фермент [102]. Отримані науковцями філогенетичні дерева вказують на раннє походження арсенітоксидази до дивергенції архей і бактерій. Обговорюються еволюційні наслідки цих філогенезів. У 1992 році периплазматичний розчинний фермент, здатний окислювати арсеніт *As(III)*, був очищений з β -протеобактерії *Alcaligenes faecalis*

[103]. Щоб виявити потенційних інших членів передбачуваної родини арсенітоксидаз, ми провели огляд повністю секвенованих геномів, доступних у бази даних. Цей пошук призвів до кількох додаткових прикладів, як бактеріальних, так і архейних, ферментів, які майже напевно належать до цієї нової родини. Філогенетичний аналіз обох субодиниць свідчить про давнє еволюційне походження родини арсенітоксидаз. Було проаналізовано філогенетичне відношення його субодиниці *Rieske* до субодиниці *Rieske/cytb*, а результати обговорено у світлі еволюційних історій обох ферментів.

Таким чином, можна зробити висновки, що оскільки забруднення ґрунту важкими металами є проблемою, яку не буде вирішено, доки ми не придумаємо, бажано економічно ефективно, сприятливе рішення. ФітореMediaція та біореMediaція можуть бути такими рішеннями. Численні дослідження показують, наскільки ефективною може бути біореMediaція, у випадку з миш'яком існує велика кількість біоорганізмів, які здатні метаболізувати та зменшувати небезпеку миш'яку завдяки ферментам, які вони містять. Однак досі недостатньо досліджень, які обговорюють найефективніший спосіб легкої ідентифікації цих організмів.

Висновки до розділу 1

1. Важкі метали, такі як миш'як, свинець, кадмій і ртуть, можуть накопичуватися в ґрунтах через промислову діяльність, видобуток корисних копалин, сільське господарство та неправильну утилізацію відходів. Вони становлять серйозну небезпеку для навколишнього середовища та здоров'я.

2. Миш'як є природним елементом, який існує в неорганічній і органічній формах. Він сумно відомий своєю токсичністю, особливо в неорганічних формах, таких як арсеніт *As(III)* і арсенат *As(V)*.

3. Миш'як чинить токсичну дію, втручаючись у клітинні функції, порушуючи роботу ферментів і викликаючи окислювальний стрес. Його також класифікують як канцероген через його здатність викликати мутації та сприяти утворенню пухлин.

4. Фіторемедіація передбачає використання рослин для видалення, деградації або знерухомилення забруднювачів із ґрунту та води. Рослини можуть поглинати миш'як через коріння та накопичувати його у своїх тканинах, сприяючи очищенню ґрунту.

5. Використання мікроорганізмів у біоремедіації: деякі мікроорганізми, такі як бактерії та гриби, можуть розкласти або перетворювати забруднювачі, такі як миш'як, у навколишньому середовищі. Вони можуть перетворювати токсичний арсенат у менш шкідливі форми або знерухомилювати миш'як шляхом біосорбції.

6. Арсенатредуктаза та арсенітооксидаза: ці ферменти мають вирішальне значення для метаболізму миш'яку мікроорганізмами. Арсенатредуктаза відновлює арсенат $As(V)$ до арсеніту $As(III)$, тоді як арсенітооксидаза окислює арсеніт назад до арсенату, впливаючи на рухливість і токсичність миш'яку в навколишньому середовищі.

РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ, МАТЕРІАЛИ ТА ХІД ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Методика збору зразків ґрунту з різних частин міста

Методика відбору зразків ґрунту залежить від мети проведення досліджень. Зразок повинен відображати середній стан об'єкта, який вивчається. Точність обстеження значною мірою відрізняються від площі елементарної ділянки та частини відібраних з неї точених (індивідуальних) проб, з яких складаються репрезентативний змішаний (об'єднаний) зразок ґрунту для аналізу.

Правильний збір зразків ґрунту включає три принципи [104]:

1. Хороша організація: наявність системи для збору проб ґрунту їх обробки спрощує вибірку збір і мінімізує шанс людської помилки, таких як неправильне маркування або неправильне розміщення зразків ґрунту.

2. Постійність: збір кожного зразка в однорідний спосіб між роками та протягом одного заходу значно покращить якість і надійність результатів. Це означає, що брати зразки в один і той же час для кожного зразка.

3. Простота: дотримання простих процедур допоможе забезпечити послідовність і легкість організації збору зразків. Перш ніж збирати зразки ґрунту, потрібно буде зібрати певні матеріали та інструменти:

- Ґрунтовий зонд
- Чисте пластикове відро
- Кельма
- Перманентні маркери
- Пакети для зразків. Багато лабораторій для дослідження ґрунту надають мішки для зразків, вкриті воском. Замість пакетів, які надаються в лабораторії, розгляньте можливість використання паперових пакетів або пакетів на блискавці.
- Буфер обміну та паперовий або польовий блокнот
- Смартфон або портативний *GPS*-пристрій із підтримкою *GPS*

(додатково) Перед прибуттям на поле визначте кількість і орієнтовне місце взяття проб ґрунту.

2. Після збору відповідних матеріалів ми вирушили до першого місця відбору проб. Корисно використовувати *GPS* для більш точного визначення місць збору зразків.

3. У місці взяття зразка видаляємо будь-які рослинні залишки з поверхні ґрунту.

4. Вставляємо зонд для ґрунту на потрібну глибину. Треба слідкувати за тим, щоб зонд вставлявся вертикально в ґрунт і не був нахилений убік. Виймаємо зонд і переміщаємо серцевину ґрунту із зонда у відро. Вставляємо зонд вертикально в ґрунт і видаліть серцевину ґрунту.

5. Переходимо на нове місце та повторяємо кроки 3 і 4.

Загалом, що більша площа землі, яку ви відбираєте, тим більша відстань потрібна між місцями відбору. Як приблизний орієнтир, місця відбору проб повинні бути відокремлені щонайменше 20–30 футів.

Якщо використовується програма відбору проб ґрунту на основі зони або сітки, часто варто вибрати місце для зразків ґрунту до прибуття в поле для відбору проб. Ці попередньо визначені точки можна завантажити на пристрій із підтримкою *GPS*, і за допомогою *GPS* можна спрямувати вас до місця взяття проб.

6. Продовжуємо цей процес збору зразків у нових місцях, доки ми не зберемо достатню кількість зразків.

7. За допомогою кельми ретельно перемішуємо ґрунт у відрі до отримання однорідної суміші.

8. Помістіть 1–2 чашки суміші в пакет для зразків. Використовуючи перманентний маркер, позначаємо сумку унікальною назвою. Імена повинні містити ідентифікатори поля та номер зразка. Наприклад, «*Davidshaht with vegetation*» є хорошою міткою, яка ідентифікує місце збору та стан ґрунту.

2.2 Плавка ґрунтових зразків

Загальний вміст елементів у зразках ґрунту можна визначити в ґрунті, розплавленому при високій температурі.

Матеріали:

Ґрунтові матеріали: сухий зразок ґрунту (сушили при 105 градусах протягом ночі, сухий матеріал подрібнювали в ступці.

Плавильник: 40 г карбонату натрію і 40 г карбонату калію.

Розчин: 2 М HNO_3 і 0,5 М лимонна кислота.

Процедура:

- приготували 500 мг сухого зразка ґрунту в нікелевій посудині.
- додали 2 г плавника (Na_2CO_3 і K_2CO_3)
- нагріли при 900 град в розчині 2 М HNO_3 і 0,5 лимонної кислоти.
- перемішали зразок скляною паличкою, поки реакція не закінчилася і все не розчиниться
- перенесли зразок у пробірку на 50 мл
- додали кислоту до позначки 50 мл.

Для зважування зразків використовувалися високоточні аналітичні ваги *AS R2 «Radwag»*, що дозволяють після калібрування отримувати значення з точністю до 0,00001 г.

Процедура зважування наведена на рис. 2.1.

Після контрольного зважування досліджені зразки підлягали висушуванню та плавки в муфельній печі, рис. 2.2.



**Рисунок 2.1 – процес зважування зразків за допомогою аналітичних ваг
*AS R2 «Radwag»***



Рисунок 2.2 – процес плавки зразків ґрунту

Після зважування та первинної підготовки зразків здійснювалася оцінка pH за наведеною нижче методикою.

2.3 Перевірка зразків на кислотність та солоність

Існує декілька методів вимірювання віх показників у лабораторних умовах.

1. Вимірювання pH за допомогою індикатора. Ця категорія в основному включає два методи: один передбачає порівняння стандартного кольору, що відповідає відомому pH , із кольором індикатора, зануреного в досліджувану рідину за допомогою буферного розчину. Інший метод передбачає підготовку паперу для тестування pH , який змочують індикатором, потім занурення паперу в досліджувану рідину та порівняння його кольору зі стандартним кольором. Цей метод простий, але схильний до помилок. Не можна очікувати високого ступеня точності.

- Помилка через високу концентрацію солі в досліджуваній рідині
- Помилка через температуру досліджуваної рідини
- Помилка через органічні речовини в досліджуваній рідині

Індикаторний метод не може вимірювати pH високочистої води, оскільки вплив самого індикатора занадто великий.

2. Метод водневого електроду Водневий електрод виготовляють шляхом додавання платинової сажі до платинового дроту або платинової пластини. Його занурюють у досліджуваний розчин і до розчину прикладають електричний заряд, і розчин насичується газоподібним воднем. Потенціал електрода вимірюється між платиново-чорним електродом і електродом із хлориду срібла. Цей потенціал обернено пропорційний pH розчину. Метод водневого електрода є стандартним серед різних методів вимірювання pH . Значення, отримані за допомогою інших методів, стають достовірними лише тоді, коли вони збігаються з виміряними методом водневого електрода. Однак цей метод не підходить для щоденного використання через витрати зусиль і витрат, незручність роботи з газоподібним воднем і великий вплив речовин, що сильно окиснюють або відновлюють, у досліджуваному розчині.

3. Метод квінгідронного електрода. Коли хінгідрон додається до розчину, він розпадається на гідрохінон і хінон. Оскільки розчинність хінону змінюється залежно від значення pH розчину, pH можна визначити за напругою між платиновим електродом і порівняльним електродом. Незважаючи на те, що цей метод простий, він рідко використовується сьогодні, оскільки він не працює, якщо задіяні речовини, що окислюють або відновлюють, або коли досліджуваний розчин має pH вище 8 або 9.

4. Метод сурм'яного електрода. Цей метод передбачає занурення кінчика полірованого стержня сурми в досліджуваний розчин, а також занурення електрода порівняння та вимірювання pH за різницею потенціалів між ними. Колись цей метод широко використовувався, оскільки прилад міцний і простий у використанні. Однак його застосування зараз досить обмежене, оскільки

результати змінюються залежно від ступеня поліровки електрода, а відтворюваність низька.

5. Метод скляного електрода. Метод скляного електрода використовує два електроди, скляний електрод і електрод порівняння, для визначення pH розчину шляхом вимірювання напруги (потенціалу) між ними. Цей метод є найбільш часто використовуваним для вимірювання pH , оскільки потенціал швидко досягає рівноваги та демонструє хорошу відтворюваність, а також оскільки метод можна використовувати для різних типів розчинів, причому окислювачі або відновлювачі мають дуже незначний вплив на результат. Метод скляного електрода широко використовується не тільки в промисловості, але і в багатьох інших сферах.

6. Напівпровідникові сенсорні методи Напівпровідниковий датчик pH , розробка якого почалася приблизно в 1970 році, замінює скляний електрод на напівпровідниковий чіп. Цей датчик, відомий як іонно-чутливий польовий транзистор (*ISFET*), не тільки стійкий до пошкоджень, але й легко мініатюрний. Мініатюризація дозволяє використовувати меншу кількість зразків для вимірювання та робить можливим виконання вимірювань у дуже невеликих просторах і на твердих поверхнях. [105, 106]

Після плавлення зразків, нами було вирішено використати метод скляного електрода, завдяки його точності та універсальності, для перевірки показників Ph та солоності рідинних зразків.

1. Увімкнули pH -метр.
2. Промили електроди pH -метра водою перед використанням кожного розчину та після завершення процедур. Використовуваний буферний розчин можна скидати в злив раковини.
3. Занурили калібрований pH -метр у ґрунтовий розчин і обережно перемішайте pH -метром близько 1 хвилини.
4. Дозволили показанню стабілізуватися та записали показання.
5. Промили та очистили pH -метр водою, замінили ковпачок.

2.4 Процедура екстракції ДНК зі зразків ґрунту

Примітки перед початком необхідно:

- Переконайтеся, що пробірки *PowerBead Pro* вільно обертаються в центрифугу без тертя, рис. 2.3.

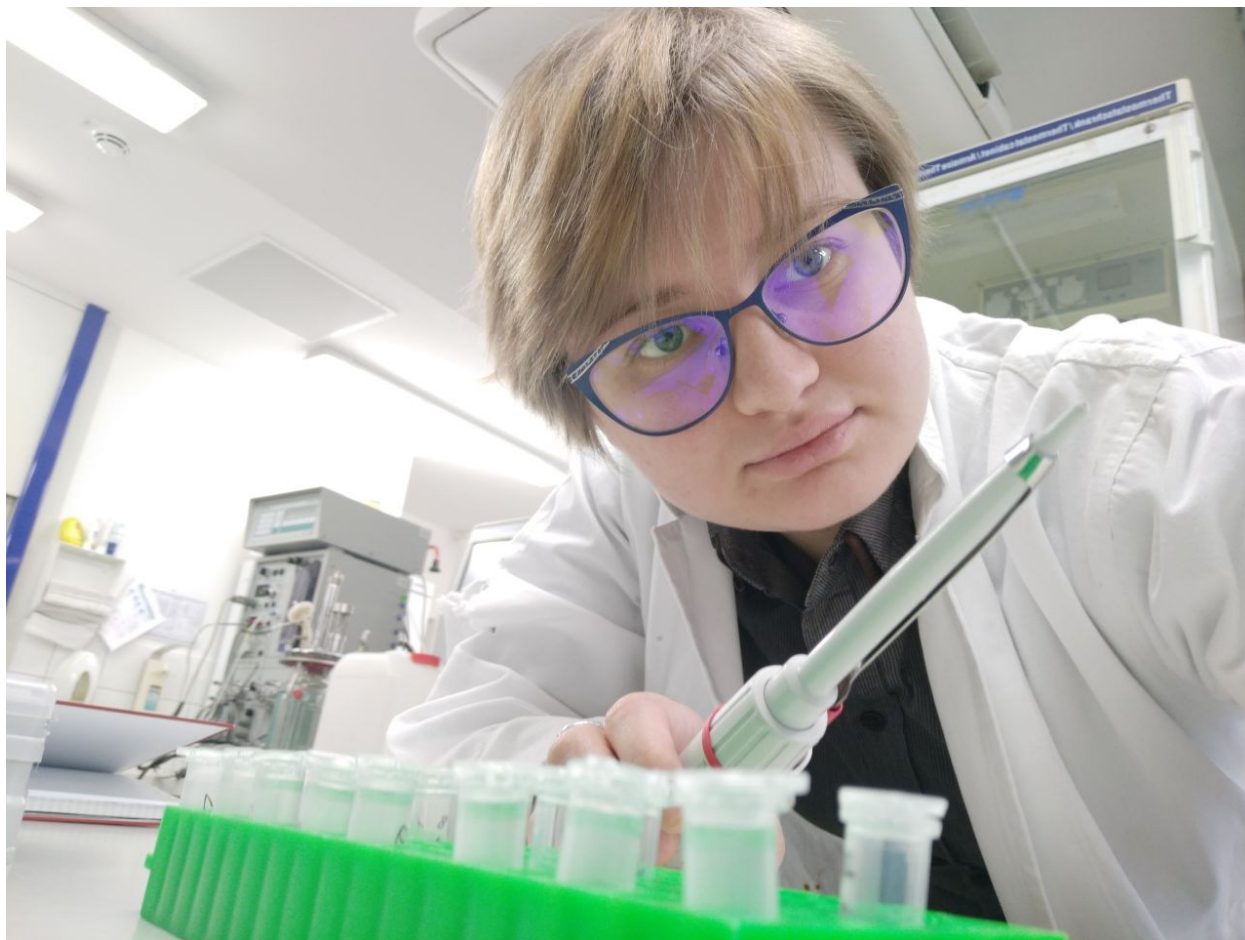


Рисунок – 2.3 Процес підготовки зразків до екстракції

- Якщо розчин *CD3* випав в осад, нагріваємо його при 60°C, поки осад не розчиниться.

- Виконуємо всі етапи центрифугування при кімнатній температурі (15–25°C).

1. Покручуємо пробірку *PowerBead Pro Tube*, щоб переконатися, що залишки осіли на дні. Додайте до 250 мг ґрунту та 800 мкл розчину *CD1*. Коротко збовтайте (~5 с), щоб перемішати.

2. Закріплюємо пробірку *PowerBead Pro Tube* горизонтально на адаптері *Vortex* для пробірок об'ємом 1,5–2 мл. Збовтуйте на максимальній швидкості

протягом 10 хв. Примітка: якщо ви використовуєте *Vortex Adapter* для більш ніж 12 підготовчих робіт одночасно, збільште час вортексу на 5-10 хв.

3. Центрифугуємо пробірку *PowerBead Pro Tube* при $15\ 000 \times g$ протягом 1 хв.

4. Переносимо супернатант у чисту мікроцентрифужну пробірку об'ємом 2 мл. Примітка: Очікуйте 500-600 мкл. Надосадова рідина все ще може містити частки ґрунту.

5. Додаємо 200 мкл розчину *CD2* і перемішайте протягом 5 с.

6. Центрифугуємо при $15\ 000 \times g$ протягом 1 хв при кімнатній температурі. Уникаючи преципітат, перенесіть до 700 мкл супернатанту в чисту мікроцентрифужну пробірку на 2 мл. Примітка: Очікуйте 500-600 мкл.

7. Додаємо 600 мкл розчину *CD3* і перемішайте протягом 5 с.

8. Завантажуємо 650 мкл лізату в *MB Spin Column* і центрифугуйте при $15\ 000 \times g$ протягом 1 хв.

9. Зливаємо наскрізну рідину та повторіть крок 8, щоб переконатися, що весь лізат пройшов через фільтр *MB Spin Column*.

10. Обережно поміщаємо *MB Spin Column* у чисту *Collection Tube* на 2 мл. Уникайте попадання рідини на фільтр.

11. Додаємо 500 мкл *Solution EA* до *MB Spin Column*, центрифугуйте при $15\ 000 \times g$ 1 хв.

12. Позбавляємося рідини та помістіть фільтр *MB Spin Column* назад в теж саму *Collection Tube* 2 мл.

13. Додаємо 500 мкл *Solution C5* до *MB Spin Column*, центрифугуйте при $15\ 000 \times g$ протягом 1 хв. 14. Відмовтеся від потоку та помістіть колонку *MB Spin* у нову *Collection Tube* на 2 мл.

15. Центрифугуємо при швидкості до $16\ 000 \times g$ протягом 2 хв. Обережно помістіть *MB Spin Column* в новий *Elution Tube* об'ємом 1,5 мл (у комплекті)

16. Додаємо 50 мкл розчину С6 (або води) у центр білої мембрани фільтра.

17. Центрифугуємо при $15\ 000 \times g$ протягом 1 хв. Викиньте *MB Spin Column*. Тепер ДНК готова до подальшого застосування.

Примітка. Ми рекомендуємо зберігати ДНК у замороженому стані (від -30 до -15°C або від -90 до -65°C), оскільки розчин С6 не містить EDTA. Щоб сконцентрувати ДНК, зверніться до посібника з усунення несправностей.

ДНК-екстракція зразка 2

1) Вага 250 мг (0,25 г) зразка.

2) Додаємо 800 мкл *CDA*, перемішайте протягом 5 секунд

3) Перемішуємо протягом 10 хвилин (перед цим ви також можете помістити свої зразки у водяну баню на 10 хвилин для більш ефективної екстракції).

4) Центрифугуємо 15000 разів протягом 1 хвилини.

5) Переміщаємо супернатант у мікроцентрифужну пробірку на 2 мкл [107].

2.5 Використання спектрофотометра *NanoDrop 2000c* для вимірювань

Протокол для спектрофотометра *NanoDrop 2000c* [108]

Переконаємося, що комп'ютер увімкнено. Комп'ютер старий, на нього знадобиться багато часу стартап. Система ввімкнена, якщо монітор і комп'ютерна вежа мають зелений світлодіод їхні кнопки живлення.

1. Значок програми спектрофотометра *NanoDrop 2000* розташований зліва екран комп'ютера. Двічі клацніть, щоб запустити програму.

2. Коли програма відкриється, вибираємо вкладку типу аналізу, який ви бажаєте виконати (наприклад, вкладка «Нуклеїнова кислота» обчислює концентрацію ДНК або РНК у зразку). Натисніть відповідну вкладку. Більшість

NanoDrop використовується в лабораторії *СМВВ* полягає в отриманні концентрації ДНК. *Nanodrop* також можна використовувати як а спектрофотометр клітинних культур (вкладка *Cell Cultures*), але займає набагато більше часу порівняно з протоколом спектрофотометра *DU 800*.

3. Для концентрації ДНК і РНК клацніть вкладку «Нуклеїнова кислота».

4. Коли програма відкриється, спливаюче вікно сповістить користувача про виконання процедури перевірки довжини хвилі необхідно завершити. Перш ніж дозволити програмі завершити перевірку довжини хвилі, спочатку переконайтеся, що датчик *NanoDrop* вільний будь-яке сміття. Відкрийте руку *NanoDrop*. Візьміть серветку *Kim Wipe*, розташовану в робочій зоні і очистіть датчик у двох місцях, як показано нижче.

5. Після чищення обережно опустіть руку *NanoDrop* (не стукайте рукою вниз або дозволити впасти).

6. Після того, як ви почистили *NanoDrop* і опустили руку, натисніть ОК кнопку для початку звичайної перевірки довжини хвилі. Ви почуєте запуснути машину на кілька секунд.

7. Ви повинні очистити машину перед вимірюванням концентрації. Підніміть *NanoDrop Arm* і розподіліть 1,5 мкл бланк-розчину безпосередньо на верхню частину Нанокрапельний сенсор (Бланкувальним розчином має бути використовуваний розчинник ресуспендують нуклеїнову кислоту, напр. вода, 1x TE).

8. Після того, як ви завантажили бланк-розчинник на датчик, опустіть важіль і натисніть кнопку «Пустий» у верхньому лівому куті комп'ютерної програми.

9. Потім машина знову запрацює, поки вона очищає розчинник. Одного разу заготовка завершено, у верхньому лівому куті засвітиться зелена кнопка вимірювання комп'ютерна програма. Підніміть тримач *NanoDrop* і видаліть будь-яку серветкою залишків розчинника від датчика, а також металевого ковпачка, розташованого на руці. Це зменшить забруднення між пробами. 10.

Переконайтеся, що зразок для зчитування правильно підвішений. Додайте 1,5 мкл нанесіть пробу на датчик *NanoDrop* і закрийте руку.

11. У верхньому правому куті комп'ютерної програми виберіть тип нуклеїнової кислоти читати. Тримайте коробку прямо праворуч, показуючи 50,00. Нижче виберіть одиниці вимірювання для розрахунку концентрації (у більшості випадків використовуйте нг/мкл). Натисніть кнопку *Green Measure*, розташовану у верхньому лівому куті комп'ютера програма.

12. Програма завершить обчислення вимірювань і відкриє спливаюче вікно а вікно, щоб ви могли зберегти свої дані. Виберіть папку (ви можете створити папка для зберігання інформації в Моїх документах). Якщо ви не хочете зберігати інформації, просто виберіть скасувати. Концентрація зразка буде відображається в *Конц. Вікно*, розташоване у верхньому правому куті програми. Серія Нижче також показано обчислення, найважливішим з яких є Розрахунок 260/280. ДНК повинна мати 260/280 від 1,8 до 2,0, РНК має бути вище 2,0. Забруднена ДНК матиме низький показник 260/280 нижче 1,8.

13. Вимірювання дасть і виведе залежність довжини хвилі від поглинання. Нижче програма тимчасово зберігає інформацію із зразка, включаючи концентрації та 260/280.

14. Зробіть два вимірювання кожного зразка, щоб переконатися, що ви отримали правильні показники справжньої концентрації зразків. Обов'язково очистіть датчик і кришку між читанням і повторенням кожного зразка. 15. Після завершення переконайтеся, що сенсор *NanoDrop* і металева кришка очищені залишків за допомогою серветки. Обов'язково опустіть руку. Збережіть будь-які дані і закрийте програму. Залиште комп'ютер увійшли в систему та працює для майбутнього використання.

2.6 Гель електрофорез

1. Маленький гель: зважте 0,75 г агарози та додаємо 50 мл буферного розчину *1xTAE (tris-acetate-EDTA)*, ставимо в мікрохвильову піч на 1-2 хв до повного розчинення агарози (додаємо H_2O) залишити охолоджуватися

(приблизно до 60°C) додати 5 мкл *pEqGreen* (VWR) повільно налейте гель у тримач/бак вставте гребінець залишити застигати приблизно на 1 год.

2. Підготовка зразків: додаємо 5 мкл барвника *loading dye* (6x) до кожного зразка нанесіть по 15 мкл зразка в гель) електрофорез: заповнюємо резервуар для гелю 1xTAE завантажте в першу лунку маркер (3 мкл *GeneRuler 1kb DNA Ladder*; *Thermo Scientific*) продовжить завантажувати зразки запусить гель при 70-80 В протягом приблизно 45 хв, рис. 3.4.

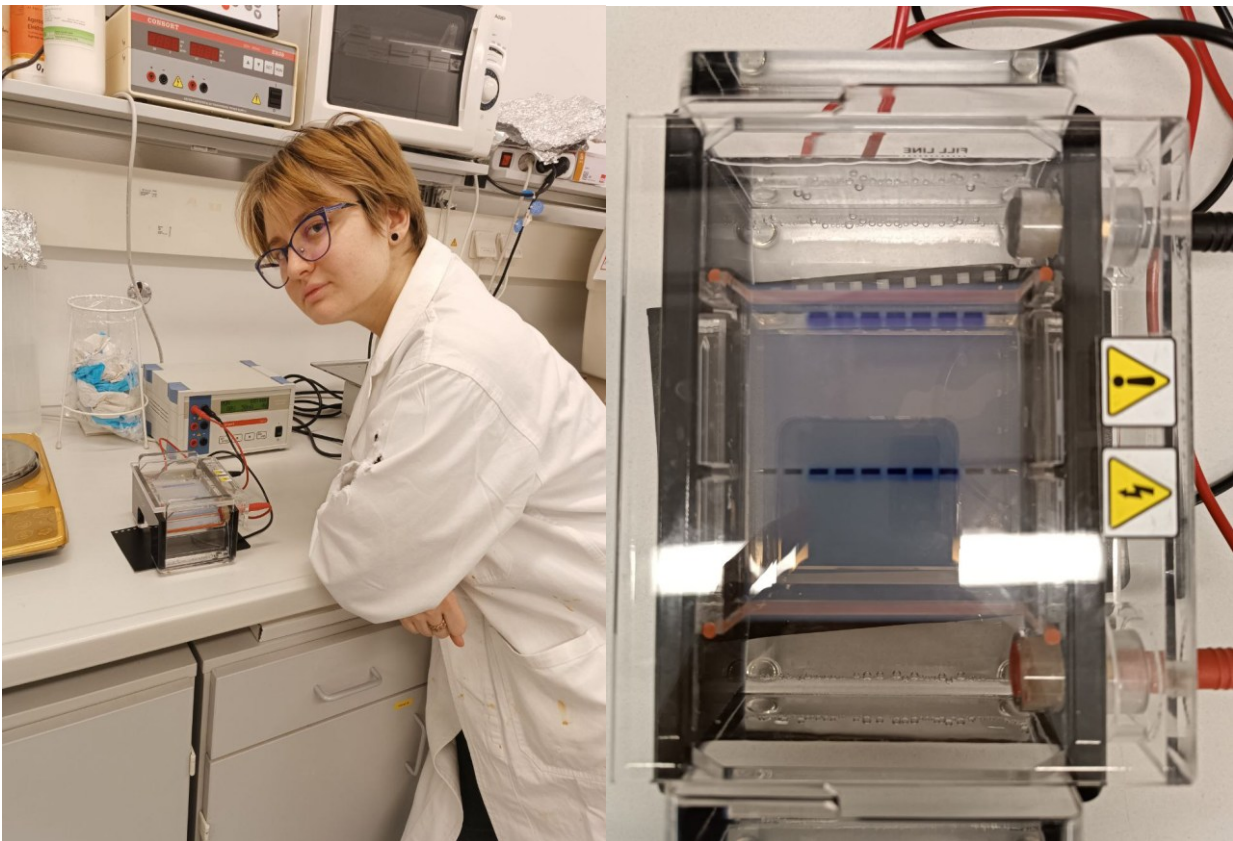


Рисунок 2.4 – Процедура гель електрофорезу

3. Візуалізуємо УФ-свілом у програмі *Image Lab 5.2.1*

4. Великий гель: зважуємо 2 г агарози та додаємо 10 мл буферного розчину 1xTAE (*tris-acetate-EDTA*) поставте в мікрохвильову піч на 1-2 хв до повного розчинення агарози (додавайте H_2O) залишити охолоджуватися (приблизно до 60°C) додати 8 мкл *pEqGreen* (VWR) повільно налейте гель у тримач/бак вставте гребінець залишити застигати приблизно на 1 год, рис. 2.5.



Рисунок 2.5 – агароза, що використовується для приготування гелю

5. Підготовка зразків: додаємо 3 мкл барвника *loading dye* (6x) до кожного зразка нанесіть по 15 мкл зразка в гель

6. Гель електрофорез: заповнюємо резервуар для гелю *1xTAE* і завантажуюмо в першу лунку маркер (3 мкл *GeneRuler 1kb DNA Ladder; Thermo Scientific*) продовжити завантажувати зразки запусить гель при 80–90 В протягом приблизно 1–2 хв

2.7 Праймер тест

1. Перевіряємо специфічність праймера за допомогою *PCR*:

25–30 мл чистої культури, а також біомаси *Rhizobium* з екстракції ДНК (набір Power Soil pro Kit (*QIAGEN*)) -> елюювання 50 мкл води, вимірювання концентрації ДНК – *Nanodrop* (*NIKON*)

2. Перевіряємо якість та ампліфікованість ДНК за допомогою 16S- *PCR*

Підготовка праймерів: готуємо 100 мкМ основний розчин праймера та розчиняємо кожен праймер у відповідному розчині для *PCR*: готуємо аліквоту 10 мкМ з кожного вихідного праймера зберігати обидва при -20 °С

Таблиця 2.1 – Результати досліджень амінокислот

Мета	Назва	Послідовність 5'-3'	[bp]
<i>Acidithiobacillus caldus</i> DSM 8584	<i>Acaldus_F</i> <i>Acaldus_R</i>	<i>CGGATCCGAATACGGTCTG</i> <i>TCAGCACCTAAGGCGCCAA</i>	396
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> DSM 14647	<i>Lepto_fp_F</i> <i>Lepto_fp_R</i>	<i>GAAGGCTTTCGGGTTGTAAACCAC</i> <i>TTAAGCCACGGCCTTTCACCAA</i>	210
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>At_ferro_F</i> <i>At_ferro_R</i>	<i>AGGTGGGTTCTAATACAATCTGCT</i> <i>TTGTGCGGGCCCCCGTCAAT</i>	485

Стандартна *PCR* із чистою культуральною ДНК як матрицею та згаданими парами праймерів підготуйте одну головну суміш для кожної пари праймерів (таблиця нижче), табл. 2.2

Таблиця 2.2 – Результати досліджень

Reaction mixture	[μ l]	8 x mastermix [μ l]
Water	5,3	42,4
2x master mix	7,5	60
primer for [10 μ M]	0,6	4,8
primer rev [10 μ M]	0,6	4,8
DNA (1:10 diluted)	1	
total volume	15	

Переносимо 14 мкл майстер-міксу в пробірки для PCR;

Додаємо 1 мкл розведеної 1:10 ДНК з *Rhizobium* або *Acidiphilium* у 16 пробірок кожна;

Запускаємо наступну програму pcr (red cycler), табл. 2.3.

Таблиця 2.3 – Результати досліджень

<i>Температура</i>	<i>Тривалість</i>	<i>Program: Gradient nr 15: P Test</i>
94 °C	5 min	<i>Repeat</i>
94 °C	30 s	30x
60 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	5 min	
15 °C	<i>forever</i>	

Тривалість експерименту: 1 год

2.8 Microwave

Після зважування подрібненого рослинного матеріалу (приблизно 0,1 г) у мікрохвильового зразку посудини додають такі хімікати:

1. Змочіть зразок 0,2 мл води (використовуйте ультрачисту воду).
2. Додати 1,9 мл 65% азотної кислоти (HNO_3), залиште на ніч під витяжною для реакції!
3. Наступного дня додайте 600 мкл фтористоводної кислоти (HF 4.8%), розведеної 1:10.

Захисні засоби:

На робочому місці робота із засобами захисту зору; HF - відповідні рукавички і жовтий лабораторний халат.

Використані наконечники піпетки зберігають у поліпропіленовій тарі з розчином $CaCl_2$.

Рукавички та робоче місце очищують розчином очищують розчином $CaCl_2$, потім знову деонізованою водою.

З метою безпеки гель кальцію глюконату зберігають під витяжною шафою і в холодильнику.

4. Заповніть 10 мл DI води у великі зовнішні посудини та зберігають (поставте кришки на три посудини для мікрохвильової печі, помістіть їх у тримач зразків і у великі посудини.

5. Увімкніть мікрохвильову піч (*ON/OFF*), запустіть термінал, увійдіть як *USER (PIN:123)*, натисніть *PREP*, виберіть програму *E212_200°C.mpr* і натисніть кнопку *START*.

Програма працює протягом 1 год, а потім настає час охолодження щонайменше 2 год.

УВАГА! Охолодження до 30°C!

6. Перенесіть рідку фазу в центрифужні пробірки об'ємом 15 мл, двічі промийте пробірки для зразків надчистою водою та перемістіть, допоніть до кінцевого об'єму 10 мл.

7. Зберігати зразки в холодильнику, розведення 1:10 для вимірювання *ICP – MS+*

Додати 100 мкл стандарт Ru/Re в 10 мл проби

8. Етап очищення: 3,0 мл очищення суміші (1:1 DI:*HNO₃*) і знову 10 мл DI у зовнішніх ємностях, зберіть і запустіть програму *reinigung+abkuhlen.mpr*

Після охолодження до 30°C двічі промийте мікрохвильові посудини для зразків надчистою водою та поставте їх у сушильну піч при 60°C.

2.9 Фотометричне визначення фосфатів, нітратів і амонію в ґрунтах і ґрунтовий розчин

Спочатку має бути зроблено відповідні елюати свіжих зразків ґрунту, які згідно з відповідними стандартами DIN можуть визначити кількість PO_4^{3-} , NO_3^- та NH_4^+ у зразках ґрунту та води. Для визначення фосфатів і нітратів у ґрунтовому розчині зразки повинні бути додані лише відповідними реагентами (відповідно до стандарту DIN) і виміряні на відповідній абсорбції.

Виробництво ґрунтових елюатів:

PO₄³⁻

- з подвійним лактатним методом (DL). Приготування базового розчину DL-розчину: 25 мл до 0,5 л води (придатний до 3 днів, але найкраще свіжоприготовлений).

- Зважте 10 г/3 г свіжого ґрунту та додайте 100 мл/30 мл розчину DL, дайте суміші струшувати протягом 2 години, після чого центрифугуйте при 5000 об/хв (обертів за хвилину), а потім витягніть супернатант у пробірку на 15 мл перед зберіганням у холодильнику.

NH₄⁺

- Зважте 10 г/3 г ґрунту та додайте 100 мл/30 мл 1-молярного розчину KCL, суміш струшувати протягом 2 годин, після чого відцентрифугуйте її при 5000 об/хв (обертів на хвилину), а потім витягніть супернатант у 15 мл пробірку перед зберіганням у холодильнику.

NO₃⁻

- Зважте 10 г/3 г ґрунту та додайте 100 мл/30 мл дистильованої води, дайте суміші струшувати протягом 2 годин після які центрифугують при 5000 об/хв (обертів за хвилину), а потім екстрагують супернатант у пробірку на 15 мл перед зберіганням у холодильнику.

Дуже важливо: якщо необхідно, відцентрифугуйте ґрунтові елюати, щоб отримати прозорий елюат.

Визначення амонію за допомогою індофенолу (DIN 38406/5):

Іони NH₄⁺ реагують за рН приблизно 12,6 з гіпохлоритом і саліцилатом у присутності пентаціанонітрозилферату натрію (III) дигідрату/натріумпентаціанонітрозилферату (каталізатор) до синього барвника (індофенолу), де гіпохлорит утворюється в лужному середовищі шляхом гідролізу дихлорізоціанурової кислоти.

Реагент 1: саліцилат натрію (130 г/л) + тринатрій цитрат (130 г/л) + пентаціанонітрозилферат натрію (III) дигідрат/ пентаціанонітрозилферат (968 мг/л).

Реагент 2: NaOH (36 г/л) + дихлорізоціанурат натрію (2 г/л) → NaOCl , тобто 3,2 г NaOH у 100 мл дест. води + 200 мг дихлорізоціанурат натрію (завжди виготовляйте свіжим!)

Виконання: Зразок повинен бути в діапазоні pH 5–8. Додайте 1 мл реагенту 1 до 10 мл зразка (грунтових елюатів), а потім струсіть. Після чого додають 1 мл реагенту 2 і суміш струшують.

Принаймні через 1 годину абсорбцію можна виміряти при 655 нм у кюветі діаметром 1 см проти бланка.

Важливо: Холосте значення для зразків ґрунту необхідно підготувати з 1 М розчину KCl . 10 мл 1М KCl + реагент 1, потім струсіть. Знову додайте реагент 2 до суміші та струсіть.

Визначення фосфату за допомогою молібденового синього (DIN EN ISO 6878):

Тут використовується реакція ортофосфат іонів у сильнокислому розчині з іонами молібдату та сурми з утворенням комплексу сурма-фосфомолібдат. Цей комплекс відновлюється аскорбіновою кислотою до сильно забарвленого молібденового синього комплекс.

Реагент 1: Аскорбінова кислота (100 г/л) 10% аскорбінової кислоти, тобто 10 г у 100 мл дистильованої води.

Реагент 2: тетрагідрат гептамолібдату амонію (26 г/л) + напівгідрат оксиду тартрату калію (III) (700 мг/л), розчинений у 50% сірчаній кислоті.

Виконання: 0,2 мл реагенту 1 додають до 8 мл зразка (грунтового елюат) і потім струшують, після чого до суміші додають 0,4 мл реагенту 2.

Принаймні через 10 хвилин і не пізніше ніж через 30 хвилин абсорбцію можна виміряти при 880 нм проти порожнього розчину DL.

Важливо: Розведення DL-грунтового елюату 1:1. Візьміть 4 мл зразка (грунтового елюат) і заповніть до 8 мл дистильованою водою. Порожнє значення для зразків ґрунту виробляють з розчином DL.

Визначення нітрату 4-нітро-2,6-диметилфенолу (DIN 38405-9):

Відповідно до DIN 38405-9 нітрат визначається 4-нітро-2,6-диметилфенолом. Нітрат іони в розчині сірки та фосфорної кислоти реагують з 2,6-диметилфенолом з утворенням 4-нітро-2,6-диметилфенолу.

Реагент 1: концентрована сірчана кислота і концентрована фосфорна кислота в співвідношенні 1:1. Будь обережний. Змішування цих двох кислот нагріває скляний посуд, що містить суміш. Рекомендується не торкатися скляного посуду до 5 хвилин, коли він повинен охолонути.

Реагент 2: диметилфенол (1,2 г/л) у концентрованій оцтовій кислоті 126 мг диметилфенолу в 100 мл.

Концентрована оцтова кислота

Виконання: 4 мл реагенту 1 додавали до 0,5 мл зразка (грунтового елюату). [тут тільки перевірте об'єм, АЛЕ не струшуйте!], а потім додайте 0,5 мл реагенту 2 перед інтенсивним струшуванням!

ПРИМІТКА: реагент 1 додано до зразка, а НЕ зразок до реагенту 1

Через 15 хвилин абсорбцію можна виміряти при 338 нм проти холостого зразка, приготовленого додаванням реагенту 1 до 0,5 мл дистильованої води з подальшим додаванням реагенту 2, після чого суміш енергійно струшують. Вимірювання слід проводити лише через 15 хвилин після струшування, оскільки через високу в'язкість доданої сірчаної кислоти бульбашки, що утворюються, можуть призвести до помилкового результату аналізу.

Важливо: бланк готують шляхом додавання реагенту 1 до 0,5 мл дистильованої води з наступним додаванням реагенту 2, після чого суміш енергійно струшують.

Визначення загального органічного вмісту

Щоб визначити загальний вміст органічних речовин у зразках ґрунту, 15 порожніх керамічних горщиків зважують і нагрівають у печі до температури 550 °C протягом години, щоб видалити будь-які забруднення з горщиків. 5 г висушених при 60 °C зразків ґрунту зважують у кожен горщик і нагрівають при

550 °C протягом 3 годин. Потім горщики охолоджують в ексикаторі та зважують, щоб визначити втрату органічного вмісту.

Ємність катіонного обміну (С.Е.С)

Для визначення ємності катіонного обміну зразків ґрунту потрібні три реактиви згідно Міжнародна організація зі стандартизації (ISO) 3696.

Реагент 1: 24,43 г дигідрату хлориду барію ($BaCl_2, 2H_2O$) розчиняють у деіонізованій воді (20 °C) і заповнюють деіонізованою водою до 1000 мл для утворення 0,1 М розчину.

Реагент 2: 25 мл розчину хлориду барію з концентрацією 0,1 М розбавляють деіонізованою водою до 1000 мл до утворення 0,0025 М розчину.

Реагент 3: 4,93 г гептагідрату сульфату магнію ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) розчиняють у деіонізованому воді (20 °C) і доповнюють до 1000 мл для утворення 0,02 М розчину.

Метод:

2,50 г висушених при 60 °C зразків ґрунту зважують у центрифужні пробірки місткістю 50 мл. Вимірюється маса кожної пробірки, що містить зразок. 30 мл реагенту 1 додають у ґрунт і дають струшувати на годину. Розчин у пробірках декантують піпеткою після центрифугування при 5000 об/хв протягом 10 хвилин. Цю процедуру повторюють тричі. Реагент 2 додають до зразків ґрунту та залишають струшують протягом 11 годин, після чого розчин декантують піпеткою та вимірюють масу пробірки. У кожну пробірку додають 30 мл реагенту 3 і дають струшувати протягом 11 годин. 5 мл розчину є піпеткою вносять у пробірку на 15 мл для аналізу ICP-MS. Порожній розчин готують за описаною вище процедурою без додавання ґрунту.

Послідовне вилучення

Послідовна екстракція – це аналітичний процес, який хімічно вимиває метали з ґрунту, опадів і зразків мулу (Divvela, 2010). Рухливість елементів за різних природних умов, *pH* і органічного вмісту є головною увагою під час екстракції. Мета полягає, щоб дізнатися, які елементи легко обмінюються, окислюються та відновлюються в оточуючій ґрунтовій воді, табл. 2.4

Таблиця 2.4 – Основні етапи вилучення

Етапи вилучення	Екстрагована фаза	Виконання
I	Легко відокремлюванні та замінні елементи/зв'язані речовини	<ul style="list-style-type: none"> ● 1г розчину помістіть у пробірки об'ємом 50 мл (висушені при 60 °С) протягом 24 год, струшувати з 1М розчином ацетату амонію (доведіть $pH=7$ за допомогою 25% розчину амонію). ● Центрифугуйте пробірки протягом 10 хв. після чого супернатант перенесіть у тюби/флакони по 15 мл і зберігайте в холодильнику.
II	Карбон зв'язаний/кислотно-розчинний	<ul style="list-style-type: none"> ● Додайте 1 М ацетату амонію до зразка до позначки 50 мл і струшуйте протягом 4–5 годин. За допомогою оцтової кислоти доведіть pH розчину до 5.
III	Органічні та окислюванні речовини	<ul style="list-style-type: none"> ● Додайте до зразка 0,5 мл H_2O_2 і залиште відкритим на ніч. ● Наступного дня додайте 100 мкл HNO_3 ($pH = 3$, перевірте!) до зразка та при температурі 80°C додайте загалом 8–10 мл H_2O_2, крок за кроком, порціями по 100 мкл протягом часу приготування 5 годин. ● Після варіння при 80°C протягом 1 години, готуйте зразок при 90-100°C для випаровування H_2O_2, потім додайте 1М розчин ацетату амонію (pH доведений до 7 за допомогою 25% розчину аміаку) до позначки 50 мл. ● Струсіть 30–45 хвилин, відцентрифугуйте та видаліть супернатант у 15 мл пробірку. ● Промийте зразок дистильованою водою
IV	Аморфні оксиди, які легко відновлюються	<ul style="list-style-type: none"> ● Додайте 17,56 г щавлевої кислоти та 28,4 г оксалату амонію в пляшку та наповніть її до позначки 1 літр, використовуючи деіонізовану/дистильовану

		<p>воду.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Доведіть pH приготовленого 1 л розчину до 3,2 за допомогою 25% розчину аміаку ● Доповніть зразок до позначки 50 мл, додавши вже готовий розчин (pH 3,2) ● Збовтувати 4 години в темряві через високу реакційну здатність щавлевої кислоти. ● Центрифугуйте та видаліть супернатант у 15 мл пробірки.
V	Важко відновлюються і кристалічні оксиди	<ul style="list-style-type: none"> ● Зробіть 0,2 М оксалату амонію та 0,1 М і 0,1 М аскорбінової кислоти та доведіть до 1 л дистильованою водою. ● Отриманий розчин додавали до зразка до позначки 50 мл і варили при 95°C протягом 30 хвилин. ● Промийте зразок деіонізованою водою після приготування.
VI	Залишкова частина	<ul style="list-style-type: none"> ● Зразки знову висушують при 60° ● Розкладання плавленням (зразок + 2 г суміші 1:1 ● Суміш $CaCO_3/MgCO_3$) при 850 °C ● Екстракція зразка 2 М HNO_3 і 0,5 М лимонною кислотою.

2.10 Узагальнені результати аналізу мікробіому ґрунтів

Метою роботи було визначити наявність та кількість мікроорганізмів, здатних витримати життя в ґрунтах з високою концентрацією миш'яку за допомогою: збору зразків ґрунтів з різних частин міста, перевірка зразків на кислотність та соленість.

Екстракції ДНК з цих зразків, перевірка їх на наявність універсального для всіх мікроорганізмів гену, та ПЦР перевірка на наявність специфічних генів арсеніт-оксидази. Результати проведених досліджень наведені в табл. 2.5 – 2.11 та рисунках 2.6–2.9.

Таблиця 2.5 – Щоденник практики 19.11 –20.12.2022

Дата	Подія
19.11.2022	Збір перших 4 ґрунтових зразків
23.11-26.11.2022	Плавка отриманих зразків
28.11.2022	Вимірювання кислотності та електропровідності зразків 1-4, отримання додаткових 3 (5, 6, 7 див. таблиця 2.3) зразків. (інформація з приводу отриманих результатів див. Таблиця 2.8)
29.11.2022	Екстракція ДНК зразків 1-7, PCR на універсальний для всіх мікроорганізмів 16S
30.11.2022	Гельелектрофорез (1,5 agarose gel)
1.12.2022	Повторний PCR зразків 2,4,6,7, blank, +,-
5.12.2022	Екстракція ДНК з культур <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizobium trifoli</i> , <i>A.ferrooxidance</i> , <i>L.ferrooxidance</i> , <i>L.ferriphillum</i> , <i>Acidifilluum sp</i> , <i>A.caldus</i> Додали 2 нових зразка ґрунтів (8,9) Нова екстракція ДНК з зразків 1,2,5,8,9 PCR всіх 12 зразків (10 зразків в цілому та <u>позитивний і негативний + та –</u> в таблицях)
6.12.2022	Гелелектрофорезіс
7.12.2022	повторне PCR невдалих зразків, з розведенням: 1,-1:10-1uL 2-2,5 uL 2- 1uL 5-1:10-1uL 8-1:10-1uL 9-1:10-1uL 1В-1:50-1uL 2В-1:10-1uL 3В-1:10-2uL
08.12.2022	Плавління зразків 1-9 для ICP-MS Перевірка на кислотність та електрокондуктивність
09.12.2022	Плавління зразків 3,8

14.12.2022	ICP-MS
15.12.2022	-Прибирання після ICP-MS (Крок очищення 3,0 мл суміші (1:1 DI:1HNO3) і знову 10 мл DI у зовнішніх ємностях, потім зібрати та запустити програму. Після завершення програми ми дочекалися, поки вона охолоне до 30 градусів, промили посудини ультрачистою водою і поставили їх на 60 градусів у сушильну камеру.)
16.12.2022	.- ICP-MS
19.12.2022	- Тест праймерів чистих культур
20.12.2022	- Гельелектрофорезіс, Екстракція ДНК з 2 зразка, перевірка на спектрофотометрі, підготовка 1,5% гелю Стандартна ПЛР, використовували чисті культури як матрицю та праймери (невеликий 1,5% гель). Потім Primertest та градієнтну ПЛР для арсенатредуктази та оксидази (2% гель)
09.01.2023	Перевірка на якість ДНК і нашу придатність за допомогою 16S-ПЛР Тест специфічності праймерів для nitrogenase(<i>Geobacter</i> , <i>Rhizobium</i>) rusticyanin
10.01.2023	Тест специфічності праймерів для <i>Acidiphilium</i> , <i>Bac.sub</i> , <i>Rhz sp.</i>
11.01.2023	ПЛР ґрунтових зразків з присутністю ферментів

Таблиця 2.6 – Таблиця використаних зразків чистих культур

Проба	Чиста культура
1В	<i>Bacillus subtilis</i>
2В	<i>Rhizobium trifoli</i>
3В	<i>A. ferrooxidance</i>
4В	<i>L. ferrooxidance</i>
5В	<i>L. ferriphillum</i>
6В	<i>A. caldus</i>
7В	<i>Acidiphillum sp.</i>

Таблиця 2.7 – Зразки, використані для дослідження, ПЦР

1	<i>Davidshaht with vegetation</i>
2	<i>Davidshaht without vegetation</i>
3	<i>Freiberg garden Juliana (arsenic)</i>
4	<i>Practica halle</i>
5	<i>Freiberg garden Christine</i>
6	<i>Freiberg garden Juliana (arsenic)</i>
7	<i>Flaver potChristine</i>
8	<i>Slag (bioreactor)</i>
9	<i>Mulden hutten organic (до 10 см)</i>
10	<i>Blank</i>
11	<i>Positive -</i>
12	<i>Negative +</i>

Таблиця 2.8 – *Nanodrop*

1.	<i>103,4 ng/uL</i>	260-280 1,61
2.	<i>27,5 ng/uL</i>	260/280 1,46
3.	<i>186,9 ng/uL</i>	260/280 1,93
4.	<i>152,6 ng/uL</i>	260/280 1,88
5.	<i>204,5 ng/uL</i>	260/280 1,90
6.	<i>149,8 ng/uL</i>	260/280 1,90
7.	<i>72,5 ng/uL</i>	260/280 1,89

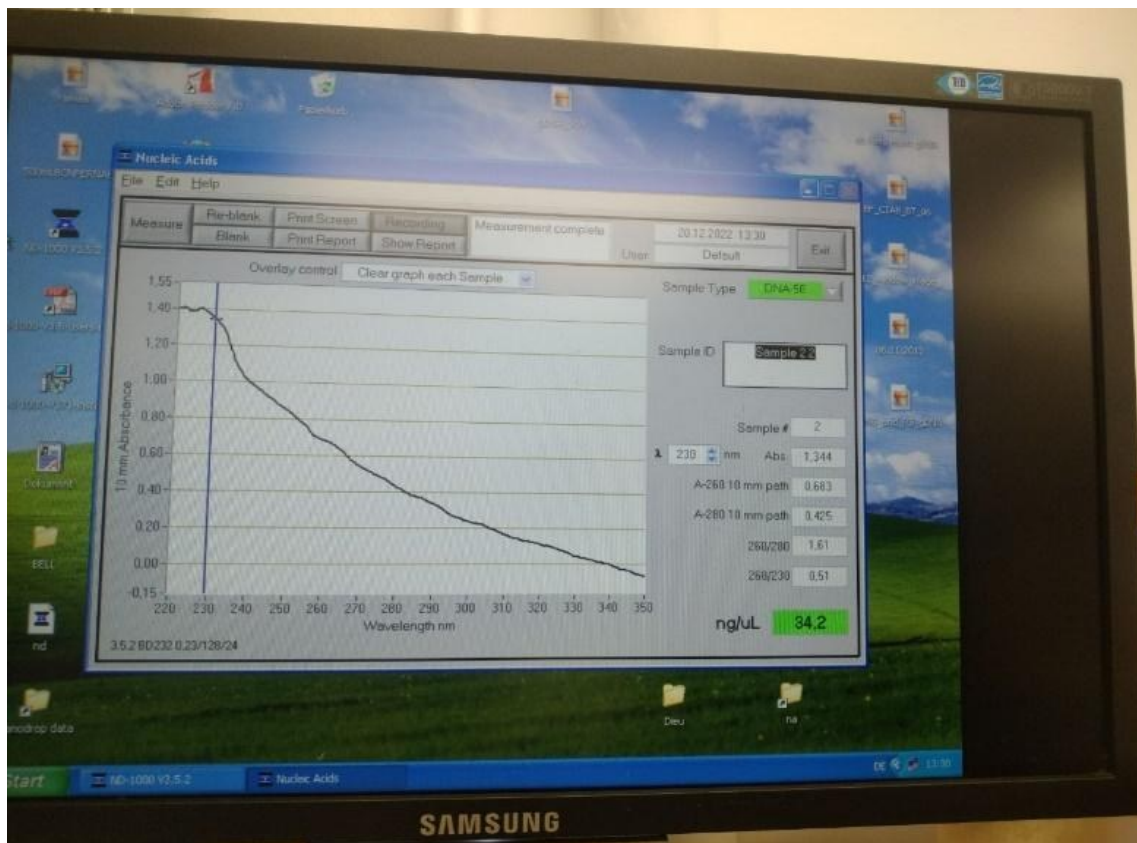


Рисунок 2.6. – Результати перевірки на спектрофотометру

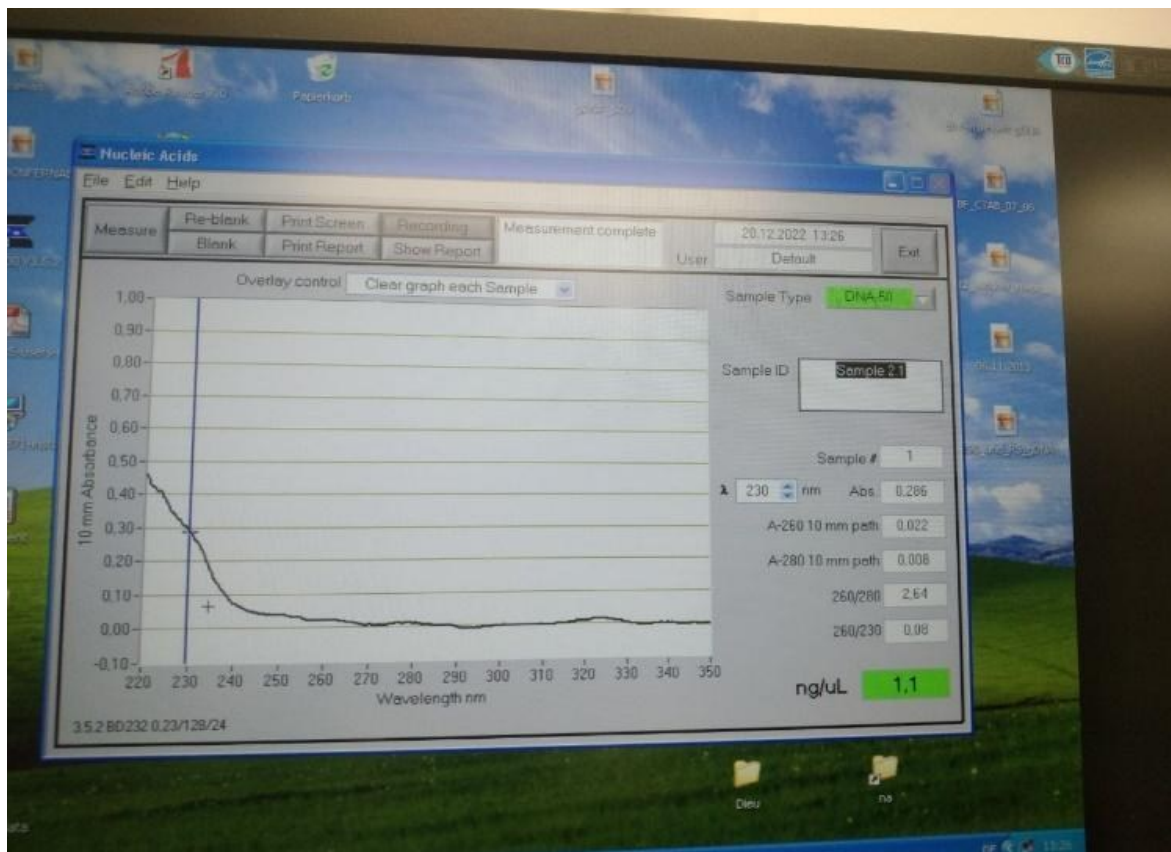


Рисунок 2.7 – Результати перевірки на спектрофотометру

Anneling for ox.	48.1	49.1	50	51	52	52.97	53.94
red.	46.7	47.2	48.1	49.11	50	51	51.9

Рисунок 2.8 – відпал для *Arsenate reductase* та *Arsenate oxidase*

Праймер тест:

Результати досліджень за праймер тестами наведені в таблицях 2.9 – 2.11

Таблиця 2.9 – перша спроба PCR 16S та гель електрофорезу 29.11.2022 – 30.11.2022

1

1	2	3	4	5	6	7	8
1	2	4	4	+ ^{1:10}	+	-	

2

1	2	3	4	5	6	7	8
3	6	7	+ ^{1:10}	+	-		

3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	M	1	2	4	4	+ ^{1:10}	+	-	X

4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	M	3	6	7	+ ^{1:10}	+	-	X	X

Таблиця 2.10 – Друга спроба PCR 16S та гель електрофорезу 01.12.2022

1

1	2	3	4	5	6	7	8
2	3	4	6	7	+	+ ^{1:10}	-

2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	M	2	3	4	6	7	+	+ ^{1:10}	-

Таблиця 2.11 – Третя спроба PCR 16S та гель електрофорезу 05.12.2022

1

1	2	3	4	5	6	7	8
1	2	5	8	9	+	-	

2

1	2	3	4	5	6	7	8
1В	2В	3В	4В	5В	6В	7В	

3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	M	1	2	5	8	9	+	-	X

4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	1В	2В	3В	4В	5В	6В	7В	X	X

Розведення зразків наведено в таблиці 2.12

Таблиця 2.12 – розведення зразків

Проба	Розведення
1	1:10
2	1:10
5	1:10
8	1:10
1В	1:10
2В	1:10
3В	1:10
+	1:10

Таблиця 2.13 – Четверта спроба PCR 16S та гель електрофорезу 07.12.2022

M

1	2	3	4	5	6	7	8
1 ^{1:10}	2 ^{2,5мкл}	2 ^{1:10}	5 ^{1:10}	8 ^{1:10}	9 ^{1:10}	X	X

V

1	2	3	4	5	6	7	8
1B ^{1:10}	1B ^{1:50}	2B ^{1:10}	3B ^{1:10}	+	-	X	X

4_M

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	M	1 ^{1:10}	2 ^{2,5мкл}	2 ^{1:10}	5 ^{1:10}	8 ^{1:10}	9 ^{1:10}	+ ^{1:10}	X

4_V

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	M	1B ^{1:10}	1B ^{1:50}	2B ^{1:10}	3B ^{1:10}	+	-	X	X

Результати визначення ферментів у зразках ґрунтів неведені на рис. 2.9

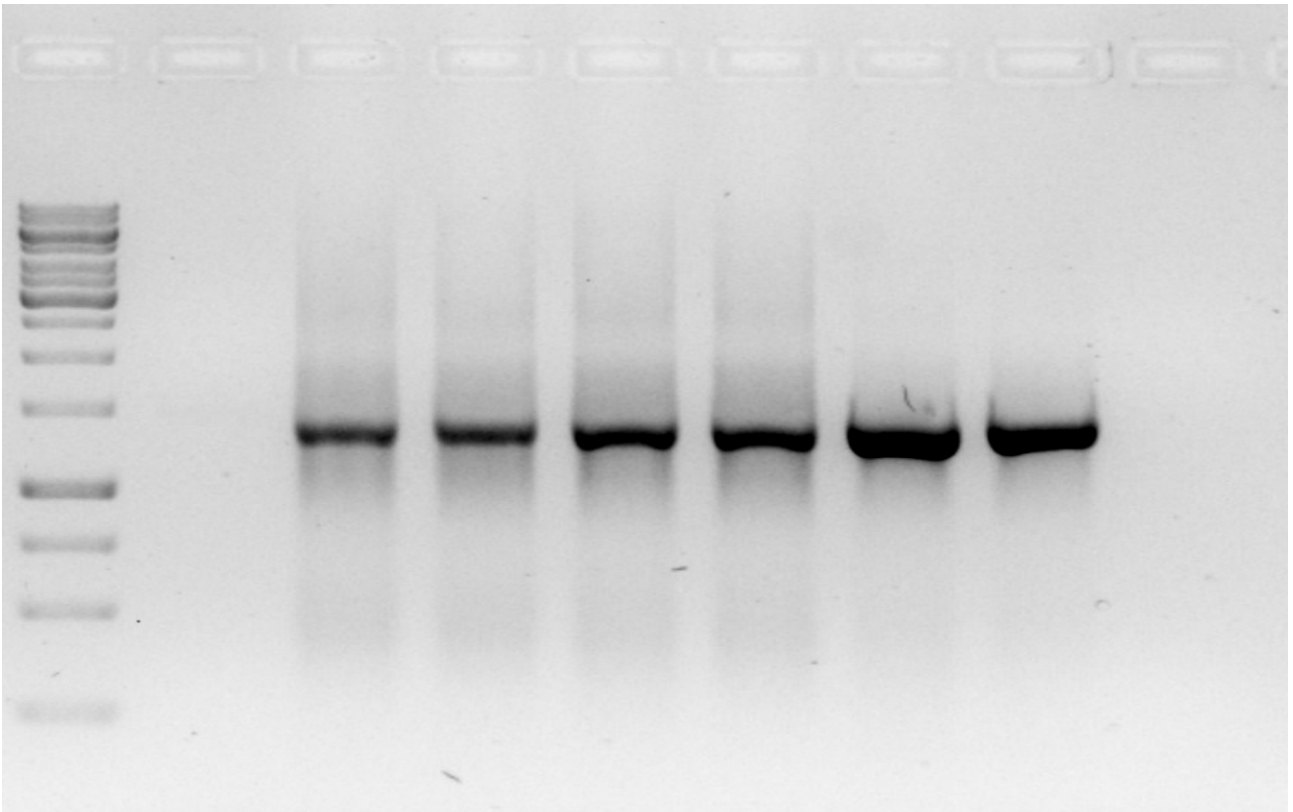


Рисунок 2.9 – *PCR A. ferrooxidans*(1.1), *L. ferriphillum*(2.2), *A. caldus*(3.3), *Arsenate reductase*(*As.red*), *Arsenate oxidase*(*As.ox*); *Rhisobium trifoli*(*Rh.ox_red*) *Acidiphillum sp.*(*A.sp.ox_red*); *16S Davidshaht without vegetation*(2) та гель електрофорезу 19.12.2022 – 20.12.2022

Узагальнені результати визначення фосфатів, нітратів і амонію в ґрунтах методом *ICP-MS* наведено на рис. 2.10

Probename	24Mg-3V	27Al-3V	28Si-3V	31P-3V	34S-3V	39K-3V
	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb
Blank	-0,145	0,181	3,900	10,070	-139,500	-1,753
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Blank	0,351	0,257	2,464	-1,703	89,560	2491,000
IİK Blank1-4 36-39	144,200	427,400	11690,000	3027,000	33750,000	6888000,000
IİK Blank 24-29 3-8	294,600	806,200	11440,000	1658,000	29940,000	13180000,000
IİK Blank 30-41	278,700	3861,000	31390,000	2044,000	23480,000	11360000,000
IİK Blank 1-2 4-6;9	323,500	1007,000	13280,000	2371,000	-11760,000	13040000,000
IİK 1 Vlada	43710,000	586400,000	1620000,000	14010,000	27220,000	15710000,000
IİK 2 Vlada	31460,000	446500,000	1189000,000	13020,000	133600,000	15070000,000
IİK 3 Vlada	73630,000	680500,000	1736000,000	13410,000	24550,000	11380000,000
IİK 4 Vlada	39460,000	460100,000	1371000,000	29110,000	21930,000	14880000,000
IİK 5 Vlada	63720,000	624300,000	1320000,000	39670,000	57450,000	16590000,000
IİK 6 Vlada	29620,000	177700,000	445400,000	24540,000	32540,000	14780000,000
IİK 8 Vlada	52370,000	692300,000	1699000,000	14170,000	35810,000	12030000,000
IİK 9 Vlada	32480,000	411700,000	1393000,000	21550,000	60760,000	15740000,000

Рисунок 2.10 – Фотометричне визначення фосфатів, нітратів і амонію в ґрунтах і ґрунтовий розчин, результати

Узагальнені результати нашої перевірки на кислотність та електрокондуктивність зразків методом *ICP-MS* наведені у Додатку А

Висновки до розділу 2

ВИСНОВКИ

В ході виконання роботи були отримані такі висновки:

1. Вдалий збір зразків ґрунтів потребує ретельної підготовки, охайності. Визначення солоності та кислотності ґрунтів має важливу роль в цієї роботі. Тобто, перед визначенням наявності арсеніт-оксидази, потрібно перевірити стан ґрунтів, в яких вони можуть бути знайдені.

2. Екстракція ДНК потребує точної, охайної роботи з дуже крихтливими кількостями матеріалу. Також, наші невдалі спроби показали нам, що надто велика чи маленька концентрація генетичного матеріалу не дає результату на PCR, тобто, треба вибрати правильне розведення ще на етапі екстракції.

3. Екстракція, ПЦР та гелелектрофорезіс на універсальний для всіх мікроорганізмів ген 16S до використання праймерів дало нам можливість перевірити ефективність всіх методів, що ми вивчили до цього.

4. Мас-спектрометрія дозволяє виконати перевірку на більш ніж один показник, наприклад на наявність декількох металів в усіх наших зразках, використання спектрофотометру було критичним при перевірці наскільки вдалим був попередній крок.

Результати виконання роботи показали наявність гену арсеніт-оксидази в зразках, знайдених біля шахти міста Фрайберг, Німечинна що підтверджує гіпотезу, що мікроорганізми, які можна знайти в місцях забруднення шахт мають ці ферменти для метаболізму As, але цей ген був знайдений і в зразках, отриманих у приміських точках, що свідотсвує про високу концентрацію миш'яку і в передмісті. Можна зробити припущення, що місце, що росле разом і з шахтою несе на собі слід забруднення миш'яком навіть після припинення її роботи.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати можуть бути використовані для огляду методик екстракції ДНК мікроорганізмів, що є біоіндикаторами забруднення ґрунтів ВМ. Вибір правильної концентрації при розведенні зразків був критичним при виконанні цієї роботи і має враховуватися при подальших дослідженнях.

Ці ж методи можуть бути використати для індикації мікроорганізмів, з ферментами здатними на метаболізм інших шкідливих важких металів, що маж великий потенціал на покращення та застосування біоремідацій територій України у майбутньому, проблема забруднення якої не може переоцінюватися.

Використані методики достатньо легкі для використання, не потребують величезних затрат або великої біолабораторії.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Xu J, Liu C, Hsu PC, Zhao J, Wu T, Tang J, et al. Remediation of heavy metal contaminated soil by asymmetrical alternating current electrochemistry. *Nature Communications*. 2019;10(1):1-8
2. Chaoua S., Boussaa S., El Gharmali A., Boumezzough A. Impact of Irrigation with Wastewater on Accumulation of Heavy Metals in Soil and Crops in the Region of Marrakech in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 2019;18:429–436. doi: 10.1016/j.jssas.2018.02.003.
3. Sandeep G., Vijayalatha K.R., Anitha T. Heavy Metals and Its Impact in Vegetable Crops. *Int. J. Chem. Stud.* 2019;7:1612–1621.
4. Hadia-e-Fatima A.A. Heavy Metal Pollution—A Mini Review. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*. 2018;6:179–181.
5. Kapoor D., Singh M.P. *Heavy Metals in the Environment*. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2021. *Heavy Metal Contamination in Water and Its Possible Sources*; pp. 179–189.
6. Priya A.K., Nagan S. Bioremediation of Dye Effluent and Metal Contaminated Soil: Low-Cost Method for Environmental Clean up by Microbes. *J. Environ. Sci. Eng.* 2015;57:109–119.
7. Devi P., Kumar P. Concept and Application of Phytoremediation in the Fight of Heavy Metal Toxicity. *J. Pharm. Sci. Res.* 2020;12:795–804.
8. Niazi, Nabeel & Bashir, Safdar & Bibi, Irshad & Murtaza, Behzad & Shahid, Muhammad & Javed, M Tariq & Shakoor, Muhammad & Saqib, Zulfiqar & Nawaz, Muhammad & Aslam, Zubair & Wang, Hailong & Murtaza, Dr. Ghulam. (2016). *Phytoremediation of Arsenic-Contaminated Soils Using Arsenic Hyperaccumulating Ferns*. 10.1007/978-3-319-40148-5_19.
9. Fergusson JE, editor. *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Oxford: Pergamon Press; 1990.
10. Kabata-Pendia A 3rd, editor. *Trace Elements in Soils and Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001.
11. Hamelink JL, Landrum PF, Harold BL, William BH, editors.

Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1994.

12. Verkleji JAS. In: *The effects of heavy metals stress on higher plants and their use as biomonitors In Plant as Bioindicators: Indicators of Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. Markert B, editor. New York: VCH; 1993. pp. 415–424.

13. WHO/FAO/IAEA. *World Health Organization*. Switzerland: Geneva; 1996. *Trace Elements in Human Nutrition and Health*.

14. Stern BR. *Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations*. *Toxicol Environ Health A*. 2010;73(2):114–127.

15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) *Toxicological Profile for Copper*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 2002.

16. Tchounwou P, Newsome C, Williams J, Glass K. *Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells*. *Metal Ions Biol Med*. 2008;10:285–290.

17. Chang LW, Magos L, Suzuki T, editors. *Toxicology of Metals*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1996.

18. Wang S, Shi X. *Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis*. *Mol Cell Biochem*. 2001;222:3–9.

19. Beyersmann D, Hartwig A. *Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms*. *Arch Toxicol*. 2008;82(8):493–512.

20. Yedjou CG, Tchounwou PB. *Oxidative stress in human leukemia cells (HL-60), human liver carcinoma cells (HepG₂) and human Jerkat-T cells exposed to arsenic trioxide*. *Metal Ions Biol Med*. 2006;9:298–303.

21. Yedjou GC, Tchounwou PB. *In vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assays*. *Mol Cell Biochem*. 2007;301:123–130.

22. Tchounwou PB, Centeno JA, Patlolla AK. *Arsenic toxicity, mutagenesis and carcinogenesis - a health risk assessment and management approach*. *Mol Cell Biochem*. 2004;255:47–55.

23. Tchounwou PB, Ishaque A, Schneider J. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG₂) exposed to cadmium chloride. *Mol Cell Biochem.* 2001;222:21–28.
24. Patlolla A, Barnes C, Field J, Hackett D, Tchounwou PB. Potassium dichromate-induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG₂) cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2009;6:643–653.
25. Patlolla A, Barnes C, Yedjou C, Velma V, Tchounwou PB. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague Dawley rats. *Environ Toxicol.* 2009;24(1):66–73.
26. Yedjou GC, Tchounwou PB. N-acetyl-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG₂) cells. *Intl J Environ Res Public Health.* 2008;4(2):132–137.
27. Tchounwou PB, Yedjou CG, Foxx D, Ishaque A, Shen E. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG₂) *Mol Cell Biochem.* 2004;255:161–170.
28. Sutton DJ, Tchounwou PB. Mercury induces the externalization of phosphatidylserine in human proximal tubule (HK-2) cells. *Intl J Environ Res Public Health.* 2007;4(2):138–144.
29. Sutton D, Tchounwou PB, Ninashvili N, Shen E. Mercury induces cytotoxicity, and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma cells. *Intl J Mol Sci.* 2002;3(9):965–984.
30. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) *Toxicological Profile for Arsenic TP-92/09.* Georgia: Center for Disease Control, Atlanta; 2000. [[Google Scholar](#)]
31. Tchounwou PB, Wilson B, Ishaque A. Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compounds in drinking water. *Rev Environ Health.* 1999;14(4):211–229. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Centeno JA, Tchounwou PB, Patlolla AK, Mullick FG, Murakat L, Meza E, Gibb H, Longfellow D, Yedjou CG. Environmental pathology and health effects of

arsenic poisoning: a critical review. In: Naidu R, Smith E, Smith J, Bhattacharya P, editors. Managing Arsenic In the Environment: From Soil to Human Health. Adelaide, Australia: CSIRO Publishing Corp.; 2005. [Google Scholar]

33. Rousselot P, Laboume S, Marolleau JP, Larghero T, Noguera ML, Brouet JC, Femand JP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res.* 1999;59:1041–1048. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

34. National Research Council Canada (NRCC) *Effects of Arsenic in the Environment.* National Research Council of Canada; 1978. pp. 1–349. [[Google Scholar](#)]

35. Morton WE, Dunnette DA. Health effects of environmental arsenic. In: Nriagu JO, editor. *Arsenic in the Environment Part II: Human Health and Ecosystem Effects.* New York: John Wiley & Sons, Inc; 1994. pp. 17–34. [[Google Scholar](#)]

36. National Research Council. *Arsenic in Drinking Water. 2001 Update.* 2001 On line at: <http://www.nap.edu/books/0309076293/html/> [[PubMed](#)]

37. Tchounwou PB, Centeno JA. Toxicologic pathology. In: Gad SC, editor. *Handbook of Pre-Clinical Development.* New York. NY: John Wiley & Sons; 2008. pp. 551–580. [[Google Scholar](#)]

38. Tchounwou PB, Patlolla AK, Centeno JA. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure-a critical review. *Toxicol Pathol.* 2003;31(6):575–588. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

39. Tchounwou PB, Wilson BA, Abdelgnani AA, Ishaque AB, Patlolla AK. Differential cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma (HepG₂) cells exposed to arsenic trioxide and monosodium acid methanearsonate (MSMA) *Intl J Mol Sci.* 2002;3:1117–1132. [[Google Scholar](#)]

40. Yedjou GC, Moore P, Tchounwou PB. Dose and time dependent response of human leukemia (HL-60) cells to arsenic trioxide. *Intl J Environ Res Public Health.* 2006;3(2):136–140. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

41. Chappell W, Beck B, Brown K, North D, Thornton I, Chaney R, Cothorn R, Cothorn CR, North DW, Irgolic K, Thornton I, Tsongas T. *Inorganic arsenic: A*

need and an opportunity to improve risk assessment. *Environ Health Perspect.* 1997;105:1060–1067. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

42. Centeno JA, Gray MA, Mullick FG, Tchounwou PB, Tseng C. Arsenic in drinking water and health issues. In: Moore TA, Black A, Centeno JA, Harding JS, Trumm DA, editors. *Metal Contaminants in New Zealand*. New Zealand: Resolutionz Press; 2005. pp. 195–219. [[Google Scholar](#)]

43. Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, Waalkes R. Arsenic: health effects, mechanisms of actions and research issues. *Environ Health Perspect.* 1999;107:593–597. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

44. Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett.* 2002;133:1–16. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

45. Wang Z, Rossman TG. In: *The Toxicology of Metals*. Cheng LW, editor. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press; 1996. pp. 221–243. [[Google Scholar](#)]

46. Belton JC, Benson NC, Hanna ML, Taylor RT. Growth inhibition and cytotoxic effects of three arsenic compounds on cultured Chinese hamster ovary cells. *J Environ Sci Health.* 1985;20A:37–72. [[Google Scholar](#)]

47. Li JH, Rossman TC. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: A possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol.* 1989;2:1–9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

48. Jha AN, Noditi M, Nilsson R, Natarajan AT. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat Res.* 1992;284:215–221. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

49. Hartmann A, Speit G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel assay and the sister-chromatid exchange test. *Environ Mol Mutagen.* 1994;23:299–305. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

50. Patlolla A, Tchounwou PB. Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mut Res – Gen Tox Environ Mutagen.* 2005;587(1–2):126–133. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

51. Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res.* 2001;488:171–194.

[\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

52. Landolph JR. Molecular and cellular mechanisms of transformation of C3H/10T1/2Cl8 and diploid human fibroblasts by unique carcinogenic, non-mutagenic metal compounds. A review. *Biol Trace Elem Res.* 1989;21:459–467.

[\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

53. Takahashi M, Barrett JC, Tsutsui T. Transformation by inorganic arsenic compounds of normal Syrian hamster embryo cells into a neoplastic state in which they become anchorage-independent and cause tumors in newborn hamsters. *Int J Cancer.* 2002;99:629–634. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

54. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schemerzer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutation Res.* 1994;307:261–271.

[\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

55. Saleha Banu B, Danadevi K, Kaiser Jamil, Ahuja YR, Visweswara Rao K, Ishap M. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicol.* 2001;162:171–177. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

56. Hartmann A, Peit G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel assay and the sister chromatid exchange test. *Environ Mol Mutagen.* 1994;23:299–305. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

57. Barrett JC, Lamb PW, Wang TC, Lee TC. Mechanisms of arsenic-induced cell transformation. *Biol. Trace Ele Res.* 1989;21:421–429. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

58. Tchounwou PB, Yedjou CG, Dorsey WC. Arsenic trioxide - induced transcriptional activation and expression of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG₂) *Cell Mol Biol.* 2003;49:1071–1079. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

59. Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10907–10912. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

60. Liu Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu Q, Lee JC, Holbrook NJ. Differential

activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Rad Biol Med.* 1996;21:771–781. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

61. Ludwig S, Hoffmeyer A, Goebeler M, Kilian K, Hafner H, Neufeld B, Han J, Rapp UR. The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1998;273:1917–1922. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

62. Trouba KJ, Wauson EM, Vorce RL. Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;164(2):161–170. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

63. Vogt BL, Rossman TG. Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts- a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutat Res.* 2001;478(1–2):159–168. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

64. Chen NY, Ma WY, Huang C, Ding M, Dong Z. Activation of PKC is required for arsenite-induced signal transduction. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000;19(3):297–306. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

65. Porter AC, Fanger GR, Vaillancourt RR. Signal transduction pathways regulated by arsenate and arsenite. *Oncogene.* 1999;18(54):7794–7802. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

66. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutré S, Dahlberg S, Ellison R, Warrell RP., Jr United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3852–3860. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

67. Murgo AJ. Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the National Cancer Institute Cooperative Research and Development Studies. *Oncologist.* 2001;6(2):22–28. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

68. Puccetti ES, Guller S, Orleth A, Bruggenolte N, Hoelzer D, Ottmann OG, Ruthardt M. BCR-ABL mediates arsenic trioxide-induced apoptosis independently of its aberrant kinase activity. *Cancer Res.* 2000;60(13):3409–3413.

[\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

69. Seol JG, Park WH, Kim ES, Jung CW, Hyun JM, Kim BK, Lee YY. Effect of arsenic trioxide on cell cycle arrest in head and neck cancer cell-line PCI-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265(2):400–404. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

70. Alemany M, Levin J. The effects of arsenic trioxide on human Megakaryocytic leukemia cell lines with a comparison of its effects on other cell lineages. *Leukemia Lymphoma.* 2000;38(1–2):153–163. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

71. Deaglio S, Canella D, Baj G, Arnulfo A, Waxman S, Malavasi F. Evidence of an immunologic mechanism behind the therapeutic effects of arsenic trioxide on myeloma cells. *Leuk Res.* 2001;25(3):237–239. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

72. Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM, Chapin RE. Effects of arsenic, cadmium, chromium and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG₂ cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;168(2):79–90. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

73. Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci.* 2001;59(1):185–192. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

74. Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives. *Cancer Res.* 1991;51:5023s–5044s. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

75. Graham-Evans B, Colhy HHP, Yu H, Tchounwou PB. Arsenic-induced genotoxic and cytotoxic effects in human keratinocytes, melanocytes, and dendritic cells. *Intl J Environ Res Public Health.* 2004;1(2):83–89. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

76. Stevens JJ, Graham B, Walker AM, Tchounwou PB, Rogers C. The effects of arsenic trioxide on DNA synthesis and genotoxicity in human colon cancer cells. *Intl J Environ Res Public Health.* 2010;7(5):2018–2032. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

77. Walker AM, Stevens JJ, Ndebele K, Tchounwou PB. Arsenic trioxide

modulates DNA synthesis and apoptosis in lung carcinoma cells. Intl J Environ Res Public Health. 2010;7(5):1996–2007. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

78. Yedjou CG, Tchounwou PB. Modulation of p53, c-fos, RARE, cyclin A and cyclin D1 expression in human leukemia (HL-60) cells exposed to arsenic trioxide. *Mol Cell Biochem. 2009;331:207–214. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]*

79. Yedjou C, Sutton LM, Tchounwou PB. Genotoxic mechanisms of arsenic trioxide effect in human Jurkat T-lymphoma cells. *Metal Ions Biol Med. 2008;10:495–499. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]*

80. 83. Brown E, Yedjou C, Tchounwou PB. Cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma cells exposed to arsenic trioxide. *Metal Ions Biol Med. 2008;10:583–587. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]*

81. 84. Yedjou CG, Thisseu L, Tchounwou C, Gomes M, Howard C, Tchounwou PB. Ascorbic acid potentiation of arsenic trioxide anticancer activity against acute promyelocytic leukemia. *Arch Drug Inf. 2009;2(4):59–65. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]*

82. 85. Yedjou C, Rogers C, Brown E, Tchounwou P. Differential effect of ascorbic acid and n-acetyl-cysteine on arsenic trioxide - mediated oxidative stress in human leukemia (HL-60) cells. *J Biochem Mol Tox. 2008;22:85–92. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]*

83. 86. Yedjou GC, Moore P, Tchounwou PB. Dose- and time-dependent response of human leukemia (HL-60) cells to arsenic trioxide treatment. *Intl J Environ Res Public Health. 2006;3(2):136–140. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]*

84. 87. Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide - review. *Cancer Res. 2002;62:3893–3903. [PubMed] [Google Scholar]*

85. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *Exp Suppl. 2012;101:133-64. doi: 10.1007/978-3-7643-*

8340-4_6. PMID: 22945569; PMCID: PMC4144270.

86. Fergusson, J.E. (1990) *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Pergamon Press, Oxford, 85-547.

87. Krishna, G K & Nagar, Shivani & Rathod, Gajendra & Vishwakarma, Chandrapal & Arambam, Asha & Shrivastava, Sanya & John, Chris & Chinnusamy, Viswanathan. (2020). *Heavy Metal Toxicity in Plants and Phytoremediation of Contaminated Soils*.

88. Vanessa Nessner Kavamura, Alexandre Hild Aono, Elisa Esposito, *Biotechnological Strategies Applied to the Decontamination of Soils Polluted With Heavy Metals, Comprehensive Biotechnology (Third Edition), Pages 240-252.*

89. Oksana Sytak, Natalija Taran, *Effect of heavy metals on soil and crop pollution in Ukraine – a review* *Journal of Central European Agriculture*, 2022, 23(4), p.881-887

90. Gargouri B, Karray F, Mhiri N, Aloui F, Sayadi S. *Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. Journal of Hazardous Materials*. 2011;189(1-2):427-434

91. Azubuike CC, Chikere CB, Okpokwasili GC. *Bioremediation techniques–classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;32(11):180

92. Srivastava J, Naraian R, Kalra SJ, Chandra H. *Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. International Journal of Environmental Science and Technology*. 2014;11(6):1787-1800

93. Kumar A, Bisht BS, Joshi VD, Dhewa T. *Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. International Journal of Environmental Sciences*. 2011;1(6):1079

94. Sharma S. *Bioremediation: Features, strategies and applications. Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. 2012;2231:4423

95. Quintero JC, Lu-Chau TA, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. *Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus Bjerkandera adusta in*

a slurry batch bioreactor. International Biodeterioration & Biodegradation. 2007;60(4):319-326

96. Pino-Herrera DO, Pechaud Y, Huguenot D, Esposito G, Van Hullebusch ED, Oturan MA. Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: An overview. *Journal of Hazardous Materials. 2017;339:427-449*

97. Chikere CB, Chikere BO, Okpokwasili GC. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. *3 Biotech. 2012;2(1):53-66*

98. Chikere CB, Chikere BO, Okpokwasili GC. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. *3 Biotech. 2012;2(1):53-66*

99. Sharma S. Bioremediation: Features, strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science. 2012;2231:4423*

100. Chikere CB, Chikere BO, Okpokwasili GC. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. *3 Biotech. 2012;2(1):53-66*

101. Nisha Kumari, Sheeja Jagadevan, Genetic identification of arsenate reductase and arsenite oxidase in redox transformations carried out by arsenic metabolising prokaryotes – A comprehensive review, *Chemosphere, Volume 163, 2016. Pages 400-412. ISSN 0045-6535.*

102. Evelyne Lebrun, Myriam Brugna, Frauke Baymann, Daniel Muller, Didier Lièvreumont, Marie-Claire Lett, Wolfgang Nitschke, Arsenite Oxidase, an Ancient Bioenergetic Enzyme, *Molecular Biology and Evolution, Volume 20, Issue 5, May 2003, Pages 686–693*

103. Madsen EL. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Curr Op Biotechnol. 2011;22:456–464.*

104. All you need to know about soil sampling [online]. – Available from: <https://agrotest.com/en/news/everything-about-soil-sampling/>

105. Carter, M. & Gregorich, E. & Adl, Sina & Acosta-Mercado, Dimaris &

Anderson, T. & Lynn, Denis. (2007). *Methods in soil protozoa*. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*.

106. *Ways of Measuring pH*: [online]. – Available from: <https://www.horiba.com/int/waterquality/support/electrochemistry/the-story-of-ph/ways-of-measuring-ph/>

107. Protocol: QIAGEN® DNeasy® PowerSoil® Pro V.1 [online]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit>

108. Protocol for NanoDrop 2000c Spectrophotometer: [online]. – Available from: <https://www.emich.edu/biology/documents/nanodrop-spectro.pdf>

109. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62):3923. doi: 10.3791/3923. PMID: 22546956; PMCID: PMC4846332.

110. Kulasekaran, A. & Gopal, Andal & Lakshimipathy, R. & Alexander, J.. (2015). Modification in pH measurements for getting accurate pH values with different pH meters irrespective of aging and drifts in the meters. *International Journal of ChemTech Research*. 8. 16-24.

111. Особливості дотримання техніки безпеки при роботі в біохімічній та хімічній лабораторіях: навч. посібник для студентів та викладачів вузів / К. В. Александрова, В. М. Швець, М. В. Дячков, Д. А. Васильєв. - Запоріжжя: [ЗДМУ], 2017. – 76 с.