**Применение комплексонов для защиты энзимов**

**от ингибирования ионами тяжёлых металлов**

Автор:

**Захаров Максим Валерьевич**

МАОУ Лицей № 77

(Базовая площадка РАН)

г.Челябинск

9 класс

Научный руководитель:

Вахидов Марс Нуриевич

Руководитель Регионального

ресурсного центра

«Химия плюс»

**Применение комплексонов для защиты энзимов**

**от ингибирования ионами тяжёлых металлов**

**Захаров Максим Валерьевич**

**МАОУ Лицей № 77 (Базовая площадка РАН) г. Челябинска, 9 класс**

**Введение**

Проблема загрязнения окружающей среды соединениями тяжёлых металлов в промышленных районах и на планетарном уровне сегодня стоит остро как никогда. В отличие от органических загрязнителей, эти опасные элементы не могут, даже в принципе, разложиться на более простые продукты, если они, конечно, не вступят в ядерные реакции. По данным ВОЗ, сегодня в промышленных городах уже у большинства новорожденных уровень свинца в голове, в прямом смысле, превышает все нормы. Эти факты подтвердили и исследования учёных ЧГМУ в Челябинской области. Очевидно, что решить проблему загрязнения окружающей среды ионами тяжёлых металлов быстро не получится. Если нельзя очистить быстро среду обитания, можно ли защитить внутреннюю среду организма человека, животных, растений? Ясно, что тяжёлые металлы были на нашей планете всегда, но в благополучные времена они почти не были включены в биохимические циклы биосферы. Эти элементы находились в такой форме, которая была биологически не доступна. Значит, нам необходимо искать пути исключения ионов тяжёлых металлов из биохимических циклов. А если в организм человека, животных и растений всё-таки попадают ионы тяжёлых металлов, то они должны находиться в неких комплексах, которые причиняют наименьший вред и легко выводятся.

**Цель** нашей работы состоит в том, чтобы экспериментально подтвердить возможность сведения к минимуму негативного влияния ионов тяжёлых металлов путём их перевода в биологически малоактивные соединения.

**Рабочая гипотеза**: негативное влияние ионов тяжёлых металлов на биологические системы может быть сведено к минимуму путём перевода их в прочные комплексные соединения.

В своей работе мы решали ряд задач:

1. На примере растворимых соединений кадмия (II), исследовать возможность снижения коагулирующего действия ионов тяжёлых металлов путём комплексообразования. В качестве комплексообразователя использовался Трилон Б.

2. Исследовать защитные свойства Трилона Б от негативного воздействия ионов тяжёлых металлов на уровне микроорганизмов (молочнокислые бактерии и одноклеточные грибы-дрожжи).

3. Рассмотреть возможность использования предлагаемых методик в учебно-исследовательской деятельности школьников.

4. Апробировать предлагаемые методики на областных семинарах педагогов-естественников совместно с ЧИППКРО.

**Литературный обзор**

Отправной точкой в нашей работе стало знакомство с лекарственным средством Тетацин-кальцием [1]. Этот препарат представляет собой кальций динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (комплекс кальция с Трилоном Б). Этот препарат применяется в случаях отравления людей и домашних животных тяжёлыми металлами и их солями [8]. Действие препарата основано на его способности образовывать прочные комплексы с ионами ряда металлов, которые растворимы в воде и биологических жидкостях. Трилон Б связывает ионы тяжёлых металлов в комплексные соединения, которые выводятся из организма [15]. В состав препарата включён кальций (в виде ионов), так как Трилон Б, наряду с ионами тяжёлых металлов, способен связывать ионы кальция, что может нанести ущерб костным тканям и всем системам организма, где активную роль играют ионы кальция [4]. Из литературы по экологии [6, 16] мы знаем, что в природе существуют организмы, обладающие устойчивостью к высокому уровню загрязнения среды обитания соединениями тяжёлых металлов [5, 29]. К этим видам относятся некоторые штаммы гнилостных бактерий, грибы и многие другие организмы [3,11]. Негативное действие ионов тяжёлых металлов, прежде всего, сводится к взаимодействию с важнейшими природными полимерами – белками и нуклеиновыми кислотами [7]. Тяжёлые металлы изменяют пространственную структуру этих биополимеров, лишая их биологической активности [14]. Жертвами тяжёлых металлов становятся, в частности, ферменты, катализирующие химические процессы в организме [1]. Тяжёлые металлы определяют как неспецифические ингибиторы, то есть выводящие из строя все без исключения ферменты [2]. Очень важно то, что ионы тяжёлых металлов на уровне организма, а часто и вне его, действуют не сами по себе, а в виде конкретных соединений [17]. Те или иные соединения тяжёлых металлов в большей или меньшей степени могут взаимодействовать с биополимерами [28]. Некоторые организмы эволюционно приспособились к высокому уровню загрязнения среды обитания соединениями тяжёлых металлов. Эти живые системы, вероятно, способны создавать вещества, связывающие ионы тяжёлых металлов в относительно безопасные соединения, которые могут выводиться из организма или накапливаться в тех частях организма, которыми можно жертвовать (плоды яблони и груши) [11]. Организмы, способные накапливать в результате своей жизнедеятельности вещества, связывать ионы тяжёлых металлов, давно используются в народной медицине [23]. Таким образом, сама природа подсказывает нам путь защиты организма человека и животных от негативного действия тяжёлых металлов.

Активность ферментов оценивают по накоплению в среде продуктов их деятельности [20]. Продуктами могут быть газообразные вещества, соединения, меняющие в водной среде значение рН (органические кислоты или основания). В результате ферментативных реакций в реакционной системе могут накапливаться вещества с различной окраской. На скорости выделения газа или изменении окраски раствора основаны количественные методы оценки активности ферментов. Для точной оценки скорости ферментативной реакции используют системы с избыточным содержанием субстрата. В этом случае скорость реакции является постоянной, определяется лишь активностью фермента (уравнение Л.Михаэлиса и М.Ментена) и математически описывается как реакция нулевого порядка [25]. Под активностью фермента понимают его действующую концентрацию [27]. Это более правильно, чем применять категорию концентрация. Дело в том, что молекулы фермента – это гиганты в мире молекул (полимеры), которые под влиянием ионов тяжёлых металлов могут терять свою каталитическую активность частично или полностью [13]. Это зависит от того, какое число ионов тяжёлого металла вступило во взаимодействие с белковой молекулой фермента, и от того, в каком месте белковой молекулы это взаимодействие произошло [12]. Активность ферментов может быть оценена, при избытке субстрата, скоростью выделения газа или развитием окраски.

Исследуя влияние ионов тяжёлых металлов на микроорганизмы, следует учитывать, что такое влияние происходит по нескольким направлениям [18]. Во-первых, выходит из строя полностью или частично белковая составляющая оболочек клеток, мембран. Во-вторых, если ионы проникают внутрь клетки или даже во внутрь органелл, включая ядро, могут нарушаться процессы метаболизма в клетке и стать невозможным процесс размножения. В-третьих, микроорганизмы могут впадать в состояние анабиоза или переходить в особые формы (эль-форма). Возможны и иные сценарии «поведения» микробов. Безусловно, эти процессы определяются многими факторами (биологическая сущность микробов, водородный показатель среды, температура и даже скорость поступления в реакционную систему соединений тяжёлых металлов) [23]. Для более или менее точной оценки защитного действия тех или иных веществ от влияния ионов тяжёлых металлов (как любых других вредных для микроорганизмов веществ) выбирают летальные концентрации, гарантирующие 100% гибель организмов. Далее исследуют, какой процент из них уцелеет при наличии в реакционной системе того или иного защищающего соединения [3]. Трудно оценить количество микробов, но можно определить их суммарную активность по накоплению в системе продуктов их жизнедеятельности [27]. Ферменты и микроорганизмы работают быстро и точно. Для организации опытов с этими организмами часто не требуется сложное оборудование, высокие давления и температуры. Однако опыты с данными объектами могут быть весьма информативными. Результаты опытов можно экстраполировать на более высоко организованные биологические системы. Возможно и моделирование процессов, имеющих значение для биогеоценозов и биосферы в целом [2]. Поэтому рассматриваемые объекты являются перспективными в учебной деятельности, а также в химической технологии и биотехнологии.

**Собственные исследования**

На первом этапе своей работы мы исходили из предположения о том, что присутствие в водных растворах белка Трилона Б может предотвратить коагулирующее действие солей кадмия. Для опытов мы использовали хорошо растворимый яичный белок из расчёта 10 мл белковой массы (содержит воду) на 140 мл воды. В три стакана (ёмкость 50 мл) наливали по 15 мл раствора белка. В стакан первый добавляли 15 мл воды, во второй 15 мл 0,2 % раствора хлорида кадмия, в третий 15 мл раствора соли кадмия с эквивалентным количеством Трилона Б. В первом стакане никаких изменений не происходило. Во втором стакане наблюдали коагуляцию белка, что обусловлено взаимодействием его с ионами тяжёлого металла (Сd2+). В третьем стакане не происходило заметной коагуляции белка. Предположительно, это можно объяснить присутствием в растворе Трилона Б, который связывает ионы кадмия в прочный комплекс. Этот опыт наглядно показывает, как можно защитить белки, в том числе и в живом организме, от негативного действия тяжёлых металлов.

На втором этапе своей работы мы исследовали защитное действие Трилона Б на ферменты. В качестве объекта мы избрали богатый ферментом пероксидазой сок белокочанной капусты. Пероксидаза, как и все ферменты, имеет белковую природу, естественно, теряет активность в результате взаимодействия с ионами тяжёлых металлов, в частности с ионами кадмия. Мы надеялись на то, что в присутствии Трилона Б пероксидаза не будет выведена из строя кадмием. Необходимо было предложить такую методику, которая позволила бы визуально наблюдать активность фермента. Пероксидаза, находясь вне организма, способна ускорять реакцию пероксида водорода с различными восстановителями. В качестве подходящего восстановителя мы избрали гидрохинон. При ферментативном окислении гидрохинон образует ряд продуктов окислительной конденсации, которые имеют яркую (хорошо заметную) красную окраску. Такая окраска достаточно быстро развивается при комнатной температуре (20-250 С). Мы проводили параллельно три опыта.

Опыт №1. В стакан, ёмкостью 50 мл, помещали 1 мл сока капусты, 8 мл 0,2 % раствора гидрохинона, 3 мл 3 % раствора пероксида водорода. Объём раствора в стакане доводили до 30 мл. Наблюдали развитие отчётливо выраженной красной окраски, которая свидетельствует о высокой активности пероксидазы.

Опыт № 2. В стакан, ёмкостью 50 мл, помещали 1 мл сока капусты, 8 мл 0,2 % раствора гидрохинона, 15 мл 0,4 % хлорида кадмия и 3 мл 3% пероксида водорода. Развитие красной окраски продуктов окисления гидрохинона не наблюдали, по меньшей мере, в течение часа. Результат опыта можно объяснить инактивацией фермента под влиянием ионов кадмия.

Опыт № 3. В стакан, ёмкостью 50 мл, помещали 1 мл сока капусты, 8 мл 0,2 % раствора гидрохинона, 15 мл 0,4 % хлорида кадмия, в котором также находится эквивалентное ионам Сd2+ количество Трилона Б и 3 мл 3% пероксида водорода. Наблюдали развитие красной окраски, чуть с меньшей скоростью (оценивали визуально), чем в первом опыте. Результаты опыта ясно свидетельствуют о том, что присутствующий в третьем опыте Трилон Б оказывает защитное действие на фермент, активность которого незначительно снижается в сравнении с первым опытом.

Данная методика была опробована нашими товарищами по лаборатории на ферментах другого класса, на гидролазах. Эти ферменты катализируют гидролиз жиров, белков и сахаров. В качестве источника таких ферментов в нашей лаборатории использовался аптечный препарат – Фестал. В серии опытов по гидролизу жиров, белков, крахмала было однозначно показано, что присутствие в реакционной системе Трилона Б оказывало защитное действие на ферменты, соответственно липазы, протеазы и амилазы.

Подводя итог второму этапу своего исследования, мы пришли к убеждению о том, что Трилон Б может не только защищать белки от коагуляции ионами кадмия, но и использоваться в промышленных масштабах для защиты ферментов от негативного действия ионов тяжёлых металлов. В свою очередь это приведёт к повышению производительности труда и большему сроку службы ферментов.

Третий этап работы был посвящён исследованиям защитного действия Трилона Б на уровне одноклеточных организмов. В качестве модельных объектов рассматривались пекарские дрожжи и молочнокислые бактерии. Эти организмы были взяты, потому что, во-первых, легко доступны, а во-вторых, потому что ферментативные процессы, которые они осуществляют, схожи по отдельным стадиям с процессами, протекающими в организме человека и домашних животных (гликолиз). Известно, что молочнокислое брожение по своим основным стадиям аналогично гликолизу, который протекает в организме многих хордовых. Поэтому результаты, полученные на молочнокислых бактериях, можно экстраполировать на многие организмы. Опыты с молочнокислыми бактериями мы проводили по разработанной нами схеме. В качестве источника молочнокислых бактерий мы использовали так называемый «живой кефир», полученный нами от производителя в Чебаркульском районе. Живым называют этот кефир, потому что в нём присутствует живая флора молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии превращают моносахариды, например глюкозу, в молочную кислоту:

С6Н12О6 = 2 СН3СН2ОНСООН

Накопление в реакционной массе молочной кислоты приводит к понижению рН среды. По тому, как быстро происходит уменьшение значения водородного показателя, можно судить об активности молочнокислых бактерий. Мы помещали в три стаканчика, объёмом 50 мл, по 25 мл «живого кефира», предварительно смешанных с 15 каплями спиртового раствора фенолфталеина. Во все три стакана добавляли по 5 мл 1% раствора гидрокарбоната натрия (пищевая сода). В первый стакан добавляли 6 % водный раствор глюкозы, объёмом 10 мл. В третий стакан добавляли 6 % по глюкозе, 0,3 % по хлориду кадмия раствор, в который также было внесено эквивалентное количество Трилона Б. Во всех трёх стаканах развивалась розовая окраска вследствие щелочной среды, которая возникает как результат гидролиза гидрокарбоната натрия. Выраженность окраски выравнивалась с тем, чтобы во всех стаканах значение рН совпадало. Все три стакана помещались в термостат при температуре 400 С. Каждую минуту мы оценивали окраску реакционной массы в стаканчиках. В результате наблюдали смену розовой окраски на белую в первом стаканчике (в серии из 20 опытов) через 28 – 31 минуту. Во втором стакане окраска стала почти белой (розовый оттенок всё-таки наблюдался в серии из 20 опытов) лишь через 11 часов 15 минут – 11часов 42 минуты. В третьем стаканчике исчезновение розовой окраски наблюдали в серии из 20 опытов через 37-41 минуту. Как можно объяснить наблюдаемые явления? Очевидно, что в первом стаканчике молочнокислое брожение протекало совершенно естественным образом, со скоростью, обусловленной активностью бактерий. Во втором стакане мы наблюдали очень медленное и протекающее не до конца исчезновение розовой окраски, что свидетельствует о медленном накопление в реакционной системе молочной кислоты. Это значит, что кадмий дезактивировал бактерии, а возможно погубил их большую часть. В третьем стакане мы наблюдали активность бактерий, практически равную той, которая отмечалась в первом стакане. Можно сделать вывод о том, что присутствие Трилона Б защищает молочнокислые бактерии от губительного влияния ионов кадмия.

Следующим живым объектом, на котором мы проверяли свою гипотезу, были пекарские дрожжи, которые относятся к одноклеточным грибам. Пекарские дрожжи осуществляют спиртовое брожение, превращая сахара, например глюкозу, в спирт. Попутно образуется углекислый газ.

С6Н12О6 = 2C2Н5ОН + 2 СО2

Об активности дрожжей можно судить по интенсивности выделения углекислого газа. Но мы предпочли иной путь. Было решено судить об активности дрожжей по деятельности ключевых ферментов дегидрогеназ. Зимазы – ферментативный комплекс, который используют дрожжи для постадийного превращения глюкозы в этиловый спирт, включает в свой состав, по меньшей мере, два вида дегидрогеназ. Эти ферменты, относящиеся к окислительно-восстановительным, отщепляют от субстрата водород и переносят его на подходящий объект. Таким образом, дегидрогеназы окисляют субстрат, а объект, на который они переносят водород, восстанавливается. Необходимо было подобрать подходящий объект, восстановление которого можно было бы отчётливо наблюдать. Обычно в таких случаях используют вещества, имеющие яркую окраску, которая при восстановлении либо исчезает, либо заметно меняется. Мы остановили свой выбор на метиленовом голубом. Это вещество при восстановлении переходит в бесцветную форму (лейкооснование).

В три стакана, ёмкостью 50 мл, помещали по 25 мл водной взвеси дрожжей (1 грамм дрожжей на 100 мл воды). В каждый стакан добавляли по 10 мл 8 % раствора глюкозы. После в каждый стакан добавляли по 5 капель 0,5 % раствора метиленового голубого. В первый стакан добавляли 5 мл воды. Во второй стакан добавляли 5 мл 1 % раствора хлорида кадмия. В третий стакан добавляли 5 мл 1 % раствора хлорида кадмия с эквивалентным количеством Трилона Б (из расчёта 1 моль ионов Сd2+ на 1 моль Трилона Б). Во все три стакана добавляли масло растительное очищенное для исключения контакта реакционной массы с воздухов (кислород воздуха окисляет бесцветную форму метиленового синего до окрашенной), Все три стаканчика мы помещаем в термостат при температуре 40 0 С. Стаканчики мы осматривали каждую минуту. Были получены результаты, которые хорошо согласуются с предшествующими экспериментами. В первом стаканчике голубая окраска раствора исчезла через 42 – 45 минут (серия из 20 опытов). Во втором стакане голубая окраска не исчезла даже спустя 12 часов наблюдения (серия из 20 опытов). В третьем стакане окраска исчезла через 38 – 42 минуты (серия из 20 опытов). Получается, что в третьем опыте скорость исчезновения окраски даже чуть выше, чем в первом контрольном. Мы полагаем, что Трилон Б может как-то влиять на усвоение одноклеточными грибами микроэлементов. Подтвердить это или опровергнуть ещё предстоит. Важно то, что в опытах с дрожжами мы получили экспериментальное подтверждение тому, что Трилон Б оказывает защитное влияние на микроорганизмы, он явно снижает негативное влияние на них ионов кадмия.

Таким образом, проведённые эксперименты на растворе яичного белка, пероксидазы, молочнокислых бактериях и дрожжах по своим результатам хорошо согласуются между собой и позволяют утверждать, что Трилон Б оказывает защитное действие от ионов кадмия на уровне рассматриваемых биологических объектов. В настоящее время в результате деятельности человека в окружающую среду (почва, водоёмы, атмосфера) неизбежно попадают растворимые в воде соединения тяжёлых металлов, а также вещества, способные образовывать с ними прочные комплексные соединения. Это следует учитывать в экологическом мониторинге. На первый взгляд, комплексообразование является благом, ибо связывает ионы тяжёлых металлов. С другой стороны, такие комплексы могут оказаться хорошо растворимыми в воде в широком диапазоне рН. Что будет способствовать широкому распространению соединений тяжёлых металлов, как по вертикали (в глубь почвенных горизонтов) так и по горизонтали. Естественно, что в водоёмах растворимые комплексы кадмия или свинца получают возможность распространяться беспрепятственно, проникать в организмы животных, обитающих в водной среде. В дальнейшем мы планируем детально изучить экологические аспекты этой проблемы.

Очевидно, что поиск комплексонов, способных прочно связывать ионы тяжёлых металлов, имеет медико-биологическое значение. В настоящее время в качестве медицинского препарата находит применение комплекс Трилона Б с кальцием. Его применяют для выведения из организма ионов тяжёлых металлов у работников производств, где присутствует свинец, кадмий, ртуть. Однако это чуть ли не единственный пример. Целесообразно вести исследования в трёх направлениях. 1. Синтез новых комплексообразователей и их изучение по линии фармпрепаратов. 2. Поиск веществ, связывающих ионы тяжёлых металлов в почве, в воде и делающих их недоступными для микроорганизмов и растений. Таким образом удастся снизить перемещение тяжёлых металлов по пищевой цепи, в конце которой может оказаться человек. Хорошо известно из экологии, что в пищевых цепях происходит концентрирование вредных веществ. Достаточно вспомнить болезнь японских рыбаков, обусловленную поеданием рыбы, содержащей в себе соединения ртути. Ртуть прошла путь от планктона к рыбе, а после к человеку, для которого загрязнение ртутью вод японского моря обернулась летальными последствиями. 3. Поиск природных материалов, содержащих вещества, способные связывать ионы тяжёлых металлов в комплексы и выводить их из организма человека и домашних животных.

В настоящее время мы проводим эксперименты с природными объектами. В качестве перспективного, мы рассматриваем ягоды чёрной смородины. В соке ягод чёрной смородины, что следует из наших опытов, содержатся вещества или вещество, способное снижать негативное действие ионов кадмия, свинца, ртути на белки, и, в частности, ферменты. Также мы наблюдали, что в присутствии сока этих ягод деятельность дрожжей не снижается, даже при 0,05 % содержании ионов кадмия и ртути (активность дрожжей оценивали по выделению углекислого газа). Однако эти результаты носят предварительный характер. Окончательный вывод делать преждевременно. Мы просто убедились, что некоторые рецепты народной медицины могут помочь нам в поиске природных средств защиты биологических систем от губительного действия тяжёлых металлов.

Рассматриваемые нами методики были апробированы на трёх областных семинарах учителей биологии и химии в рамках практикума «Биология + экология + химия». Опыты вызвали интерес педагогов и желание применить предлагаемые нами методики для повышения у учащихся интереса к предметам естественнонаучного цикла.

В рамках школьных практикумов учащиеся нашего лицея проводили эксперименты по аналогичным методикам. В качестве источников тяжёлых металлов использовались соединения ртути, бария, свинца и ряда других металлов. Использовались и иные комплексообразователи. Во всех случаях в меньшей или большей степени наблюдался эффект защитного действия комплексонов. Очевидно, что говорить о негативном влиянии ионов тяжёлых металлов следует, учитывая конкретную форму его соединений. Эту истину мы, в известном смысле, подтвердили своими опытами.

**Выводы:**

1. Экспериментально установлено, что Трилон Б защищает белки, в том числе фермент пероксидазу, от коагулирующего действия ионов кадмия. Также установлено, что микроорганизмы (молочнокислые бактерии и дрожжи) сохраняют свою активность в присутствие значительных концентраций ионов кадмия, если в реакционную массу внести достаточное количество Трилона Б.

2. Предлагаемые в работе методики основаны на использовании доступных материалов и оборудования, апробированы на практических занятиях с учащимися, а также в рамках трёх областных семинаров педагогов-естественников. По оценке школьников и педагогов, предлагаемые нами лабораторные опыты способствуют повышению мотивации к изучению естественных наук, экологическому воспитанию и осмысленному отношению к проблеме здорового образа жизни.

3. Начаты эксперименты по поиску природных материалов растительного происхождения, способных связывать ионы тяжёлых металлов в прочные комплексы. В качестве перспективного материала рассматриваются ягоды чёрной смородины, сок которых явно снижает негативное влияние ионов кадмия на активность дрожжей.

4. Намечены задачи дальнейшей работы. Во-первых, поиск более перспективных комплексообразователей, способных селективно связывать ионы кадмия, свинца, ртути. Во-вторых, исследования экологических последствий загрязнения природной среды ионами тяжёлых металлов, при одновременном загрязнении комплексобразователями.

**Литература**

1. Р. Реннеберг. Эликсиры жизни. М.: Мир, 1997.

2. Кузнецов В.П. Всемогущие ферменты. М.: Знание, 1996.

3. Биохимическая очистка сточных вод предприятий химической промышленности. Ред. Л. М. Осенко. М.: Архитектура, 1992.

4. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Высшая школа, 1995.

5. Л.Ф.Голдовская, Химия окружающей среды. М.: Мир, 2015.

6. С. В. Алексеев, А. М. Беккер. Изучаем экологию - экспериментально. Л.: Санкт-Петербургский городской университет педагогического мастерства, 1993.

7. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биохимическая химия. М.: Медицина, 1999.

8. Николаев Л.А. Металлы в живых организмах. М.: Просвещение, 1986.

9. В.А.Афанасьев, Г.Е. Заиков, В мире катализа. М.: Наука, 1997.

10. Ф.Корте. Экологическая химия. Основы и концепции. М.: Мир, 1999.

11. А. Сассон. Биотехнология содержания и надежды. М.: Мир, 1997.

12. Мишунин И.Ф., Шевченко М.И. Этюды и биотехнологии. Киев.: Наукова Думка, 1995.

13.Морозов М.П. Микробиологическая промышленность–народному хозяйству. М.: Знание, 1997.

14. Я. Мусил и др. Современная биохимия в схемах. М.: Мир, 1998.

15. Николаев Л.А. Химия жизни. М.: Просвещение, 1987.

16. В. Д. Валова. Основы экологии. М.: Издательско- торговая компания «Дашков и К°», 2021.

17. Г. Хефлинг, Тревога в 2000 году. М.: Мысль, 1999.

18. Дмитровский А.А. Биохимия народному хозяйству. М.: Знание, 1997.

19. Филлипович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1982.

20. Пустовалова Л.М.. Практикум по биохимии. Ростов-на-Дону.: Феникс, 1999.

21. 11. Н.М.Чернова, А.М.Былова. Экология, М.: Просвещение, 2021.

22. Трушина Т.П., Экологические основы природопользования, Ростов-на-Дону.: Феникс. 2015.

23. В.Н. Сойфер. Молекулы живых клеток. М.: Знание, 1985.

24. Синельников В.Е. Проблемы чистой воды. М.: Знание, 1978.

25. Р. Доссон Д. Эллиот и другие «Справочник биохимика» Москва.: Мир, 1991

26. К.М. Макаров. Химия и здоровье. М.: Просвещение, 1985.

27. А. А. Нейфан. Клеточные и генетические основы биотехнологий. М.: Знание, 1997.

28. А.А.Горелов, Экология, М: Высшее образование. 2015.

29. С.С.Шварц, Экология и эволюция, М.: Знание. 1999.