

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. Каразіна

Кафедра хімічної метрології

УДК 543.442.5

До захисту допускаю



Завідувач кафедри

«13» грудня 2024р. д.х.н., проф. О.І. Юрченко

АТОМНО-АБСОРБЦІЙНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ МІДІ В БІОЛОГІЧНИХ
ЗРАЗКАХ

Кваліфікаційна робота магістра
студентки 2 курсу
хімічного факультету
СТАТІВКО КАТЕРИНИ
ВОЛОДИМИРІВНИ

Науковий керівник

д.х.н., проф.



Олег ЮРЧЕНКО

ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота містить: ст. 47, рис. 10, табл.1, використаних джерел 27.

Мета роботи: вивчити антибактеріальні властивості ефекта міді та можливі механізми дії антибактеріальних агентів, а також їх потенційні області застосування.

Об'єкт дослідження: біологічні зразки такі, як *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* та дослідження з використанням мікроводоростей *Dunaliella viridis*.

Предмет дослідження: є вивчення специфічних особливостей методу атомно-абсорбційної спектроскопії, що застосовується для кількісного визначення вмісту міді в біологічних матеріалах.

Методи дослідження: атомно – абсорбційна спектроскопія.

Результати та їх новизна: У ході роботи застосовувалися теоретичні методи, зокрема аналіз і систематизація наукової літератури з питань атомно – абсорбційного аналізу, а також способи підготовки біологічних зразків, підвищення чутливості методу, дослідження впливу міді на біологічні зразки. Дослідження здійснюється з опорою на сучасні досягнення в галузі атомно-абсорбційної спектроскопії, що відкриває перспективи для вдосконалення аналітичних підходів у дослідженні біологічних систем.

Ключові слова: АТОМНО – АБСОРБЦІЙНА СПЕКТРОСКОПІЯ, МІДЬ, АНТИБАКТЕРІАЛЬНІСТЬ, КЛІТИНА, ЧУТЛИВІСТЬ, БІОЛОГІЧНИЙ ЗРАЗОК, СПЕКТР, DUNALIELLA VIRIDIS, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, PSEUDOMONAS AERUGINOSA

ABSTRACT

The qualification work contains: p. 47, fig. 10, table 1, sources used 27.

Purpose of the work: to study the antibacterial properties of the copper effect and possible mechanisms of action of antibacterial agents, as well as their potential areas of application.

Object of the study: biological samples such as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and studies using the microalgae *Dunaliella viridis*.

Subject of research: is the study of specific features of the atomic absorption spectroscopy method used for quantitative determination of copper content in biological materials.

Research methods: atomic absorption spectroscopy.

Results and their novelty: During the work, theoretical methods were used, in particular, analysis and systematization of scientific literature on atomic absorption analysis, as well as methods of preparing biological samples, increasing the sensitivity of the method, and studying the effect of copper on biological samples. The research is carried out based on modern achievements in the field of atomic absorption spectroscopy, which opens up prospects for improving analytical approaches in the study of biological systems.

Keywords: ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY, COPPER, ANTIBACTERIALITY, CELL, SENSITIVITY, BIOLOGICAL SAMPLE, SPECTRUM, DUNALIELLA VIRIDIS, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, PSEUDOMONAS AERUGINOSA

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	6
1.1 Методи визначення міді	6
1.1.1 Люмінесцентний метод аналізу.....	6
1.1.2 Атомно – емісійна спектрометрія	7
1.1.3 Хромато – мас – спектрометрія.....	8
1.1.4 Метод атомно – абсорбційної спектрометрії	9
1.2 Визначення антибактеріальної активності трьох форм міді	11
1.3 Способи підготовки зразків	14
1.3.1 Способи одержання зразків тонкошарової металізованої міді.	14
1.3.2 Методи одержання хелатної форми міді в клітинах мікроводоростей <i>Dunaliella viridis</i>	15
1.4 Методи підвищення чутливості визначення аналітів методом атомної абсорбційної спектрометрії	16
1.5 Методи верифікації результатів аналізу.....	17
1.6 Дослідження впливу міді на біологічні зразки	19
1.6.1 Біологічне значення міді	19
1.6.2 Стійкість <i>Staphylococcus aureus</i> 124 і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18 до тканини з напиленням тонкого шару міді (3 мкм).	22
1.6.3 Стійкість <i>Staphylococcus aureus</i> 124 і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18 до дії іонів міді	24
1.6.4 Стійкість <i>Staphylococcus aureus</i> 124 і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18 до дії міді в хелатній формі	26
1.6.5 Дослідження було присвячене вивченню здатності штамів мікроводоростей <i>D. v-Cu.S</i> та <i>D. v-Cu.R</i> до біосорбції іонів міді.	33
1.6.6 Дослідження ефективності вилучення біологічно активних компонентів	36
ВИСНОВКИ	42
ОХОРОНА ПРАЦІ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	45

ВСТУП

Мідь є незамінним мікроелементом, що має вирішальне значення для нормального функціонування людського організму.

Вона є незамінним елементом, який забезпечує функціонування багатьох біологічних систем, включаючи ферментативні реакції, метаболізм заліза, підтримку структури тканин та регуляцію судинного тонуусу. Дефіцит та надлишок міді можуть призводити до значних порушень здоров'я. Особливу увагу слід приділити цьому питанню пацієнтам, які застосовують медикаментозну терапію або лікувально-сольові розчини, оскільки у них ризик розвитку негативних наслідків може бути вищим. Регуляція рівня міді в організмі є критичною для підтримки гомеостазу та попередження патологічних станів, що підкреслює її ключове значення у біології та медицині

Дана проблематика є надзвичайно актуальною та перспективною з огляду на її життєво важливий характер. Контроль рівня міді має вирішальне значення в процесах виробництва харчових продуктів та медичних препаратів, що підкреслює необхідність ретельного моніторингу цього показника.

Задачі даної роботи:

1. Здійснити аналіз літературних джерел щодо методів визначення вмісту міді у складних матеріалах, а також розглянути сучасні підходи до підготовки проб;
2. Розглянути способи підготовки біологічних зразків;
3. В рамках даної роботи необхідно дослідити методики підвищення чутливості виявлення аналітів за допомогою атомно-абсорбційного методу та провести верифікацію їхньої точності;
4. Розглянути дослідження впливу міді в різних формах на біологічні зразки *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Методи визначення міді

1.1.1 Люмінесцентний метод аналізу

Люмінесценцією – це явище світіння холодних тіл. Вона виникає внаслідок поглинання речовинами первинної енергії та випромінювання майже всієї або деякої частини цієї енергії у вигляді світлового випромінювання.

Залежно від виду первинної енергії (світлової, хімічної, механічної та ін.) .

Розрізняють:

- фотолюмінесценцію (заснована на світінні при поглинанні променистої або світлової енергії);
- хімілюмінесценцію (свічення речовини під дією деяких хімічних процесів);
- триболюмінесценцію (люмінесценція тертя);
- катодолюмінесценцію (свічення викликане бомбардуванням швидколетючих електронів) та його інші види.

У практиці фізико – хімічного аналізу найбільшого значення набула фотолюмінесценція. Розрізняють два її види:

1) фосфоресценція – світіння триває більш менш тривалий час після зняття джерела збудження;

2) флюоресценція – світіння припиняється відразу після зняття джерела збудження (протягом $(10^{-9} - 10^{-7})$ с) цей вид фотолюмінесценції є найбільш прийнятним для аналітичних цілей .

1.1.2 Атомно – емісійна спектрометрія

Мета емісійного спектрального аналізу полягає в якісному виявленні, в напів кількісному або точному кількісному визначенні елементів в аналізованій речовині.

Атомно – емісійна спектроскопія (АЕС), або атомно – емісійний спектральний аналіз – сукупність методів елементного аналізу, що ґрунтуються на вивченні спектрів випуску вільних атомів та іонів у газовій фазі.

Виділяють два види атомно – емісійного спектрального аналізу:

- якісний;
- кількісний.

При якісному атомно – емісійному спектральному аналізі спектри проб порівнюють зі спектрами відомих елементів, зазначених у відповідних довідниках та таблицях спектральних ліній, і таким чином встановлюють елементний склад речовини, що аналізується.

При кількісному аналізі визначають кількість (концентрацію) розшукуваного елемента в аналізованій речовині залежно від величини аналітичного сигналу шуканого елемента від його вмісту в пробі. Ця залежність складно визначається багатьма важко контрольованими факторами (валовий склад проб, їх структура, дисперсність, параметри джерела збудження спектрів, нестабільність реєструючих пристроїв, властивості фотопластинок і ін.). Тому, як правило, для її встановлення використовують набір зразків для градування, які за валовим складом та структурою ближче до аналізованої речовини і містять відомі кількості певних елементів.

Принцип дії атомно – емісійного спектрометра є досить простим. Він ґрунтується на тому, що атоми кожного елемента можуть випромінювати світло певних довжин хвиль – спектральні лінії, причому ці довжини хвиль різні для різних елементів. Для того, щоб атоми почали випромінювати світло, їх необхідно порушити – нагріванням, електричним розрядом, лазером або іншим способом. Чим більше атомів даного елемента є в аналізованому зразку, тим яскравіше буде випромінювання відповідної довжини хвилі.

1.1.3 Хромато – мас – спектрометрія

Хромато – мас – спектрометрія – метод аналізу, що ґрунтується на можливостях мас – спектрографа та хроматографа. Використовується для чисельного та якісного виявлення змісту окремих частин у складних складах.

Існують два варіанти хромато – мас – спектрометрії – комбінація мас-спектрометричного методу з рідинною або газо-рідинною хроматографією. Залежно від цього виробляється аналіз речовини, що у рідкому чи газоподібному стані.

Для хромато – мас – спектрометрії гелій є найзручнішим газом – носієм. Від ступеня його витрати залежить ефективність роботи сепаратора. У разі оптимальної витрати 20-30 мл/хв видаляється близько 3% газу носія. При цьому в прилад надходить близько 60% речовини, що аналізується. При використанні капілярної хроматографічної колонки газ-носій витрачається в межах 2-3 мл/хв. У газовий потік на виході додають додатковий об'єм носія, щоб збільшити швидкість потоку до 20-30 мл/хв. Забезпечується максимальна ефективність сепаратора.

Речовину, яка використовується для аналізу, вводять у випарник хроматографа. Там вона трансформується у газоподібну форму, змішується з газом-носієм і надходить під тиском у колонку. Суміш поділяється на компоненти, які з колонки потрапляють до сепаратора, звідки видаляється газ-носій. Газовий потік, збагачений органічною речовиною, прямує в іонне джерело мас-спектрометра для іонізації молекул. Кількість іонів, що утворюються в процесі, пропорційно рівному обсягу речовини, що надходить.

Використання хромато – мас – спектрометра – найкращий спосіб безпомилково визначити кількісний і якісний склад матеріалу, що вивчається (рідини, газу), наявність домішок, залишковий вміст елементів. Це найточніший і зручний спосіб дослідження, що гарантує безпомилковий результат.

1.1.4 Метод атомно – абсорбційної спектроскопії

Атомно-абсорбційний метод аналізу є одним із найточніших інструментів для визначення концентрацій металів у різних зразках. Цей метод базується на явищі поглинання світла атомами в газовій фазі, яке відбувається при переході атомів з основного стану до збудженого під впливом випромінювання певної довжини хвилі. Кожен хімічний елемент має унікальний спектр поглинання, що дозволяє ідентифікувати його з високою специфічністю. Завдяки цьому атомно-абсорбційний аналіз забезпечує високу чутливість і точність, що робить його надзвичайно корисним для досліджень, де потрібно визначити концентрації металів у малих кількостях [1].

Однією з головних переваг атомно-абсорбційного методу є його здатність забезпечувати надійні результати навіть при роботі з надзвичайно низькими концентраціями металів. Це досягається завдяки високій чутливості методу, що дозволяє визначати мікрограмові або навіть нанограмові кількості елементів у зразках. Така чутливість є надзвичайно корисною у випадках, коли точність вимірювань критична, наприклад, при оцінці токсичних металів у біологічних тканинах або при визначенні рівнів есенціальних мікроелементів у біохімічних дослідженнях. Крім того, метод забезпечує високу специфічність до окремих елементів, що дозволяє уникати помилкових результатів через вплив сторонніх компонентів у зразках.

Ще однією визначною особливістю цього методу є його універсальність, яка дозволяє проводити аналіз широкого спектра зразків, включаючи біологічні тканини, ґрунти, воду, повітряні аерозолі тощо. У біологічних дослідженнях метод використовується для визначення концентрацій металів, таких як залізо, мідь, цинк, магній та кальцій, які відіграють ключову роль у метаболічних процесах організму.

Метод атомно-абсорбційного аналізу також є невід'ємною частиною харчової промисловості, де його застосовують для контролю якості продуктів харчування. У промислових процесах цей метод використовується для контролю якості матеріалів та оцінки вмісту металів у сплавах, рудних матеріалах або напівфабрикатах.

Висока чутливість атомно-абсорбційного аналізу зумовлена використанням спектрометрів, які здатні реєструвати зміни інтенсивності випромінювання з високою точністю. У сучасних приладах застосовуються лампи з порожнистим катодом, що забезпечують випромінювання вузького спектра, який відповідає спектру поглинання визначуваного елемента. Це дозволяє значно підвищити точність вимірювань і зменшити вплив перешкод. Крім того, використання автоматизованих систем управління та обробки даних дозволяє знизити похибки, пов'язані з людським фактором, що ще більше підвищує надійність результатів.

Для підготовки зразків в атомно-абсорбційному аналізі можуть використовуватися різні методи, такі як розчинення, екстракція або розпилення. Це забезпечує можливість адаптації методу до специфічних вимог дослідження. Для біологічних зразків, таких як тканини або рідини, застосовуються методи ферментативного або хімічного гідролізу, які дозволяють уникнути втрат цільових елементів під час підготовки.

Унікальність атомно-абсорбційного аналізу також полягає у можливості визначення елементів в умовах багатоконпонентного середовища. Завдяки високій специфічності, метод дозволяє визначати елементи навіть у присутності значних кількостей інших речовин, які могли б створювати перешкоди у менш точних методах. Це особливо актуально у біологічних та екологічних дослідженнях, де зразки часто містять складні матриці, такі як білки, органічні речовини або мінеральні компоненти [2].

Важливим аспектом застосування методу є можливість визначення не лише загального вмісту металів у зразках, але й їхнього специфічного стану, наприклад, іонної чи хелатної форми. Ця властивість є особливо корисною для вивчення біодоступності металів у біологічних системах або їхньої токсичності в екологічних середовищах. Наприклад, іонна форма міді може демонструвати значну токсичність для водних організмів, тоді як хелатовані форми є менш небезпечними. Завдяки атомно-абсорбційному аналізу можна визначити співвідношення цих форм і оцінити їхній вплив на навколишнє середовище.

У сфері наукових досліджень атомно-абсорбційний метод аналізу застосовується для вивчення біологічних процесів, таких як транспорт металів у клітинах або їхня

участь у каталітичних реакціях. У медицині цей метод використовується для оцінки рівнів металів у біологічних рідинах, таких як кров чи сеча, що дозволяє діагностувати порушення мінерального обміну або вплив токсичних металів на організм.

Антибіотикорезистентність, яка виникла як одна з найсерйозніших глобальних проблем охорони здоров'я внаслідок багаторічного використання антибіотиків, стимулює пошук альтернативних підходів до боротьби з патогенними мікроорганізмами. В контексті цих досліджень особливу увагу привертають іони металів, зокрема мідь, які демонструють виражену антибактеріальну активність. Мідь є ключовим мікроелементом, що бере участь у багатьох біохімічних процесах і є невід'ємною частиною фізіології організмів. Здатність міді проявляти антибактеріальні властивості відкриває нові можливості для розробки ефективних засобів боротьби з госпітальними інфекціями, зокрема такими, як *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* [3].

1.2 Визначення антибактеріальної активності трьох форм міді

Намагаючись визначити, чи відповідальні частинки на основі міді або іони міді, які вони виділяють у водному середовищі, за визначення антимікробної активності, необхідно ретельно враховувати низку аспектів. По-перше, при проведенні стандартних бактеріологічних аналізів загальний вплив частинок або розчинної міді визначається взаємодією між часом і швидкістю розчинення частинок. По-друге, хімічний склад міді складний. При типових біологічних (близьких до нейтральних) значеннях рН частинки можуть утворюватися при додаванні "розчинних" солей у фазу розчину в результаті утворення оксо-гідроксидів, полімеризації, зшивання і осадження. Нарешті, частинки, що утворилися випадково або спеціально додані в рідку фазу, можуть агломеруватися і/або агрегувати. Таким чином, відсутні дослідження, що дозволяють точно визначити, які бактерії зазнають впливу частинок на основі міді і, отже, яка хімічна форма є активною

Визначення антибактеріальної активності проводили класичним методом дисків і методом колодязів на зразках колекції інституту мікробіології та імунології імені Мечникова І. І., де в якості тест-культур використовували *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18.

Приготування мікробної суспензії штамів (мікроорганізмів) проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробництво PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Мікробну суспензію штамів готували наступним чином: синхронізацію культур штамів проводили з використанням низької температури (4 °С). Мікробне навантаження складало 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалася за стандартом McFarland. В досліді використовували 18-24 годинну культуру штамів мікроорганізмів. Для культивування використовували агар Мюллера-Хінтона.

Визначення протимікробної активності досліджуваних зразків проводили на двох шарах щільного живильного середовища, розлитої в чашки Петрі (діаметром 100 мм і висотою 15 мм). У нижньому шарі використовували "голодну" незасіяну середу (агар-агар, вода, сіль). Цей шар є підкладкою із середовища об'ємом ($10,0 \pm 0,3$) мл, на яку строго горизонтально встановлюють 6 тонкостінних циліндрів з нержавіючої сталі діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливають верхній шар, що складається з живильного агаризованого середовища, розплавленого та охолодженого до температури ($40,0 \pm 0,5$) °С, в яке вносили відповідний стандарт добової тест-культури мікроорганізму. Попередньо верхній шар добре перемішували до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягували і в утворенні лунки поміщали досліджувані зразки в об'ємі 0,3 мл. Об'єм середовища для верхнього шару становив ($15,0 \pm 0,5$) мл. Чашки підсушували 30 - 40 хвилин при кімнатній температурі і ставили в термостат на 18 - 24 години. Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів заміряли за допомогою мірної лінійки з точністю вимірювання 1,0 мм.

При оцінці антибактеріальної активності досліджуваних зразків застосовували наступні критерії:

– відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного в лунку препарату або концентрації антимікробної речовини;

– зони затримки росту діаметром 10 - 15 мм вказують на малу чутливість культури до досліджуваної концентрації антимікробної речовини;

– зони затримки росту діаметром 15 - 25 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до досліджуваної субстанції;

– зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високої чутливості мікроорганізмів до досліджуваної концентрації субстанції.

У джерелі згадується, що для визначення антибактеріальної активності наночастинок міді (CuNPs) можна використовувати різні методи, включаючи дифузійний тест на диску, мінімальну інгібуючу концентрацію (MIC) та мінімальну бактерицидну концентрацію (MBC) [4]. На засіяну відповідним мікроорганізмом поверхню агару накладали диски діаметром 3 мм попередньо змочені в розчині випробуваного зразка або накладали невелику кількість біомаси мікроводоростей. При оцінці антибактеріальної активності досліджуваних екстрактів і їх модифікацій застосовували наступні критерії:

– відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо диска, вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до препарату або концентрації антимікробних субстанцій;

– зони затримки росту діаметром 5-8 мм вказують на малу чутливість культури до досліджуваної концентрації антимікробної речовини;

– зони затримки росту діаметром 9 - 14 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до концентрації досліджуваної речовини;

– зони затримки росту, діаметр яких перевищує 15 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваної концентрації антимікробної речовини.

1.3 Способи підготовки зразків

1.3.1 Способи одержання зразків тонкошарової металізованої міді.

Мідне покриття наносили на тканину, напруга на розряді магнетронної розпилювальної системи становило 600 В, при струмі розряду 10 А і вакуум у камері нанесення 8×10^{-2} Па. Була отримана тканина з шаром міді 3 мкм, розміри зразків $1,0 \times 0,6$ м². Товщина мідного покриття визначали з допомогою інтерферометра Линника на зразках-свідках, які розміщувалися в зоні нанесення покриття. Зовнішній вигляд тканини з мідним покриттям відрізнявся від вихідної тканини зображено на рис.1.1, I.

Мікроструктура мідного покриття досліджувалась за допомогою скануючого растрового електронного мікроскопа РЕМ-101 зображено на рис.1.1, II.

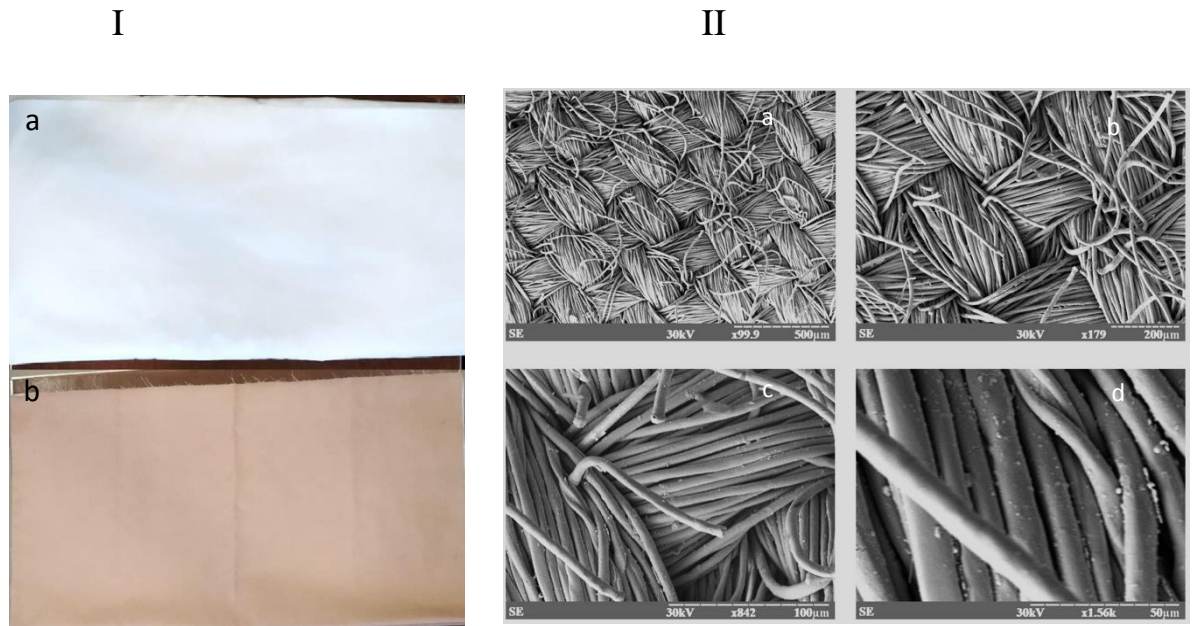


Рисунок 1.1 - Мікроструктура мідного покриття: I - зовнішній вигляд тканинної основи (а), на яку нанесений шар міді товщиною 3 мкм; II - зображення рельєфу поверхні металізованої тканини з міддю при різних збільшеннях (а – x 99.9, b – x 179, c – x 842, d – x1.56k)

Визначення антибактеріальної активності металізованої міддю тканини проводили, як вже було описано, а в якості контрольного варіанту використовували ту ж тканину без нанесення міді.

1.3.2 Методи одержання хелатної форми міді в клітинах мікроводоростей *Dunaliella viridis*

Для визначення залежності антибактеріальної активності іонної форми міді і хелатної форми міді додатково внесено в гомогенати клітин *Dunaliella* сірчаноокислу мідь до кінцевих концентрацій 1, 7, 15 г/л. Культурні клітини піддавали змішуванню та інкубації протягом тридцяти хвилин. Після цього отриману суспензію гомогенізували, а зразки центрифугували за умов 6000 g протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Під час дослідження осаду клітинних фрагментів та отриманої воднісі фази після їх відділення визначали концентрацію міді за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра іСЕ 3500. Методика аналізу детально описана у вказаній праці [4]. а в аліквотах антибактеріальну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18.

Для оцінки впливу додавання сульфату міді на розчинність компонентів мікроводоріснів, проводився спектральний аналіз водних екстрактів за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-2600 при довжинах хвиль 200-400нм.

При оцінці антибактеріальної дії іонів міді використовували водний розчин сірчаноокислої міді в концентраціях: 0,25; 0,5; 1,0; 7,0; 15,0; 20,0 і 25 г/л, яка тестувалася на антибактеріальну активність до двох видів бактерій, як вже було описано.

Електропровідність зразків вимірювали на векторному мережевому аналізаторі Rohde & Schwarz ZNB40.

Отримані дані було проаналізовано за допомогою статистичних методів за допомогою програмного пакету Statistica 5.0. У таблицях і графіках представлено середні значення, розраховані з урахуванням стандартної похибки.

1.4 Методи підвищення чутливості визначення аналітів методом атомної абсорбційної спектроскопії

Ефективність атомно-абсорбційного аналізу залежить від ймовірності електронного переходу в атомі, типу застосовуваного атомізатора (полум'яний або електротермічний) та його ефективності. Можливості маніпуляції чутливістю всередині певного типу та конструкції атомізатора обмежені.

В приладах з полум'яним атомізатором діапазон варіації характерних концентрацій становить лише 2-5 разів, тоді як в приладах з електротермічними атомізаторами - не більше одного порядку.

Наявність поверхнево-активних речовин (ПАР) на межі розподілу фаз знижує поверхневий натяг, в'язкість та розміри крапель аерозолю, що впливає на окисно-відновні властивості полум'я, розподіл заряду молекул та ефективність збудження. Використання ПАР може як збільшити, так і зменшити швидкість реакції або змінити її вихід.

Хоча органічні речовини можуть покращувати процеси розпилення та випаровування зразка, тим самим підвищуючи чутливість аналітичних вимірювань в полум'яній атомно-абсорбційній спектрометрії, їх висока токсичність та вартість не відповідають принципам зеленої хімії.

Альтернативним способом підвищення чутливості є використання атомної кварцової трубки з двома поздовжніми розрізами, яка розміщується над пальником. Застосування такої трубки дозволяє покращити характерну концентрацію в 2-3 рази порівняно зі стандартним методом. Подібне поліпшення спостерігається і для меж виявлення.

Наприклад, для елементів Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Pt, Sb, Se, Te, Tl межі виявлення (нг/г) без використання трубки становлять відповідно 0.0019, 0.0148, 0.0766, 0.0047, 0.0066, 0.0110, 0.3094, 0.0025, 0.0301, 0.1220, 0.0678, 0.1381, 0.0760, 0.0112, а з використанням трубки - 0.0020, 0.0036, 0.0177, 0.0011, 0.0056, 0.0102, 0.1121, 0.0019, 0.0090, 0.0967, 0.0462, 0.0927, 0.0492, 0.0052.

1.5 Методи верифікації результатів аналізу

В аналітичній хімії важлива достовірність одержуваних результатів. Для її перевірки існує кілька ключових методів, кожен з яких призначений для вирішення специфічних завдань і має свої переваги та недоліки. Серед них найбільш поширені метод стандартних добавок, метод стандартних зразків (СЗ) та порівняння з незалежним методом.

Метод стандартних зразків – це еталонний підхід, заснований на використанні матеріалів з відомим складом, максимально наближеним до аналізованого зразка. СЗ проходять ретельну підготовку та сертифікацію в акредитованих лабораторіях, гарантуючи високу точність та відтворюваність даних про зміст визначених компонентів. Важливо, що вибір СЗ повинен здійснюватися з урахуванням матричного складу аналізованого зразка. Ідеально, якщо матричний склад буде максимально наближений до матриці аналізованої речовини. В іншому випадку можуть виникати матричні ефекти, що спотворюють результати аналізу. Наприклад, при визначенні важких металів у ґрунті ЗІ повинні мати схожий мінералогічний склад, вміст органічних речовин та рівень рН. Використання невідповідних СЗ може призвести до систематичних помилок та недостовірних результатів. Крім того, для забезпечення високої точності та достовірності стандартні зразки повинні мати сертифікати, що підтверджують їх метрологічні характеристики (невизначеність вимірювання змісту визначених компонентів).

Метод стандартних добавок, своєю чергою, незамінний під час аналізу зразків зі складною, невідомою матрицею. Суть методу полягає у додаванні до аналізованого зразка відомих кількостей визначається речовини (стандартної добавки). Побудова градувального графіка за отриманими результатами дозволяє визначити зміст аналіту у вихідному зразку шляхом екстраполяції. Цей метод дозволяє компенсувати вплив матричних ефектів, так як добавка вноситься в ту саму матрицю. Проте метод стандартних добавок чутливий до похибок дозування і вимагає високої точності вимірювань. Важливо враховувати можливі нелінійні ефекти, які можуть спотворити результати. Наприклад, при високих концентраціях аналіту може спостерігатися придушення сигналу, що вимагатиме застосування відповідних коригувань обробки даних.

Порівняння із незалежним методом – це потужний інструмент перевірки точності результатів. У цьому випадку аналізований зразок досліджується двома різними методами, що не мають загальних систематичних похибок. Важливо, щоб ці методи ґрунтувалися на різних фізико-хімічних принципах, за винятком впливу однакових джерел помилок. Наприклад, можна порівняти результати атомно-абсорбційної спектрометрії (ААС) та індуктивно-пов'язаної плазмової мас-спектрометрії (ІСП-МС) для визначення вмісту важких металів. Після проведення аналізу обома методами n разів, отримують середні значення та стандартні відхилення для кожного методу. Для порівняння точності використовується F -критерій Фішера. Якщо розраховане значення F -критерію менше табличного значення при заданому рівні значущості, дисперсії результатів двох методів не відрізняються статистично значуще, що вказує на високу точність отриманих даних. У цьому випадку результати можна поєднати, збільшивши таким чином статистичну потужність дослідження. Однак, якщо значення F -критерію перевищує табличне значення, це свідчить про наявність значних відмінностей у точності методів, і необхідно встановити причину розбіжності та переглянути методики аналізу.

На закінчення для забезпечення достовірності результатів аналітичних досліджень необхідно використовувати комплексний підхід, що поєднує різні методи перевірки точності. Вибір конкретного методу залежить від типу аналізованого зразка, необхідної

точності та наявності доступного обладнання. Тільки комплексний підхід до контролю якості дозволяє гарантувати високу надійність отриманих даних та їх подальшого використання у прийнятті обґрунтованих рішень.

1.6 Дослідження впливу міді на біологічні зразки

1.6.1 Біологічне значення міді

Біологічне значення міді зумовлено її участю в ключових процесах обміну речовин. У живих організмах мідь є есенціальним мікроелементом, що забезпечує функціонування низки ферментів, таких як цитохромоксидаза, супероксиддисмутаза та церулоплазмін. Ці ферменти беруть участь у процесах переносу електронів, детоксикації активних форм кисню та метаболізмі заліза. Здатність міді до зміни ступеня окислення (від $Cu(I)$ до $Cu(II)$) забезпечує її високу ефективність у каталітичних реакціях, що відбуваються у біологічних системах.

Водночас, надмірна концентрація міді може викликати токсичні ефекти через утворення реактивних форм кисню, які пошкоджують клітинні мембрани, білки та ДНК. Це зумовлює необхідність точного контролю за рівнями міді в організмі, що досягається завдяки спеціалізованим білкам-транспортерам, таким як металотіонеїни. Порухення балансу міді може призводити до розвитку патологічних станів, зокрема, хвороби Вільсона, яка характеризується накопиченням міді у тканинах та викликає пошкодження печінки та центральної нервової системи.

У сфері охорони здоров'я мідь використовується як антибактеріальний агент завдяки її здатності знищувати широкий спектр мікроорганізмів. Ця властивість зумовлена впливом іонів міді на клітинні мембрани бактерій, що призводить до їхньої руйнації. Антимікробна активність міді широко застосовується у виготовленні медичних інструментів, антисептичних поверхонь та матеріалів для боротьби з госпітальними інфекціями.

Мідь є есенціальним мікроелементом, що відіграє вирішальну роль у функціонуванні багатьох біологічних систем. Її хімічні властивості, такі як здатність змінювати ступінь окислення між Cu(I) та Cu(II) , роблять її незамінною у ферментативних реакціях, що забезпечують основні фізіологічні процеси. В організмі мідь бере участь у тканинному диханні, є кофактором багатьох ферментів, що забезпечують транспортування електронів, синтез білків, метаболізм заліза та інші процеси, критичні для гомеостазу.

Мідь є компонентом таких ферментів, як цитохромоксидаза, що забезпечує останній етап ланцюга перенесення електронів у мітохондріях. Її участь у цьому процесі є ключовою для виробництва АТФ – універсального джерела енергії для клітин. Інший фермент, супероксиддисмутаза, що також містить мідь, бере участь у детоксикації активних форм кисню, які утворюються під час клітинного дихання. Цей фермент перетворює супероксидний аніон на менш токсичні сполуки, такі як перекис водню, тим самим запобігаючи оксидативному стресу, який може пошкоджувати клітинні структури.

Мідь також відіграє роль у формуванні кісткової тканини та сполучних тканин. Вона входить до складу ферменту лізілоксидази, який каталізує ковалентне зшивання колагенових та еластинових волокон. Цей процес забезпечує міцність і еластичність тканин, що необхідно для нормального функціонування скелетної системи, кровоносних судин і шкіри. Недостатність міді в організмі може призводити до порушення синтезу цих волокон, що зумовлює ламкість кісток, порушення формування кровоносних судин та ослаблення сполучної тканини [10].

Одним із критичних процесів, у яких бере участь мідь, є метаболізм заліза. Мідь залежний фермент церулоплазмін каталізує окислення Fe(II) до Fe(III) , необхідного для транспорту заліза в організмі та утворення гемоглобіну. Порушення цього процесу через дефіцит міді може призводити до анемії, оскільки залізо не може ефективно включатися до складу еритроцитів. Анемія, спричинена дефіцитом міді, часто супроводжується підвищеним рівнем сироваткового заліза через порушення його утилізації.

Надлишок міді, однак, може бути токсичним для організму. Мідь, накопичуючись у тканинах, може сприяти утворенню реактивних форм кисню через реакції Фентона, які пошкоджують клітинні мембрани, білки та ДНК. Така токсичність є основою патологічних станів, зокрема хвороби Вільсона, що характеризується накопиченням міді в печінці, мозку та інших органах. Пацієнти з цим захворюванням відчувають пошкодження печінки, неврологічні розлади та інші симптоми, зумовлені оксидативним стресом.

Дефіцит міді також має серйозні наслідки для організму. Недостатність цього елемента призводить до ослаблення імунної системи через порушення функціонування імунних клітин, які залежать від медьвмісних ферментів. Крім того, дефіцит міді може спричиняти неврологічні розлади, такі як атаксія або периферична нейропатія, через порушення формування мієлінових оболонок нервових волокон [11].

Здатність міді до хелатування відіграє важливу роль у біологічних системах, дозволяючи регулювати її концентрацію та токсичність. У нормальних умовах мідь транспортується в організмі за допомогою спеціалізованих білків, таких як церулоплазмін, альбумін та металоферетини, які забезпечують її розподіл і запобігають надмірній активації оксидативних реакцій. Однак у разі порушення цих механізмів може виникати або дефіцит, або надлишок міді, кожен з яких має специфічні патофізіологічні наслідки.

Мідь є невід'ємною частиною системи регуляції судинного тону. Вона бере участь у синтезі оксиду азоту (NO), який є ключовим вазодилататором. Порушення рівня міді може негативно впливати на стан судин, спричиняючи гіпертензію та інші серцево-судинні розлади. Крім того, дослідження показують, що мідь може впливати на ліпідний обмін, регулюючи рівень холестерину та попереджаючи розвиток атеросклерозу.

Сучасні дослідження вказують на те, що мідь має потенційний вплив на нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера. Надлишок або дисбаланс міді може сприяти утворенню токсичних агрегатів білків, що є характерним для цього захворювання. Розуміння цих механізмів відкриває перспективи для створення терапевтичних стратегій, спрямованих на регулювання рівня міді в організмі [12].

Таким чином, мідь є незамінним елементом, який забезпечує функціонування багатьох біологічних систем, включаючи ферментативні реакції, метаболізм заліза, підтримку структури тканин та регуляцію судинного тонусу. Як дефіцит, так і надлишок міді мають серйозні наслідки для здоров'я, зокрема анемію, порушення імунітету, токсичність, неврологічні та серцево-судинні захворювання. Регуляція рівня міді в організмі є критичною для підтримки гомеостазу та попередження патологічних станів, що підкреслює її ключове значення у біології та медицині.

1.6.2 Стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до тканини з напиленням тонкого шару міді (3 мкм).

У даному дослідженні був застосований антибіотик меропенем – протимікробний засіб системної дії, який інгібує синтез компонентів клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних бактерій шляхом зв'язування з білками РВР (ті ж білки, які зв'язують пеніцилін).

Показано, що меропенем при тестуванні на двох різних видах бактерій, забезпечував затримку росту для *Staphylococcus aureus* 124, яка становила $24,9 \pm 0,5$ мм при використанні тесту паперових дисків рис.1.3 А. У той же час, цей антибіотик не інгібував ріст *Pseudomonas aeruginosa* 18, що проявлялося у відсутності затримки росту цієї бактеріальної культури рис.1.2 А.

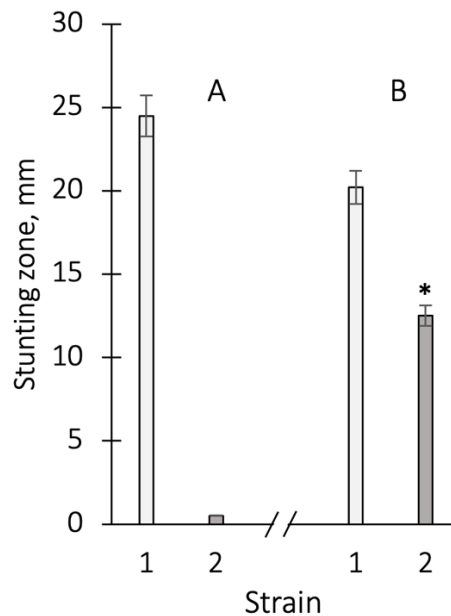


Рисунок 1.2 - Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) при тестуванні методом паперових дисків антибіотику меропенему (А), а також тканини з нанесеним шаром міді товщиною 3мкм (В). Представлені середні значення з 3 - 5 експериментів та їх стандартні помилки. * відмічені відмінності межакою антибіотиком і тканиною для варіантів у яких $P < 0,05$ порівняно з меропенемом.

Таким чином, меропенем виявляє виражену антибактеріальну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus* 124 не впливаючи на *Pseudomonas aeruginosa* 18. Отримані результати підтверджують наявність вираженої видової бактеріальної чутливості до дії цього антибіотику.

Тканина на якій був нанесений шар міді в 3 мкм забезпечувала затримку росту *Staphylococcus aureus* 124 на 21,2 мм, що становило 85 % порівняно з меропенемом і є показником високої чутливості цієї культури до дії міді, нанесеної на тканину рис.1.2, В.

Тканина з тонким шаром міді пригнічувала ріст не тільки *Staphylococcus*, але і *Pseudomonas*, на відміну від антибіотику, хоча і в меншій мірі, тільки на 50,2 % в порівнянні з антибіотиком для *Staphylococcus aureus* 124 рис.1.2, В. Отже, тонкий шар міді, нанесений на тканину, проявляв виражену антибактеріальну активність по відношенню до *Staphylococcus*, так і слабо виражену активність до *Pseudomonas*.

Розробка способів одержання і використання міді, нанесеної на тканину та інші матеріали представляє великий практичний інтерес в якості антибактеріальних засобів. Однак, для цього непотрібні знання механізмів антибактеріальної дії таких матеріалів. З цією метою перевіряли гіпотезу, згідно з якою, антибактеріальну дію міді, нанесеної на тканину, пов'язана з тим, що при його контакті з біологічними «субстратами» має місце іонізація міді, яка й виявляє інгібуючу дію на клітини бактерій.

1.6.3 Стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до дії іонів міді

При тестуванні стійкості *Staphylococcus aureus* 124 до дії іонів міді (водний розчин сірчаноокислої міді) методом паперових дисків, виявили, що концентрації 0,25 і 0,5 г/л не впливали на зростання цього штаму, при досягненні концентрації сірчаноокислої міді в 1 г/л, мало місце незначне пригнічення росту, а при 7 г/л зона затримки росту становила від 16 до 20 мм, що можна кваліфікувати як відносно високу чутливість *Staphylococcus aureus* 124, однак поступалася міді на тканини рис.1.3, А,1. Подальше збільшення концентрації сірчаноокислої міді не впливало на інгібування швидкості росту *Staphylococcus aureus* 124, тобто мало місце вихід кривий антибактеріальної активності на плато рис.1.3, 1.

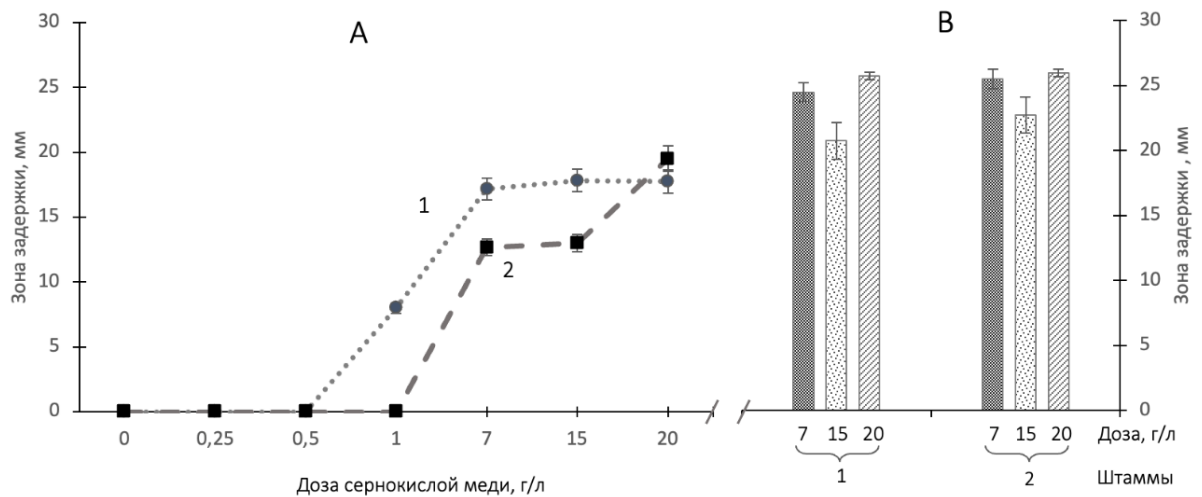


Рисунок 1.3 - Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) при нанесенні сірчаноокислої міді на паперові диски в різних дозах після культивування протягом 24 годин при температурі -37°C (А) і в разі завдання сірчаноокислої міді в дозах: 7, 15 і 20 г/л у колодязі гелю – для *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) (В). Представлені середні значення та їх стандартні помилки з трьох експериментів.

У той же час *Pseudomonas aeruginosa* 18 володів меншою чутливістю до іонів міді порівняно з *Staphylococcus aureus* 124 при тестуванні на паперових дисках рис.1.3, А. Необхідно відзначити, що при великих концентраціях сірчаноокислої міді в 7-20 г/л затримка росту для *Pseudomonas aeruginosa* 18 була схожою з такою для *Staphylococcus aureus* 124 рис.1.3, 2.

Як відомо, зона затримки росту бактеріальних культур залежить не тільки від концентрації досліджуваних сполук, але і від швидкості дифузії антибактеріальних сполук в гель. У зв'язку з цим визначали зони затримки росту культур при використанні «дифузійного методу або нанесення сірчаноокислої міді методом «колодязів». Виявили, що в цьому випадку ефективність затримки росту при високих концентраціях сірчаноокислої міді була такою ж, як і дія міді нанесене на тканину, і практично не поступалося мерепенему, однак іони міді інгібували зростання двох досліджуваних штамів, а не одного, як при застосуванні антибіотика рис.1.3, В.

Отже, іони міді мають здатність інгібувати ріст *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18. Ефективність затримки росту залежить від концентрації, і ця залежність має насичуючий характер. *Pseudomonas aeruginosa* 18 володів меншою чутливістю порівняно з *Staphylococcus aureus* 124 при відносно малих концентраціях, а при досягненні високих концентрацій (20 г/л) ефективність гальмування зростання іонами міді була однаковою для обох штамів.

На наступному етапі роботи перевіряли припущення, згідно якого нанесення міді на тканину супроводжувалося формуванням комплексів міді з целюлозними структурами тканини, тобто антибактеріальний ефект могли проявляти хелатні комплекси міді. В якості альтернативної моделі, використовували клітини мікроводоростей роду *Dunaliella*, вміст міді у яких було збільшено у порівнянні з природним штамом в сотні разів.

1.6.4 Стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до дії міді в хелатній формі

На наступному етапі роботи були отримані гомогенати двох штамів *D. viridis*, з низьким – фізіологічним, вмістом іонів міді, природний штам мікроводоростей *Dunaliella viridis* - (*D. v-Cu.S*) і штам з високим вмістом іонів міді - (*D. v-Cu.R*) і визначена здатність таких гомогенатів (біомаси) цих мікроводоростей проявляти антибактеріальну активність.

Виявили, що біомаса мікроводоростей *D. viridis*, з низьким, т. е. фізіологічним, вмістом іонів міді (*D. v-Cu.S*) забезпечували затримку росту бактерій на 11-12 мм при тестуванні на паперових дисках і на 13-14,7 мм при нанесенні суспензій в колодязі, і це виявлялося в однаковій мірі для *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (табл.1.1). Така ж ступінь затримки росту цих бактеріальних культур виявляла і біомаса

мікроводоростей - (*D. v-Cu.R*) (табл.1.1), яка перевершувала *D. v-Cu.S* за кількістю міді в 215 разів (рис.1.7, етап 1).

Отже, біомаси клітин *Dunaliella viridis* володіють слабо вираженою антибактеріальною активністю відносно *Staphylococcus aureus 124* і *Pseudomonas aeruginosa*, а наявність міді в хелатній формі в складі біомаси не впливало на антибактеріальну активність, або ж концентрація міді в суспензії *D. v-Cu.R* занадто мала для прояву антибактеріальної дії.

Таблиця 1.1 Зони затримки росту, мм для *Staphylococcus aureus 124* і *Pseudomonas aeruginosa* після нанесення на паперові диски і колодязі клітинного гомогенату двох штамів мікроводоростей: чутливого (*D. v-Cu.S*) і резистентного (*D. v-Cu.R*) до іонів міді. Представлені середні значення з 3 експериментів та їх стандартні помилки.

Метод дослідження	Досліджуємий об'єкт	Бактеріальна культура	
		<i>Staphylococcus aureus 124</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa 18</i>
Паперові диски	<i>D.v.-CuS</i>	11,7±0,42	11,5±0,50
	<i>D.v.-CuR</i>	12,2±0,60	12,0±0,63
Дифузійний метод (колодязів)	<i>D.v.-CuS</i>	14,0±0,41	14,5±1,19
	<i>D.v.-CuR</i>	13,0±0,41	14,8±0,75

Для перевірки цього, в наступній серії експериментів в біомасу мікроводоростей *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* додатково вносили сірчаноокислу мідь у великих концентраціях: 7; 15 і 20 г/л на однакову кількість клітин ($3,9 \times 10^9$), з яких були отримані біомаса клітин. Необхідно відзначити, що клітини мікроводоростей не мають клітинних стінок і вони швидко руйнуються гомогенізацією. При тестуванні антибактеріальної активності використовували метод паперових дисків і колодязів.

Виявили, що додаткове внесення сірчаноокислої міді до кінцевих концентрацій 7; 15 і 20 г/л супроводжувалося збільшенням антибактеріальної активності як для біомаси *D. v-Cu.S*, так і для біомаси *D. v-Cu.R* відносно *Staphylococcus aureus 124*, порівняно з біомасою цих клітин без додаткового внесення міді (рис.1.4, А). При тестуванні цих

зразків по відношенню до *Pseudomonas aeruginosa* 18 ефект збільшення антибактеріальної активності після додаткового внесення сірчаної кислоти міді проявлявся тільки для зразків *D. v-Cu.Ri* після внесення дуже великих концентру 15 і 20 г/л сірчаної кислоти міді (рис.1.4, В).

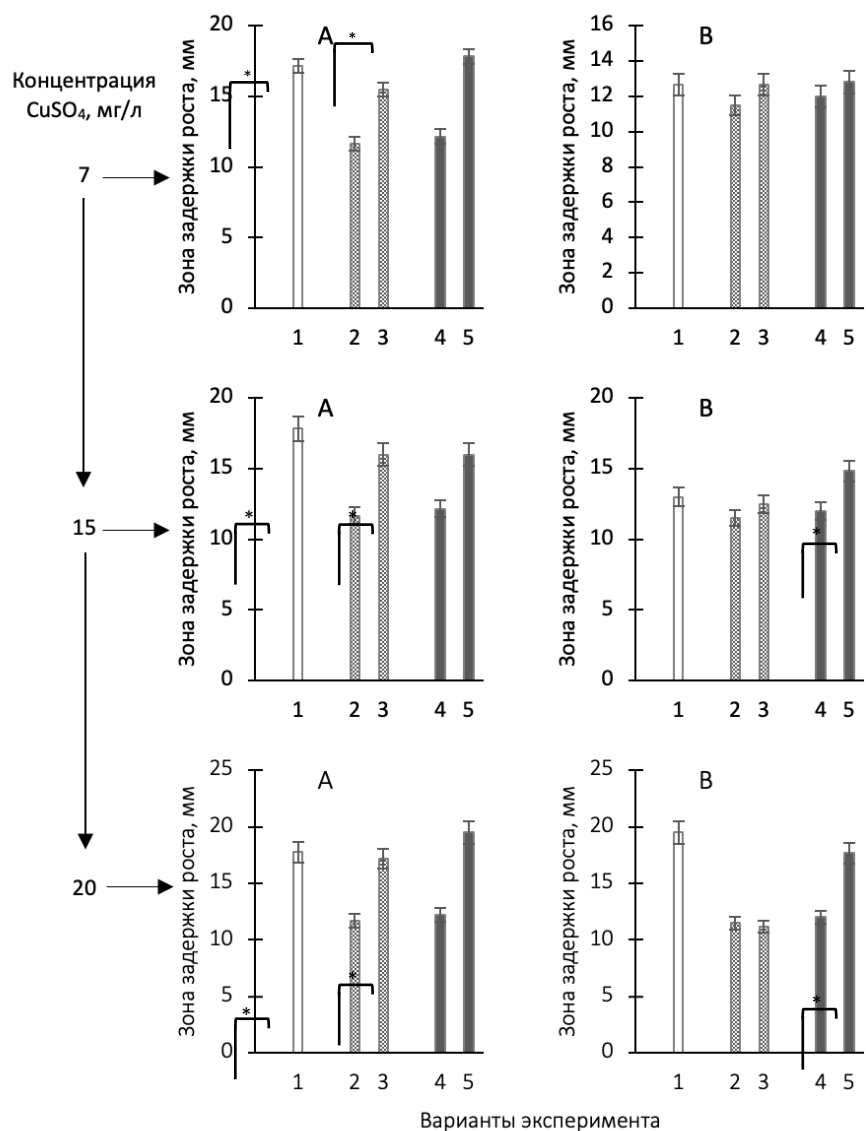


Рисунок 1.4 - Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (A) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (B) при тестуванні на паперових дисках після нанесенні на диск розчину сірчаної кислоти міді в концентраціях: 7; 15 і 20 г/л (додаткова шкала) – варіант 1, після нанесенні біомаси клітин *D. v-Cu.S* – варіант 2, після використовується у виробництві сухих будівельних біомаси клітин *D. v-Cu.S* з додатковим внесенням в гомогенат 7; 15 і

20 г/л сірчаноокислої міді відповідно – варіант 3, після нанесення біомаси клітин *D. v-Cu.R* –варіант 4 і після нанесення біомаси клітин *D. v-Cu.R* з додатковим внесенням в гомогенат 7; 15 і 20 г/л сірчаноокислої міді відповідно –варіант 5. Представлені середні значення з трьох експериментів та їх стандартні помилки. Зірочкою відмічені відмінності, для яких $P < 0,05$, між варіантами 2-3 і 4-5.

При тестуванні антибактеріальної активності дифузійним методом (методом колодязів) ці ефекти були ще більш вираженими (рис.1.5). Так, ефект посилення антибактеріальної активності після внесення додаткових концентрацій сірчаноокислої міді проявлявся не тільки для *Staphylococcus aureus* 124, але і для *Pseudomonas aeruginosa* 18 (рис.1.5).

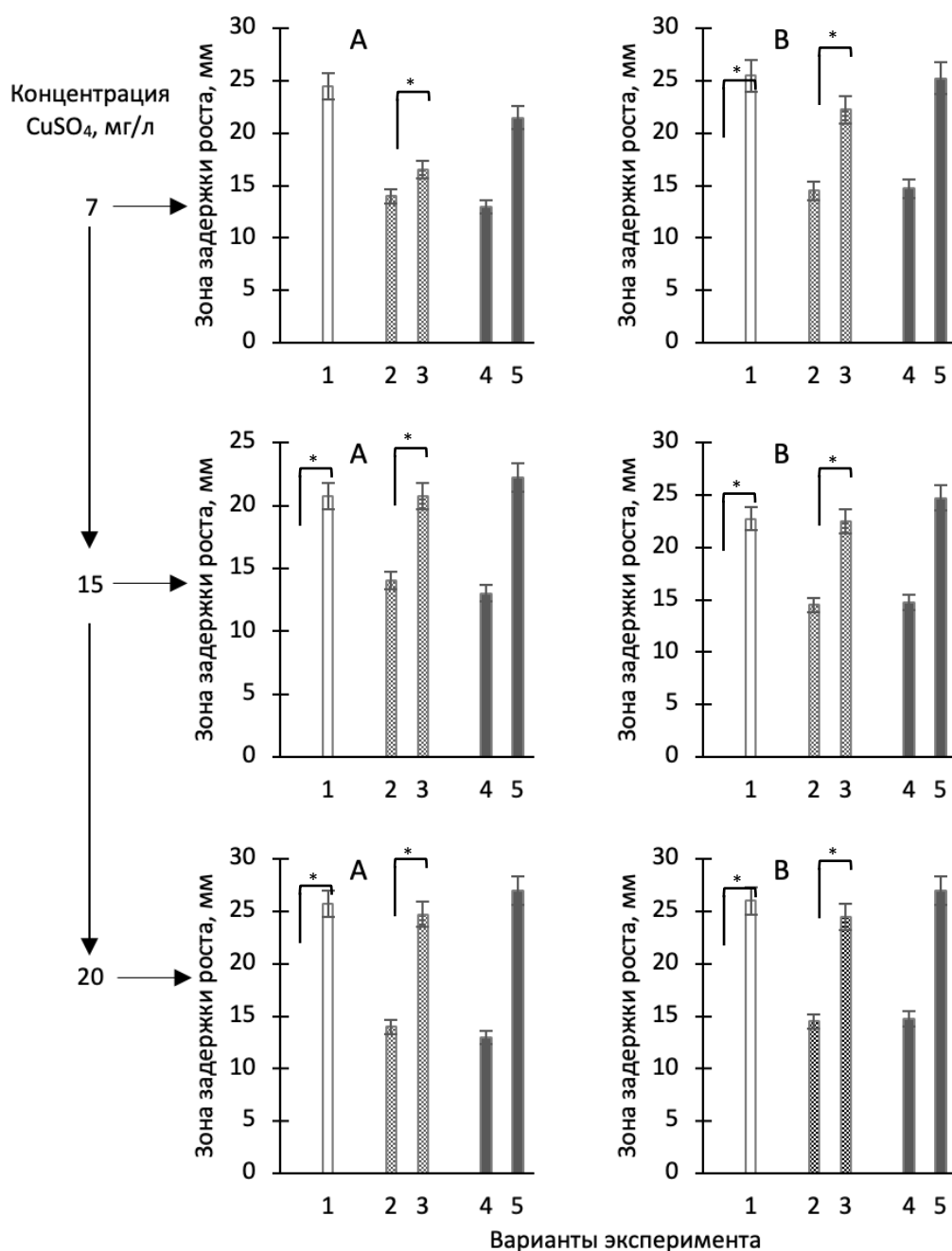
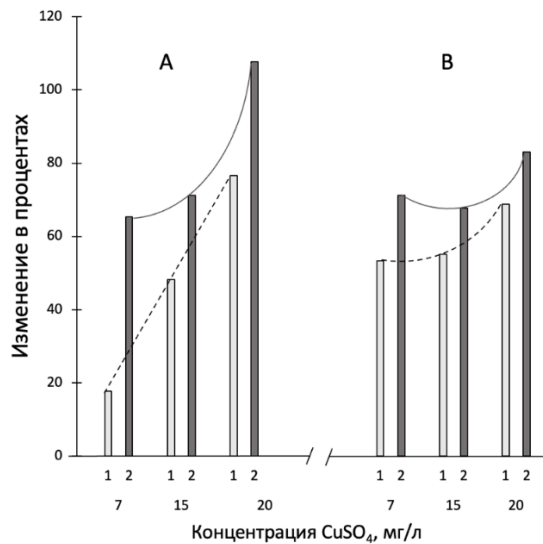


Рисунок 1.5 - Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (A) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (B) при тестуванні дифузійним (метод колодязів) після нанесенні на диск розчину сірчаної кислоти міді в концентраціях: 7; 15 і 20 г/л (додаткова шкала) – варіант 1, після нанесенні біомаси клітин *D. v-Cu.S* – варіант 2, після нанесення біомаси клітин *D. v-Cu.S* з додатковим внесенням до біомаси 7; 15 і 20 г/л сірчаної кислоти міді відповідно – варіант 3, після нанесення біомаси клітин *D. v-Cu.R* – варіант 4 і після нанесення біомаси клітин *D. v-Cu.R* з додатковим внесенням до біомаси 7; 15 і 20 г/л сірчаної кислоти міді

відповідно –варіант 5. Представлені середні значення з трьох експериментів та їх стандартні помилки. Зірочкою відмічені відмінності для яких $P < 0,05$ межакою варіантами 2-3 і 4-5.

На рис.1.6 представлені ефекти збільшення антибактеріальної активності, у відсотках, для двох штамів бактерій: *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18.



P-P CuSO ₄ , мг/мл	Бактеріальна культура	
	<i>Staphylococcus aureus</i> 124	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18
7	3,7	1,3
15	1,5	1,2
20	1,4	1,2

Рисунок 1.6 - Збільшення площі затримки росту для *Staphylococcus aureus* 124 (A) і для *Pseudomonas aeruginosa* 18 (B) біомасою клітин D. v-Cu.S (1) і D. v-Cu.R (2) після додаткового внесення до біомасам тестованих мікроводоростей сірчаноокислої міді до кінцевих концентрацій 7, 15 і 20 г/л порівняно з площею затримки росту бактеріальних культур вихідними біомасою клітин D. v-Cu.S та D. v-Cu.R, а так само відмінності в антибактеріальної активності, яку забезпечували D. v-Cu.R по відношенню до D. v-Cu.S в залежності від концентрації вноситься сірчаноокислої міді до біомас мікроводоростей (C). При додатковому внесення сірчаноокислої міді до біомас мікроводоростей використовували однакову кількість клітин для D. v-Cu.S та D. v-Cu.R, яке становило $3,9 \times 10^9$ клітин. Представлені середні значення з трьох незалежних експериментів.

Отримані результати дозволяють зробити висновок:

1 – дослідження передбачає додавання сульфату міді до культури клітин *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* що збільшувало їх антибактеріальну активність по відношенню до досліджуваних штаму бактерій від 20 до 110%, при цьому більшою мірою це виявлялося для *D. v-Cu.R* (рис.1.6 А, В);

2 – між збільшенням дози сірчаноокислої міді, що вноситься до біомаси клітин і антибактеріальною активністю немає прямої залежності (рис.1.6 А, В);

3 – швидкість затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 біомасою клітиндо якої додатково вносили сірчаноокислу мідь не перевищувала антибактеріальну активність чистого розчину сірчаноокислої міді (рис.1.4, 1.5);

4 – мідь яка була нанесена на тканину, проявляла таку ж антибактеріальну активність як і розчин сірчаноокисла мідь в максимально високій концентрації і більшу ніж антибактеріальну активність вихідної клітинної біомасою мікроводоростей;

5 – найбільші відмінності у збільшенні антибактеріальної активності для біомаси клітин *D. v-Cu.R* порівняно з *D. v-Cu.S* мало місце після додаткового внесення до біомаса клітин додаткових 7 г/л сірчаноокислої міді (рис.1.6С).

Отримані дані можуть вказувати на те, що внесення іонів міді до біомас мікроводоростей супроводжується утворенням різноманітних і різних структурно-функціональних комплексів, які володіють різною антибактеріальною активністю, а не тільки іонами міді. Зокрема, у присутності великих концентрацій міді можуть бути змінені «екстрактивність» клітинних компонентів, які володіють різною антибактеріальною активністю.

Для перевірки цієї гіпотези, в наступній серії експериментів визначали вміст міді в клітинах і біомас клітин *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* та їх структурних перебудовпо екстрактивним особливостям у біомас клітин *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R*, що може впливати на прояв антибактеріальної активності таких композитів.

1.6.5 Дослідження було присвячене вивченню здатності штамів мікроводоростей *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* до біосорбції іонів міді.

Було встановлено, що в клітинах *D. v-Cu.S*, які культивувалися за стандартних умов на середовищі Артарі, міститься 0,15 мкг іонів міді на 10^6 клітин. Цей рівень іонів міді відповідає фізіологічній нормі для даного виду мікроводоростей. У клітинах *D. v-Cu.R*, які протягом понад 25 років адаптувалися до росту на середовищі з додатковим внесенням іонів міді (75 мг/л сірчаноокислої міді), було виявлено значно більшу концентрацію іонів міді – 32,3 мкг на 10^6 клітин. Це свідчить про 215-кратне збільшення вмісту міді в порівнянні з клітинами *D. v-Cu.S* (рис.1.7 етап I).

Важливо підкреслити, що в культурному середовищі, де вирощували *D. v-Cu.S* (без додавання міді), спостерігався вміст 0,55 мкг/мл міді. Цей рівень може бути розцінений як фоновий для даного типу культивування (рис.1.7 етап I). У дослідженні було виявлено значну різницю у вмісті міді між культуральним середовищем *D. v-Cu.R*, до якого додано 75 мг/л сульфату міді (II), та середовищем *D. v-Cu.S*. Попри те, що концентрація іонів міді у середовищі *D. v-Cu.R* була в 7 разів вищою, ніж у *D. v-Cu.S*, вміст міді в клітинах штамів *D. v-Cu.R* був лише в 215 разів більшим (див. рисунок 1.7, етап I). Така різниця свідчить про швидке проникнення іонів міді у клітини *D. v-Cu.R* після додавання до середовища та їх подальшу sequestrацию в зв'язку з білками та іншими клітинними компонентами. Це дозволяє припустити, що більша частина міді в клітинах перебуває у хелатній формі.

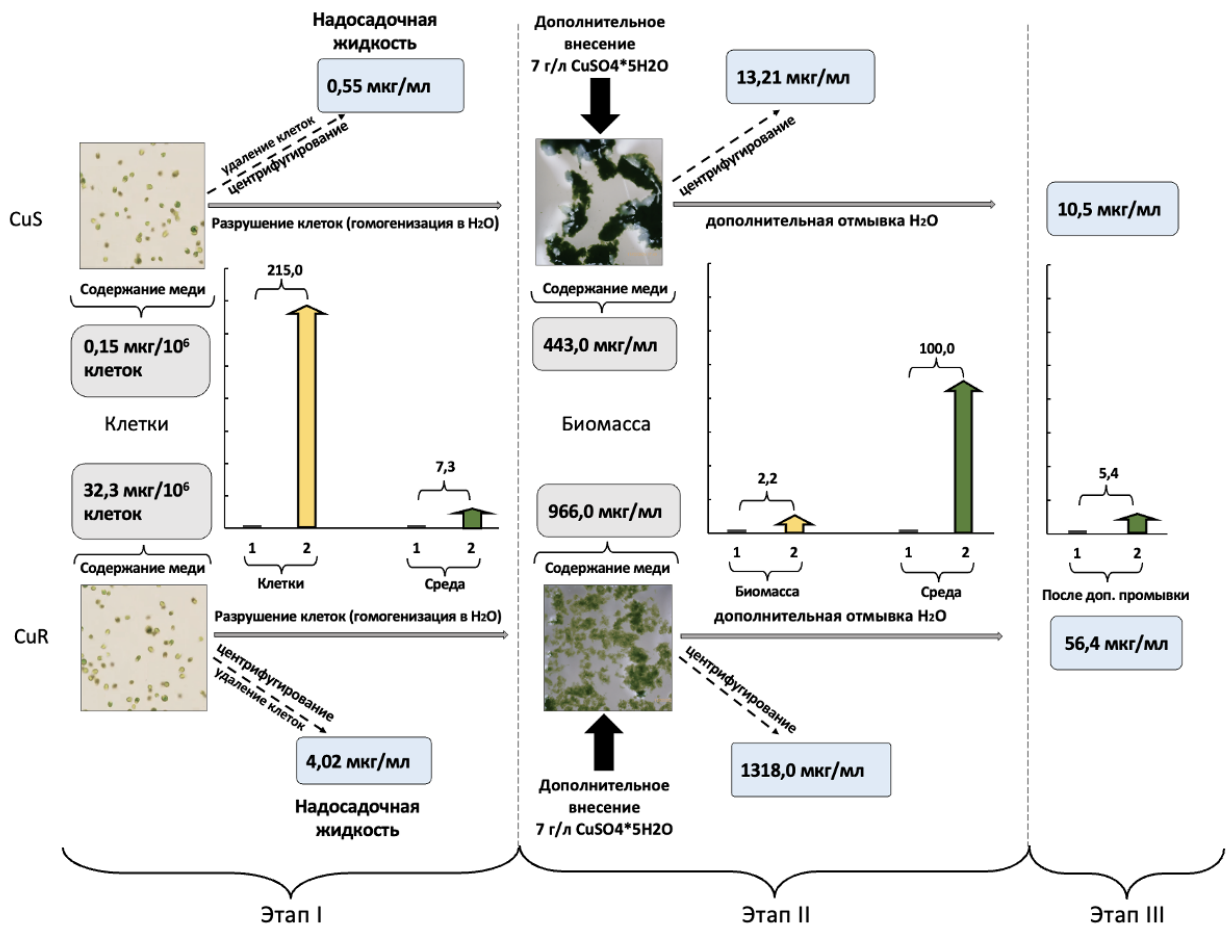


Рисунок 1.7 схема, яка демонструє етапи визначення вмісту іонів міді в досліджуваних зразках. На I етапі визначали кількість іонів міді в нативних клітинах *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* (кількість клітин двох штамів в суспензії було однаковим – $3,9 \times 10^9$ та обсяг клітинних суспензій було вирівняно) і кількість іонів міді, які були присутні в їхніх середовищах культивування. На II етапі дослідження відбувалося руйнування клітин. Отримана біомаса обох штамів (в однакових кількостях) була додатково збагачена сірчаною кислотою міддю в концентрації 7 г/л. Далі визначалася кількість міді, зв'язаної з біомасою штамів *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* і кількість вільної, незв'язаної міді в середовищі. На III етапі дослідження визначалася кількість легко видаленої, «слабо зв'язаної» міді з біомаси штамів *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* за допомогою водної екстракції. В квадратах представлені середні значення кількості міді з трьох визначення, а у вигляді

гістограм представлені порівняльні відмінності в кількості іонів міді в досліджуваних зразках між *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R*

Для оцінки здатності клітинної біомаси до додаткової адсорбції іонів міді, клітини мікроводоростей *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* піддавали гомогенізації з метою отримання клітинної біомаси. До одержаних зразків біомаси додавали сульфат міді (II) у концентрації 7 г/л. Після інкубації протягом 15 хвилин фрагменти клітин відокремлювали від водного середовища шляхом центрифугування при 15000g протягом 15 хвилин. Дослідження показали, що в біомасі клітин *D. v-Cu.S* виявлено 443,0 мкг/мл іонів міді. Це свідчить про значне накопичення міді в цих клітинах, оскільки її концентрація збільшилася у 2950 разів порівняно з початковим рівнем в клітинах (рис.1.7 етап II). За ідентичних умов та аналогічної кількості біомаси, шляхом використання *D. v-Cu.R* було зв'язано 966,0 мкг/мл міді. Це свідчить про те, що вміст міді в біомасі *D. v-Cu.R* після додаткового внесення 7 г/л сульфату міді збільшився лише в 29 разів у порівнянні з її первинною концентрацією в клітинах (рис.1.7 етап II).

Отже, дослідження показали, що біомаса *D. v-Cu.R* має значно меншу здатність зв'язувати мідь у порівнянні з біомасою *D. v-Cu.S*. Зокрема, спостерігається різниця в 100 разів за однакових умов експерименту.

Результати досліджень, що стосуються зв'язування іонів міді біомасою клітин *D. v-Cu.R*, свідчать про те, що штам *D. v-Cu.S* має більшу здатність до біосорбції міді, ніж штам *D. v-Cu.R*. Після додавання 7 г/л сірчаної кислоти міді до середовища, в якому знаходилися клітини, у варіанті з *D. v-Cu.S* залишилася незначна кількість іонів міді у водному розчині (13,2 мкг/мл). Це свідчить про ефективне зв'язування більшої частини доданої міді клітинною біомасою. У випадку *D. v-Cu.R*, концентрація іонів міді у водному розчині за тих самих умов була в 100 разів вищою, ніж у варіанті з *D. v-Cu.S*. (рис.1.7 етап II). Отримані дані вказують на ймовірність того, що біомаса клітин *D. v-Cu.R* наблизилася до рівня насичення іонами міді.

Дослідження показали значну різницю в міцності зв'язку іонів міді з біомасою різних штамів. Штам *D. v-Cu.S* демонструє набагато міцніше утримування іонів міді, ніж штам *D. v-Cu.R*. Це підтверджується результатами водної екстракції біомаси,

"збагаченої" міддю: з біомаси *D. v-Cu.S* у водну фазу переходило 10,5 мкг/мл іонів міді, тоді як з біомаси *D. v-Cu.R* - в п'ять разів більше (56,4 мкг/мл). (рис.1.7 етап III).

Отже, встановлено різні співвідношення між іонною та хелатною формами міді в біомасі клітин *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R*. Крім того, спостерігається менша міцність зв'язку міді з компонентами клітин *D. v-Cu.R* * порівняно з *D. v-Cu.S*. Виходячи з цього, можна припустити, що біомаси *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* відрізняються за своєю екстрактивністю, тобто здатністю компонентів "переходити" у водну фазу. Це, в свою чергу, може впливати на їх антибактеріальну активність.

1.6.6 Дослідження ефективності вилучення біологічно активних компонентів

Дане дослідження присвячене оцінці "екстрактивності", тобто ефективності вилучення, біологічно активних компонентів з клітинної біомаси видів *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* після внесення до них 7 г/л сульфату міді

Аналіз екстракції нативних клітин *D. v-Cu.S* у водну фазу показав наявність незначної кількості амінокислот (зафіксовано поглинання при 220 нм) та білків (поглинання при 260 нм), як це видно на рис.1.9 А. При екстрагуванні аналогічної кількості нативних клітин *D. v-Cu.R* за тих самих умов, спостерігається значно менша кількість амінокислот та слідові кількості білків у порівнянні з результатами для *D. v-Cu.S* (рис.1.9 А, В).

Отримані дані вказують на те, що присутність іонів міді в клітинах *D. v-Cu.R* призводить до зниження екстракції клітинних компонентів, ймовірно, через утворення комплексів не лише з фетакхелатинами та металлотіонеїнами, які специфічно зв'язують іони міді [6], а й з іншими клітинними компонентами. Це може супроводжуватися значними структурно-функціональними змінами в таких клітинах.

Важливо підкреслити, що адаптовані до зростання клітин *D. v-Cu.R* зберігають свої первинні характеристики та успішно культивуються в лабораторних умовах протягом понад 25 років.

На користь малої екстрактивності компонентів клітин *D. v-Cu.R* порівняно з клітинами *D. v-Cu.S* побічно свідчити результати по різниці електропровідності екстрактивних речовин отриманих з *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* (рис.1.9, С). Так, електропровідність водного середовища після екстракції клітин *D. v-Cu.S* була в 2 рази більшою порівняно з електропровідністю водного середовища після екстракції клітин *D. v-Cu.R* (рис.1.8, С).

Це пояснюється тим, що з клітин *D. v-Cu.R* у водне середовище переходило як мінімум в 2 рази менше компонентів у порівнянні з *D. v-Cu.S*, які забезпечували збільшення електропровідність такого середовища.

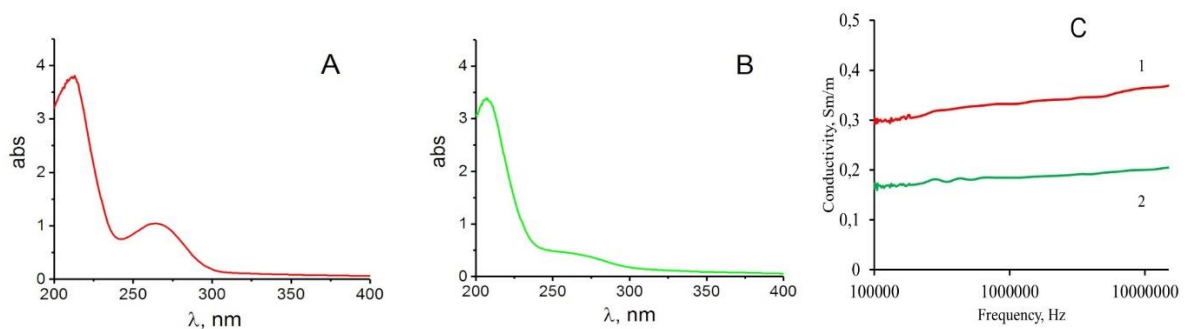


Рисунок 1.8 Наведені спектрометричні дані демонструють характеристики поглинання ультрафіолетового випромінювання водним середовищем після проведення процедури відмивання клітин видів *D. v-Cu.S* (A) та *D. v-Cu.R* (B), електропровідність водного середовища після отмывок клітин *D. v-Cu.S* (1) і *D. v-Cu.R* (2) (C) і вміст міді у водному середовищі після отмывок цих штамів (D). Для видалення солей культивацийного середовища з клітинних опадів однакової маси, до кожного осаду додавали 10 мл стерильної дистильованої води. Після ретельного перемішування протягом 5 хвилин проводили центрифугування при 3000 g для повторного осідання клітин. Далі, в отриманій водній фазі визначали необхідні досліджувані показники.

Структурно-функціональні відмінності між клітинами *D. v-Cu.R* та *D. v-Cu.S*, зумовлені високим вмістом міді в перших, можуть спричинити підвищену стійкість до механічних факторів. Для оцінки антибактеріальної активності біомаси наступним кроком передбачається її отримання шляхом гомогенізації клітин у водному середовищі.

Результати дослідження продемонстрували:

1 – аналіз біомаси, отриманої з клітин *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R*, виявив відмінності в їхньому забарвленні. Це свідчить про зміни в структурі пігментів, таких як хлорофіл і каротиноїди, а також про різний ступінь агрегації клітинних компонентів у цих двох типах клітин (рис.1.9 А, В);

2 – механічне руйнування клітин *D. v-Cu.S* призвело до вивільнення обмеженої кількості амінокислот, пептидів та білків, які демонструють поглинання в ультрафіолетовій області спектра (220-280 нм). Крім того, було виявлено присутність пігментів, що абсорбують світло у видимій області спектра (400-500 нм та 670 нм), в результаті цього процесу (рис.1.9, С).

Одночасно, експериментальні дані показали, що руйнування клітин *D. v-Cu.R* механічним шляхом не спричиняло їхнього вивільнення в водний розчин (рис. 1.9 D). Це підтверджує припущення про те, що іони міді індукують утворення структурно міцних надмолекулярних комплексів у клітинах, які характеризуються підвищеною стійкістю до механічних впливів. (рис.1.9 D);

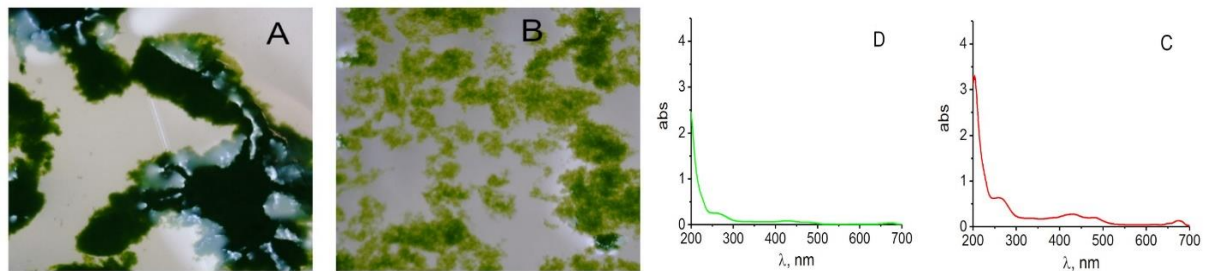


Рисунок 1.9 Зовнішній вид сформованих агрегатів зомпонентов біомаси *Cu.S* (А) і *D. v-Cu.R* (В) після їх гомогенізації в однакових умовах («ZeissPrimoStariLED» (Німеччина)), спектри поглинання компонентів водного середовища на залишки біомаси клітин бактерій *D. v-Cu.S* (С) і *D. v-Cu.R* (D) після їх осадження. Для очищення клітинних культур від сольових домішок, що присутні в середовищі культивування, до зразків осаду клітин однакової маси додавали по 10 мл стерильної дистильованої води. Зразки ретельно перемішували протягом п'яти хвилин та повторно відокремлювали осад шляхом центрифугування при 3000g. Спектральні характеристики отриманих водних фаз було проаналізовано.

У наступній серії дослідів біомаса клітин *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* ула проінфікована сірчаною кислотою міддю до кінцевої концентрації 7 г/л. Після цього фрагменти клітин

відокремлювали шляхом центрифугування при 15000 g, а у водній фазі визначали кількість екстрактивних речовин. Дослідження показали відсутність екстрактивних речовин у водному середовищі після обробки біомаси *D. v-Cu.S* високими концентраціями іонів міді (рис. 1.10 А, В). Це свідчить про утворення агрегатів з компонентів клітин, подібних до тих, що спостерігаються в *D. v-Cu.R*. З цього можна зробити висновок, що іони міді беруть участь у формуванні комплексів з компонентами клітин, незалежно від типу біомаси.

Після додавання 7 г/л сульфату міді до водних розчинів та подальшого видалення клітинної біомаси методом центрифугування, спостерігається значне підвищення електропровідності порівняно з вихідними водними екстрактами біомаси. Варто зазначити, що електропровідність для варіантів *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R* статистично не відрізняється (див. рисунок 1.10 С). Таке збільшення електропровідності водних фаз після внесення до біомас клітин мікродоростей сірчаноокислої міді свідчить про те, що частина іонів міді залишалася не пов'язаною з компонентами клітин, що і збільшувало електропровідність такого середовища. Важливо відзначити, що електропровідність чистого розчину сірчаноокислої міді займала проміжне становище між варіантами *D. v-Cu.S* та *D. v-Cu.R*.

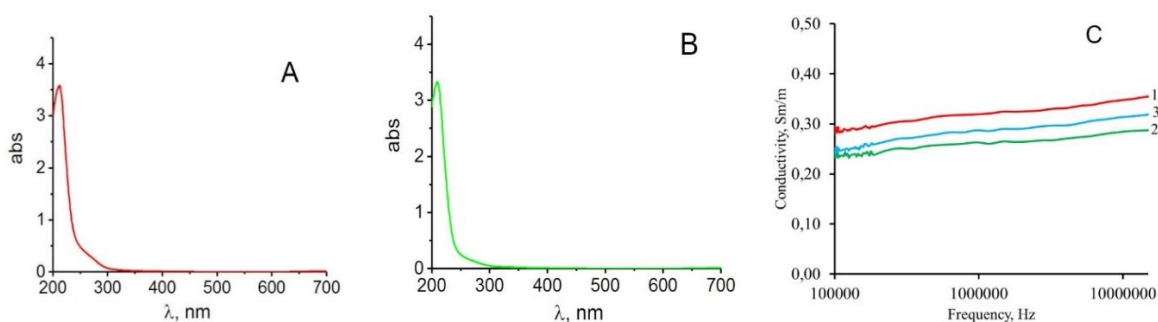


Рисунок 1.10 Спектри поглинання екстрактивних речовин з біомаси клітин *D. v-Cu.S* (А) і *D. v-Cu.R* (В), які отримували після додаткового внесення до них сірчаноокислої міді в кінцевій концентрації 7г/л і подальшого осадження біомаси клітин центрифугуванням при 15 000g і електропровідність водного середовища після осадження компонентів біомаси клітин *D. v-Cu.S* (1) і *D. v-Cu.R* (2), а так само електропровідність розчину сірчаноокислої міді в концентрації 7г/л (3). Представлені типові результати цієї серії експериментів.

У висновку відзначимо, що більший ефект збільшення антибактеріальної активності біомаси *D. v-Cu.R* порівняно з *D. v-Cu.S* відносно *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18, після додаткового внесення до біомасам водоростей 7 г/л сірчаної кислоти міді, може пояснюватися тим, що у *D. v-Cu.R* співвідношення між іонною формою і хелатній формою міді зміщена в бік іонної форми, а частина міді яка пов'язана «неспецифічно» з компонентами клітин, яке має місце про насичуючих концентраціях міді, відносно легко переходить в іонну форму і виявляє антибактеріальний ефект. Вважаємо, що штам *D. v-Cu.R* може функціонувати як резервуар для міді, яка має антибактеріальні властивості. На відміну від антибіотиків, цей штам не демонструє видової специфічності щодо бактерій і може бути застосований у поєднанні з міддю, нанесеною на текстильну поверхню. Варто враховувати, що мідь, нанесена на тканину і мідь у складі біомаси клітин у *D. v-Cu.R* можуть надавати різні біологічні ефекти на організм, що є завданням наших подальших досліджень.

Обговорення

Те, що іони міді, як і іони срібла, володіють вираженою антибактеріальною дією відомо давно, однак тільки в даний час спостерігається зростання інтересу до використання іонів міді у вирішенні широкого кола медичних проблем і в тому числі в боротьбі з інфекціями [13-15]. Показано, що мідь пов'язана з такими патологіями, як рак [16]. Нейродегенерація [17], ангиогенные дисфункції [18]. Іони міді стали привабливою мішенню для ліків, а також потенційним інструментом для розробки нових зондів, призначених для медичних втручань [19-21]. Описані ефекти антимікробної дії комплексів міді на грамотрицательные [22], грампозитивні [23] і мікобактерій [24-25].

Разом з тим, використання міді в якості антибактеріального засобу сопряженно з цілим рядом обмежень і особливостей.

По-перше, іони міді є незамінним мікроелементом для всіх живих організмів, однак одночасно виявляють високу токсичність. Це зумовлене тим, що в біологічних системах мідь може перебувати у різних станах: Cu^0 (наночастинки), Cu^{1+} , Cu^{2+} та Cu -ліганд (хелатна форма). Крім того, іони міді утворюють комплекси з різними макромолекулами. Її біологічна активність, зокрема антибактеріальна, залежить від

рівноваги між іонними формами, хелатними формами та наночастинками в організмі, а також від їх концентрації.

По-друге, в процесі еволюції, а цей процес ймовірно почався близько 2,7 мільярда років тому, коли рівень кисню на планеті почав підвищуватися і в таких умовах мідь мала «переваги» у порівнянні з залізом, так як в окисленій формі (Fe^{3+}) має тенденцію утворювати нерозчинні мінерали, а в змінних умовах живі системи «навчилися» використовувати мідь в метаболічних процесах, а у разі досягнення нею високої концентрації сформували механізми захисту від токсичних ефектів міді. Адаптивні механізми до токсичної дії міді надзвичайно різноманітні [26]. Мікроорганізми здатні пов'язувати «надлишок» міді з внутрішньоклітинними лігандами і видаляти її з клітки. Більш того, не можна виключати того, що застосування міді в якості антибактеріального засобу також призведе, як і у випадку з антибіотиками, до формування резистентних форм мікроорганізмів.

По-третє, мідь проявляє токсичність не тільки відносно мікроорганізмів, але і відносно організму – господаря, тобто вона не видоспецифічна в тому числі і відносно бактерій, що показано в настоящей роботі.

Виходячи з цих особливостей, необхідно розділяти первинний відповідь організмів на дію міді і віддалені наслідки або пролангированые дії, а також, відповідь організму, який буде формуватися на багаторазові послідовні дії міді.

В даній роботі визначали первинний відповідь двох бактеріальних культур *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18, на дії міді, яка перебувала в трьох різних формах: нанесена у вигляді тонкого шару в 3 мкм на бавовняну тканину; в іонній формі і в хелатній формі з компонентами клітин мікроводоростей *Dunaliella viridis*.

Є роботи, в яких вказується на те, що мідні металокомплекси можуть долати механізми резистентності бактерій [27] і це проб'ясняється тим, що ліганд може розширити спектр токсичності іонів міді відносно мікроорганізмів, порівняно з вільної міддю.

ВИСНОВКИ

1. Здійснити аналіз літературних джерел щодо методів визначення вмісту міді у складних матеріалах, а також розглянути сучасні підходи до підготовки проб. Показано, що найбільш перспективним методом аналізу є атомно-абсорбційна спектроскопія з високою чутливістю, прецизійністю та точністю.;

2. Розглянуто способи підготовки біологічних зразків;

3. В рамках даної роботи було розглянуто методики підвищення чутливості виявлення аналітів за допомогою атомно-абсорбційного методу - це використання атомної кварцевої трубки, та провести верифікацію їхньої точності - метод стандартних зразків та добавок;

4. Розглянуто дослідження впливу міді на біологічні зразки *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18, і зробили висновок що мідь, особливо у іонній формі проявляє найбільш виражені антимікробні властивості та має високий потенціал для розробки антимікробних матеріалів

Статівко К.В.



ОХОРОНА ПРАЦІ

Всі досліди виконувалися згідно діючих на хімічному факультеті Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна інструкцій з охорони праці та безпеки життєдіяльності.

При проведенні експериментальної роботи необхідно знати, з якими речовинами працюєш, а також техніку безпеки з ними:

1. При проведенні лабораторних експериментів з токсичними речовинами та речовинами з неприємним запахом дуже важливо дотримуватись певних правил безпеки. По-перше, всі експерименти з такими речовинами повинні проводитися у витяжній шафі. Це спеціальне обладнання, яке забезпечує безпечне видалення шкідливих парів та газів із робочої зони, захищаючи тим самим здоров'я дослідника. Крім того, необхідно використовувати індивідуальні засоби захисту, такі як рукавички, захисні окуляри та лабораторні халати. Особливу увагу слід приділити роботі з концентрованою азотною кислотою, оскільки вона може викликати серйозні опіки та виділяти небезпечні пари.

2. При необхідності визначити запах газу чи рідини слід робити це обережно. Для цього рекомендується обережно вдихати повітря, злегка спрямовуючи рукою випаровування від судини до себе. Це допоможе уникнути сильного вдихання потенційно небезпечних речовин. Важливо пам'ятати, що при розведенні сильних кислот, таких як сірчана або соляна, необхідно додавати кислоту у воду, а чи не навпаки. Це захистить від бурхливої реакції, яка може призвести до розбризкування кислоти.

3. Також слід уникати нахилу над судинами, які містять реактиви. Це допоможе запобігти попаданню бризок на обличчя та одяг. Особливо обережними потрібно бути при роботі з рідинами, що нагріваються, так як існує ризик викиду вмісту з колби. Якщо на шкіру потрапили розчини кислот або лугів, необхідно негайно промити уражену область великою кількістю води. Після цього рекомендується протерти місце ураження

слабким розчином соди для нейтралізації кислоти або слабким розчином оцтової кислоти для нейтралізації лугу.

4. У разі опіку слід обробити уражене місце міцним розчином марганцевого калію, який має антисептичні властивості. Перед використанням електричних приладів важливо перевірити їхнє заземлення, щоб уникнути електричних ударів. При отруєнні або серйозних опіках слід негайно звернутися за медичною допомогою, оскільки це може бути небезпечним для життя.

5. Працюючи зі скляними приладами, потрібно пам'ятати про крихкість скла. Посуд, що впав, може призвести не тільки до псування обладнання, але і до травм. Тому слід бути уважним та акуратним, уникаючи різких рухів. Всі експерименти з легкозаймистими летючими рідинами повинні проводитися далеко від нагрівальних приладів та у витяжній шафі, щоб мінімізувати ризик займання.

6. Нарешті, перед виходом з лабораторії необхідно перевірити, чи крани з водопровідною водою закриті і чи вимкнені всі нагрівальні електричні прилади. Це допоможе запобігти аварійним ситуаціям і забезпечить безпеку як для дослідника, так і для оточуючих. Дотримання цих простих, але важливих правил допоможе створити безпечне та ефективне робоче середовище в лабораторії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wohlleben W. Mast Y. et al. Antibiotic drug discovery. *Microbial biotechnology*. 2016. 9(5). 541–548.
2. Godoy-Gallardo M., Eckhard U., Delgado L. M., et al. Antibacterial approaches in tissue engineering using metals and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioactive Materials*. 2021. 6(12). 4470–4490.
3. Лавриненко О.М., Загорний М.М., Вембер В.В. Фотокаталітична деструкція органічних барвників частинками діоксиду титану допованого золотом. *Bulletin of National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute» Series «Chemical Engineering, Ecology and Resource Saving»*. 2023. № 4 (22). 69-79.
4. Yurchenko, O. I., Chernozhuk, T. V., Nikolenko, M. V., Baklanov, O. M., & Kravchenko, O. A. Atomic absorption determination of copper and zinc in pharmaceuticals. *Issues of Chemistry & Chemical Technology/Voprosy Khimii & Khimicheskoi Tekhnologii*, 2024, № 1, pp. 115-121
5. Yurchenko, O. I.; Chernozhuk, T. V.; Kravchenko, O. A. Atomic absorption and atomic emission with inductively coupled plasma and X-ray determination of Cadmium and Nickel in soils using ultrasound, Triton X-100, and metal acetylacetonates. *Int. Sci. J. Theor. Appl. Sci.* 2021, 96(4), 169-176.
6. Yurchenko, O. I.; Chernozhuk, T. V.; Kravchenko, O. A.; Baklanov, N. Atomic absorption and atomic emission with inductive connected plasma and x-ray fluorescent detection of zinc and copper in soil. *J. Chem. Technol.* 2022, 30(2), 307-311.
7. Юрченко, О.І.; Черножук, Т.В.; Кравченко, О.А. Атомно-абсорбційне та атомно-емісійне з індуктивно-зв'язаною плазмою визначення плюмбуму та феруму в пластових водах з використанням нових середовищ та стандартних зразків складу. *Вісник Харківського національного університету*. 2020, 34(57), 82-88.
8. Moffett J. Sensitivity Enhancement for Flame Atomic Absorption Spectrometry Using an Atom Concentrator Tube, the ACT 80. *Agilent publication*, 2010, 4(5), 10-17

9. Юрченко О.І., Черножук Т.В., Пантелеймонов А.В. та ін. Аналітична хімія кухонної солі, розсолів та високомінералізованих вод: монографія; ХНУ імені В.Н. Каразіна: Харків. 2023; с.296
10. Yurchenko OI. Chernozhuk TV. Nikolenko MV. Baklanov OM. Kravchenko OA. Atomic absorption determining of copper and zinc in pharmaceuticals. *Issues of Chemistry & Chemical Technology Voprosy Khimii & Khimicheskoi Tekhnologii*. 2024, 1, 115-121
11. Божков А. І., Сидоров В. І., Албоқаї О. К., Акжихов Р. А., Кургузова Н. І., Малишев А. Б., Громовой Т. Ю. Роль металоніонів у формуванні hierarchical mechanisms resistance to toxic compounds in young and old animals on example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*. 2021, 5, 62–74.
12. Urso E. Maffia M. Починаючи link між copper and angiogenesis: established mechanisms and overview on the role of vascular copper transport systems. *Journal of vascular research*. 2016, 52(3), 172–196.
13. Becker, K. W., & Skaar, E. P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS microbiology reviews*, 2014,38(6), 1235-1249.
14. Djoko, K. Y., & Ong, C., Lynn Y, Walker MJ, McEwan AG. The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *J. Toxapbiol. Chem*, 2015, 290(31), 18954-61.
15. Ladomersky, E., & Petris, M. J.,. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 2015, 7(6),957-964.
16. Garber K. Biomedicine. Targeting copper to treat breast cancer. *Science*. 2015 Jul 10, 349(6244),128-9.
17. White, A. R., Kanninen, K. M., & Crouch, P. J.,. Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Frontiers in aging neuroscience* 2015,7, 127.
18. Urso, E., & Maffia, M. Behind the link between copper and angiogenesis: established mechanisms and an overview on the role of vascular copper transport systems. *Journal of vascular research*, 2016, 52(3), 172-196.
19. Denoyer, D., Pearson, H. B., Clatworthy, S. A., Smith, Z. M., Francis, P. S., Llanos, R. M., ... & Cater, M. A. Copper as a target for prostate cancer therapeutics: copper-ionophore pharmacology and altering systemic copper distribution. *Oncotarget*, 2016,7(24), 37064.

20. Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., & Santini, C. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2009, 9(2), 185-211.
21. Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., & Niederweis, M. Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunological reviews*, 2015, 264(1), 249-263.
22. Djoko, K. Y., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., & McEwan, A. G. Antimicrobial effects of copper (II) bis (thiosemicarbazonato) complexes provide new insight into their біохімічний mode of action. *Metallomics*, 2014, 6(4), 854-863.
23. Haeili, M., Moore, C., Davis, C. J., Cochran, J. B., Shah, S., Shrestha, T. B., ... & Wolschendorf, F. Copper complexation screen reveals compounds with potent antibiotic properties against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014, 58(7), 3727-3736.
24. Dalecki, A. G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., & Wolschendorf, F. Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015, 59(8), 4835-4844.
25. Shah, S., Dalecki, A. G., Malalasekera, A. P., Crawford, C. L., Michalek, S. M., Kutsch, O., ... & Wolschendorf, F. 8-Hydroxyquinolines are boosting agents of copper-related toxicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2016, 60(10), 5765-5776.
26. Bozhkov, A. I., Kovaleva, M. K., Goltvyanskiy, A. V., Ushakova, E. O., Tsapko, H. Y., & Gavrish, A. O. Preliminary Adaptation of *Dunaliella viridis* Strains to Copper Sulfate Affects the Thermal Stability of the Culture. *International Journal on Algae*, 2020, 22(1), 154-158.
27. Dalecki, A. G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., & Wolschendorf, F. Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015, 59(8), 4835-4844.