

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
“Национальный исследовательский университет ИТМО”

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**СИНТЕЗ СЕЛЕНОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ
С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ
МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ ПОД СЛОЕМ ЖИДКОСТИ**

Автор Голубев Ярослав Дмитриевич _____
(Фамилия, Имя, Отчество) (Подпись)

Направление подготовки (специальность) 12.04.05 Лазерная
(код, наименование)
техника и лазерные технологии

Квалификация магистр _____
(бакалавр, магистр, инженер)

Руководитель ВКР Самохвалов А. А., к. т. н. _____
(Фамилия, И., О., ученое звание, степень) (Подпись)

Санкт-Петербург, 2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Уничтожение патогенных бактерий	8
1.2 Антибактериальные свойства наноматериалов	12
1.3 Биомедицинские применения наноструктур селена	17
1.4 Антибактериальные свойства наноструктур селена	20
1.5 Механизмы уничтожения патогенных бактерий	26
1.6 Способы получения наноматериалов.....	30
1.7 Лазерный синтез наноматериалов	34
1.8 Выводы.....	41
ГЛАВА 2. СИНТЕЗ СЕЛЕНОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ	43
2.1 Получение наноматериалов	43
2.2 Макроскопические свойства.....	45
2.3 Оптические свойства	46
2.4 Морфология	50
2.5 Фазовый состав.....	55
2.6 Выводы.....	58
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА СЕЛЕНОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ.....	59
3.1 Методология	59
3.2 Диско-диффузионный метод для различных бактерий	60
3.3 Определение минимальной ингибирующей концентрации для различных бактерий	62
3.4 Диско-диффузионный метод для различных режимов излучения	64
3.5 Выводы.....	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	70
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	73

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавируса, поразившая мир в начале 2020 года, не оставила без изменений практически ни одну сферу деятельности человека. Существенно оказались затронуты экономика [1], отношения между людьми [2], их душевное здоровье [3] и продуктивность [4], научные исследования [5], экология и многое другое.

Само собой, наиболее откликнувшимися областями науки и деятельности стали медицина, биомедицинские исследования и обширный комплекс связанных с ними междисциплинарных направлений. Это касается как национальных систем здравоохранения, столкнувшихся с невиданными ранее испытаниями [6], так и непосредственно самих научных исследований [7], которым пришлось резко поменять приоритеты и делать выводы из стремительно поступающих со всего мира данных в условиях экстренной нехватки времени и гонки с вирусом. В целом можно ожидать, что пандемия оказала значительное влияние на развитие многих областей биомедицины — с одной стороны, в эту область резко инвестировали значительные средства, с другой стороны, на долгое время поменялось отношение к ним населения: люди невольно стали больше интересоваться прикладными и научными аспектами медицинских исследований, и коронавирус будет напоминать о себе ещё в лучшем случае несколько лет.

Одной из основных и стремительно развивающихся подзадач биомедицины является задача уничтожения патогенных бактерий, приводящих к развитию в людях различного рода инфекций [8]. Такие инфекции могут быть как основным заболеванием у пациента, так и побочным, и могут осложнить множество других диагнозов. Так, например, Duployez et al. [9] описывают летальный случай 30-летнего пациента во Франции как результат пневмонии, вызванной особым штаммом золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и явившейся осложнением COVID-19. От инфекционных заболеваний ежегодно умирают миллионы и страдают сотни миллионов людей [10].

Основным способом уничтожения патогенных бактерий традиционно являются антибиотики. Появившись в чистом виде в первой половине XX века [11], они произвели революцию в медицине, привели к росту качества и продолжительности жизни, избавили или практически избавили мир от множества заболеваний и спасли бесчисленное количество жизней [12].

Однако, несмотря на это, традиционные антибиотики не являются панацеей и обладают рядом критических недостатков, которые заставляют учёных исследовать и тестировать возможные альтернативы. Одним из таких недостатков является их токсичность [13]. Причиной токсичности является сложность администрирования правильной дозировки необходимого препарата, а также различная его переносимость отдельными пациентами. Именно нежелательные побочные эффекты являются наиболее частой причиной отзыва антибиотиков с рынка [14]. К ним относятся гепатотоксичность, нейтропения, энцефалопатия и многие другие.

Другой фундаментальной проблемой использования антибиотиков является вырабатываемая к ним резистентность, проявившаяся вскоре после начала их эксплуатации [15]. Через различные механизмы бактерии приобретают устойчивость к определённым антибиотикам, и со временем их эффективность на этих бактериях значительно уменьшается. Широкое (и, к сожалению, не всегда оправданное) применение антибиотиков привело в некоторых областях к кризису их применения, так, например, многие распространённые бактерии развили сильную устойчивость к пенициллину. В своём крайнем проявлении эта проблема представлена возникновением супербактерий (super bugs) [16], то есть бактерий, устойчивых к множеству препаратов. Существование таких микроорганизмов представляет собой угрозу жизни и здоровью людей, и значительные усилия направлены на борьбу с ними.

Одной из перспективных альтернатив традиционным антибиотикам являются наноматериалы, обладающие антибактериальным эффектом [17, 18]. Такие материалы демонстрируют стабильный антибактериальный эффект на различные культуры бактерий, просты и экономичны в получении, а также

воздействуют на бактерии через различные механизмы, что усложняет развитие к ним сопротивления. В последние десятилетия на предмет подобных эффектов исследуется множество металлов и полупроводников.

Особый интерес для таких исследований представляет селен [19, 20]. Наноструктуры селена демонстрируют более низкую токсичность, чем, например, наночастицы серебра, и он также встречается в белках во многих органах и системах человека. Селен — полупроводник, и его получение возможно как в аморфной, так и кристаллической фазе, что вызывает интерес к исследованию их влияния на его антибактериальные свойства.

Среди широкого спектра различных способов получения наночастиц и наноструктур различных металлов и полупроводников — в том числе селена — отдельно стоит лазерная абляция под слоем жидкости [21]. Данный метод обладает рядом серьезных преимуществ: он химически чист из-за отсутствия реагентов, относительно недорог, и что особенно важно — наноматериалы автоматически собираются и стабильно сохраняются в виде коллоидного раствора. Последнее обстоятельство особенно ценно в задачах биомедицины и антибактериальной обработки, где чаще всего применяется именно такая растворная форма. Большая вариативность возможных параметров лазерного излучения, особенно его длительности импульса, обеспечивает различные возможные механизмы образования наноматериалов. Тем не менее, применение данного метода для селена в литературе исследовано не исчерпывающе.

На пересечении сложной морфологии наноразмерного селена и различных режимов его лазерной абляции лежит потенциал для комплексного исследования их связи и влияния на антибактериальные свойства получаемых коллоидных растворов. В данной работе проводится именно такое исследование.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Уничтожение патогенных бактерий

Бактерии по отношению к человеку могут быть полезными, нейтральными или опасными. Опасные, то есть такие, которые вызывают развитие заболеваний, называются *патогенными*. Несмотря на всё многообразие мира бактерий, сравнительно небольшое количество является для человека патогенными — менее 100 [22]. К наиболее известным родам патогенных бактерий относятся, например, *Bacillus*, *Chlamydia*, *Salmonella*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*.

Заболевания, вызываемые патогенными бактериями, относятся к наиболее распространённым и опасным на Земле. Это туберкулёз, пневмония, столбняк, тиф, дифтерия, сифилис и многие другие.

Все бактерии можно разделить на два класса по строению клеточной стенки с помощью метода окраски Грама. Бактерии окрашиваются специальными красителями и потом промываются — в зависимости от строения мембраны они при этом либо остаются прочно окрашенными, либо обесцвечиваются. Упрощённые схемы клеточной стенки бактерий представлены на Рисунке 1.1.

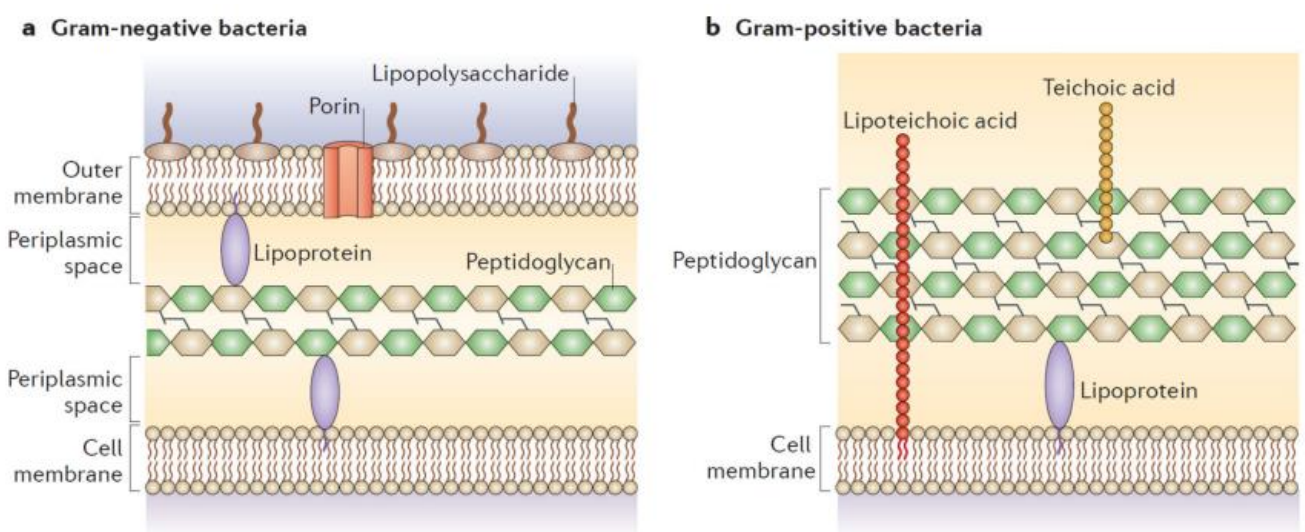


Рисунок 1.1 – Строение клеточной стенки (а) грамотрицательной и (б) грамположительной бактерий. [23]

Можно заметить, что они отличаются для грамположительных и грамотрицательных бактерий: большинство грамположительных бактерий состоит из цитоплазматической мембраны, окружённой пептидогликанным слоем, а грамотрицательные бактерии, в свою очередь, дополнительно окружены вторым липополисахаридным (или эндотоксическим) слоем. Внешняя мембрана обеспечивает дополнительную защиту, однако всё равно имеет поры, через которые вещество может проникать в бактерию.

Пенициллин, выделенный в 1929 году Александром Флемингом [11], а затем поставленный на производство и применённый для лечения инфекций в начале 40-х годов Хоуардом Флори и Эрнстом Чейни, явил собой новую эпоху в борьбе с патогенными бактериями и открыл эру *антибиотиков*. Антибиотиками называются вещества, обладающие антибактериальным эффектом и естественно производимые некоторыми бактериями, либо получаемые из некоторых растений и живых организмов. По сей день антибиотики остаются главным средством борьбы против бактериальных инфекций. Антибиотики делятся на *бактерицидные*, которые уничтожают бактерии, и *бактериостатические*, которые лишают их возможности размножаться.

Механизмы, благодаря которым антибиотики поражают бактерии, описаны в работе Кароор et al. [24]. Некоторые из них воздействуют на стенку клетки. Так, например, бета-лактамы нарушают её синтез, что приводит к лизису (разрушению) клетки. Гликопептидные антибиотики также ингибируют синтез стенки бактерии. Другие классы антибиотиков препятствуют белковому синтезу в РНК: на разные участки РНК так влияют тетрациклины, макролиды, оксазолидиноны и другие. Фторхинолоны, в свою очередь, ингибируют ДНК-гиразу, тем самым нарушая синтез ДНК. Сульфаниламиды и триметоприм влияют на различные стадии метаболизма фолиевой кислоты — данные классы антибиотиков можно применять вместе для синергии и для понижения темпа мутации бактерий [25].

Можно отметить, что антибиотики обладают широким спектром воздействия на бактерии и высокой эффективностью.

Однако у антибиотиков есть целый ряд существенных недостатков. Одним из важнейших из них являются их побочные эффекты [13]. В той или иной степени это касается всех перечисленных классов антибиотиков. Так, бета-лактамы проявляют негативные эффекты при слишком больших дозировках [26], цефазолин вызывал приступы в пациенте с хроническим заболеванием почек [27], а Stefano et al. [28] в своей работе отмечают возможную связь между некоторыми антибиотиками и психическими расстройствами. Heta and Robo [29] делают обзор побочных эффектов различных антибиотиков в периодонтальной терапии: среди них встречаются аллергии, аллергии на коже, нефрит, проблемы с пищеварительной системой и другие. В целом антибиотики требуют чрезвычайного внимания к истории заболеваний пациента и часто подходят далеко не всем.

Другой, более глобальной проблемой, является резистентность бактерий к антибиотикам. Активным, повсеместным и, порой, чрезмерным использованием антибиотиков человечество стимулировало, вероятно, сильнейшую мутационную активность в истории Земли [30]. По мере использования антибиотика бактерии начинают вырабатывать к нему сопротивление. Фармакология превращается в «гонку с бактерией», и можно, например, отметить, что Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США с каждым десятилетием одобряет всё меньше новых антибиотиков [31].

Karoor G. et al. [24] также описывают различные механизмы, с помощью которых бактерии вырабатывают иммунитет к антибиотикам.

Одним из механизмов является изменение пропускания мембраны с целью не пропустить антибиотик внутрь клетки. Это может достигаться с помощью активации эффлюксных насосов, которые обеспечивают «выкачивание» антибиотика через поры мембраны и недопускание его внутрь клетки в достаточном количестве, либо с помощью изменения целевой молекулы, которое помешает антибиотику войти с бактерией в контакт. Такое изменение может произойти во всех органеллах бактерии, на которые может повлиять препарат, как описано выше. Другим механизмом является непосредственная инактивация

антибиотика. Бактерии, развившие сопротивление ко многим препаратам, называются *супербактериями* (*super bugs*) и представляют собой особую опасность для человечества.

Учитывая вышеперечисленные недостатки антибиотиков и связанные с ними сложности, становится очевидно, что для них существуют и активно изучаются различные альтернативы. Обзоры таких альтернативных методов были проведены Czaplewski et al. [32] и Ghosh et al. [33]. Упомянем кратко некоторые перечисленные ими технологии.

Фаготерапия представляет собой использование бактериофагов с целью уничтожения бактерий. Эта технология уникальна тем, что активное вещество в ней само размножается и способно очень селективно уничтожать бактерии, однако к их недостаткам относят иммуногенность, а также возможное выпускание бактерией эндотоксинов. *Бактериоцины* — белки, вырабатываемые бактериями против бактерий той же популяции с целью предотвращения конкуренции — также способны очень селективно действовать на определенные культуры, но их сложно производить в большом количестве. Похожими свойствами обладают и *антитела*, вырабатываемые в организме. Кроме выборочного действия, они также отличаются тем, что не наносят урона микрофлоре организма. Вместе с тем их тоже трудно и дорого производить, и, кроме того, тяжело хранить. К другим перечисленным альтернативам относятся лизины, антимикробные пептиды, пробиотики, а также множество синтетических решений.

Подводя итоги, можно сказать, что антибиотики, которые спасли и продолжают спасать миллионы жизней, пребывают, тем не менее, в некотором кризисе — многие учёные предвещают так называемую «post-antibiotic era» [34]. Альтернативные решения существуют и активно развиваются, но многие из них, биологические, отличаются высокой сложностью и дороговизной.

Однако существует отдельный, совершенно другой класс используемых препаратов, особенно перспективный в силу простоты своей технической реализации, который может решить некоторые существующие проблемы.

1.2 Антибактериальные свойства наноматериалов

Веществами, представляющими такие возможности, являются *наноматериалы* [31, 35]. Наноструктуры и наночастицы различных металлов, оксидов и полупроводников обладают высоким соотношением площади к объёму, а также уникальными химико-физическими свойствами, которые, как считается, делают их столь эффективными против бактерий. Некоторые исследования [36] также указывают на то, что естественные бактерии не вырабатывают сопротивление к наночастицам, что является существенным преимуществом.

Механизмы, с помощью которых наноматериалы уничтожают бактерии, будут подробно рассмотрены далее, сейчас же ограничимся кратким их перечислением. Основными механизмами являются (см. Рисунок 1.2): 1) синтез активных форм кислорода, которые наносят урон клеточным структурам; 2) нарушение целостности мембраны клетки; 3) нарушение энергообмена клетки; 4) ингибирование синтеза ДНК.

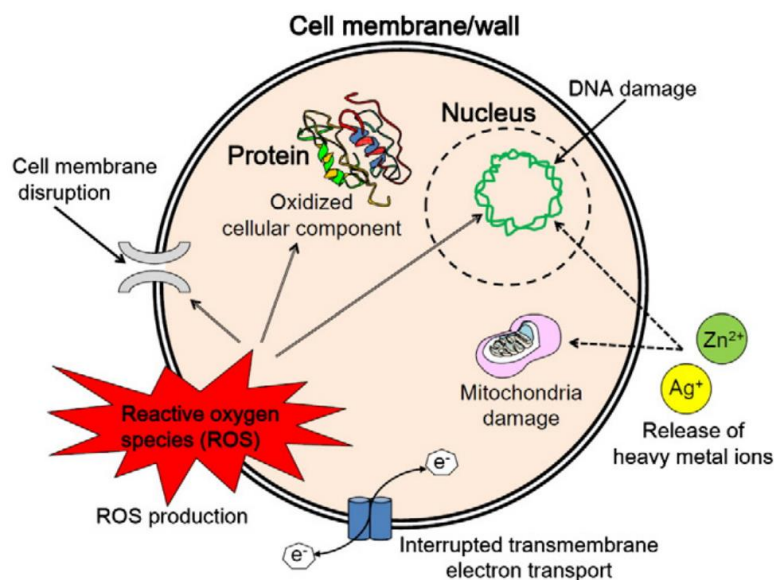


Рисунок 1.2 – Механизмы урона клетки различными наноматериалами. [31]

Для синтеза таких наноматериалов применяются самые разные вещества. Одним из самых популярных материалов для этого является серебро (Ag). Ещё в

древние времена люди знали о его способности подавлять распространение инфекций при некоторых медицинских процедурах [37], а также изучали его медицинские свойства [38]. Среди металлических наноматериалов серебряные наночастицы являются самыми эффективными и успешно уничтожают штаммы различных бактерий [39]. Серебряные наночастицы поражают дыхательную цепь клетки и её способность размножаться (атакуя ДНК) и в итоге приводят к её гибели. Кроме того, параллельно с этим они выпускают ионы серебра, которые усиливают антибактериальный эффект.

Так, например, Salomoni et al. [39] в своей работе тестируют эффективность наночастиц серебра против штамма *Pseudomonas aeruginosa*, грамотрицательной бактерии, известной своей высокой степенью модифицируемости, которая приводит к выработыванию у неё сильной резистентности к антибактериальным веществам. Результаты исследования авторов приведены на Рисунке 1.3.

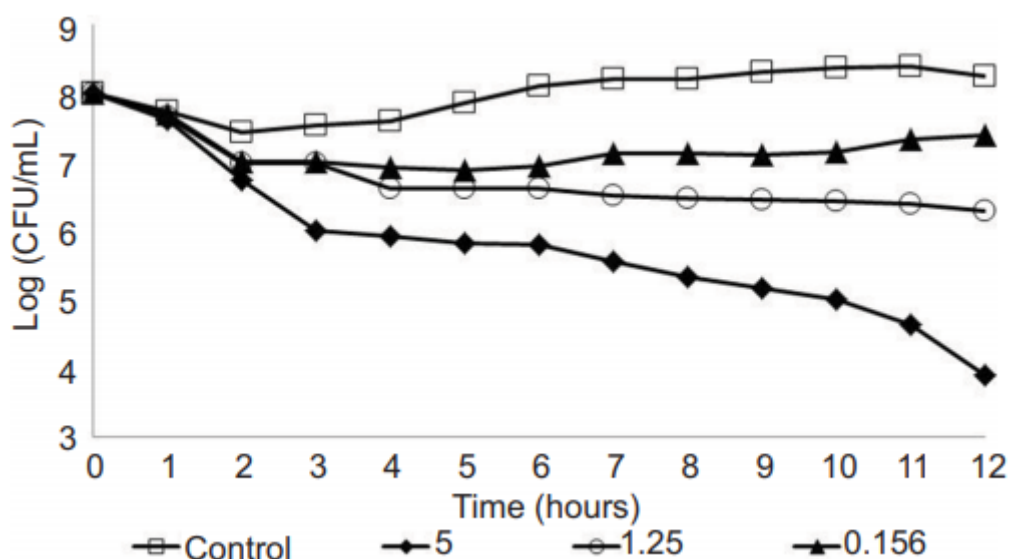


Рисунок 1.3 – Уничтожение штамма *Pseudomonas aeruginosa* раствором наночастиц серебра в разных концентрациях (мкг/мл). [39]

Каждый час после инкубации культуры с раствором в различных концентрациях (плюс дополнительно контроль) измерялось количество колониеобразующих единиц на миллилитр. Можно заметить, что при

максимальной концентрации в 5 мкг/мл серебряные наночастицы способны через 12 часов уменьшить популяцию бактерий на 4 порядка по сравнению с контролем.

Однако применение наночастиц серебра ограничено их повышенной токсичностью. Они проявляют цитотоксичность и генотоксичность по отношению к клеткам человека [40], изменяют численность клеток крови, могут нанести урон почкам и привести к формированию аргирии, то есть необратимой пигментации кожи. Подробный обзор возможных побочных эффектов приведён в работе Drake and Hazelwood [41].

Другим популярным материалом является оксид цинка (ZnO), полупроводник. Наноструктуры ZnO отличаются нетоксичностью, высокой биосовместимостью, простотой изготовления и высокой селективной способностью при уничтожении некоторых видов бактерий. Sirelkhatim et al. [42] сводят в своём обзоре обширный корпус работ, посвященных антибактериальным эффектам и механизмам селективной токсичности наночастиц оксида цинка. Важно отметить, что наноструктуры оксида цинка далеко не обязательно представляют из себя традиционные наночастицы-наносферы. Возможен также синтез наностержней, нанотрубок, нанопроводов, наноиглол, наноколец, и даже наноклеток и наноспиралей [43, 44].

В своей работе Souza et al. [45] исследуют влияние наночастиц оксида цинка, полученных химическим методом, на штаммы бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*. Авторы отмечают, что антибактериальный эффект для некоторых культур достигает положительного контроля (в качестве которого выступает антибиотик ципрофлоксацин), а для *Pseudomonas aeruginosa* соответствует отрицательному контролю (то есть не воздействует на культуру).

Ещё одним оксидом, используемым в задаче уничтожения бактерий, является диоксид титана (TiO₂). В силу своей популярности эти частицы являются одними из наиболее изученных. Их антибактериальная активность объясняется активной стимуляцией выделения активных форм кислорода, которые наносят урон оболочке бактерии. При поражении мембраны нарушаются многие ключевые

биологические процессы в клетке, такие как полупроницаемость, дыхание и окислительное фосфорилирование. Данные частицы могут действовать как со сторонним облучением, так и без него.

Mahdy et al. [46] исследуют эффективность наночастиц диоксида титана (средний размер 33 нм, анатаз) против штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Эффективность авторы измеряют с помощью сравнения оптической плотности выращенных культур. Авторы делают вывод, что наноразмерный диоксид титана успешно борется с обеими культурами. Именно против *Escherichia coli* особенно хорошо показывают себя диоксид титана во множестве работ.

Ещё одним интересным свойством частиц диоксида титана является возможность синергично соединять их с другими веществами. Namal et al. [47] синтезировали наночастицы диоксида титана, легированные серебром, углеродом и серой. Получившиеся наноструктуры обладают широким спектром действия (как антимикробным, так и фотокаталитическим), что даёт авторам надежду на возможность разработки многофункциональных наноматериалов, справляющихся с различными задачами одновременно.

Другим благородным металлом, обладающим антибактериальным эффектом помимо серебра, является золото [48]. Кроме индивидуального использования, его часто комбинируют с более традиционными методами: соединяют с антителами, антибиотиками и так далее. Комбинирование стрептомицина, гентамицина и неомицина с наноразмерным золотом позволяет уничтожать бактерии, резистентные к антибиотику в чистом виде или улучшать существующие показатели. Так, например, соединение ампициллина с золотыми наночастицами позволило увеличить его антибактериальный эффект в два раза против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella mobilis*.

Используются и тестируются и более редкие наноматериалы. Ren et al. [17] исследуют наночастицы оксида меди, Ruparelia et al. [49] определяют штаммы бактерий, на которые наночастицы меди оказывают больший эффект, чем наночастицы серебра, а Sahin et al. [50] исследуют комплексные наночастицы ZnO-Al₂O₃ и их эффективность против *Escherichia coli* (см. Рисунок 1.4).

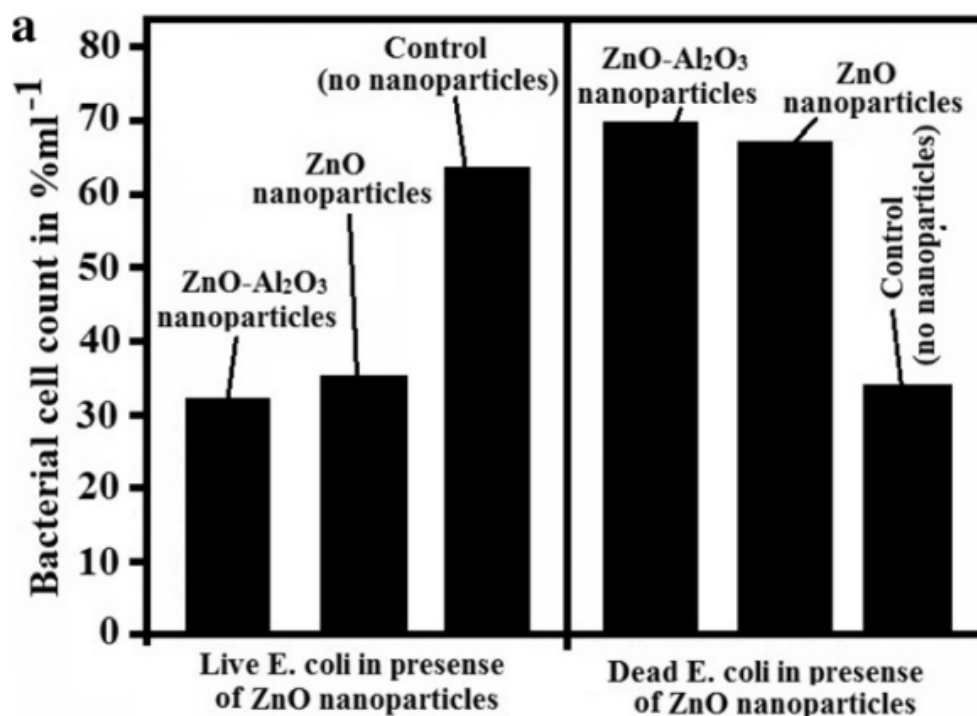


Рисунок 1.4 – Эффективность наночастиц оксида цинка и комбинированных наночастиц оксида цинка и оксида алюминия против *Escherichia coli*. [50]

Подводя итоги, можно сказать, что наноматериалы, получаемые из металлов и полупроводников, представляют собой интересное и перспективное развитие технологий уничтожения бактерий. Вопрос токсичности, столь актуальный для антибиотиков, стоит только для некоторых из наноматериалов, многие из них нетоксичны для человека. Подобные наноструктуры покрывают широкий спектр биомедицинских задач: некоторые имеют деструктивный эффект на многие бактерии, некоторые более селективны. Благодаря комбинации различных методов воздействия на бактерии, наноматериалы «сопротивляются сопротивлению» и успешно уничтожают резистентные культуры.

Один из самых перспективных материалов ещё не был назван в вышеприведенном списке. Таким материалом является селен. Селен (Se) — неметалл 16-й группы периодической таблицы химических элементов. Он содержится в Земной коре и в различных живых организмах, где выполняет множество важных функций [51]. Долгие годы селен не получал достойной оценки своей важности от учёных, однако исследования последних десятилетий в корне

перевернули представления о представленности селена в различных биологических процессах на Земле.

Помимо роли селена в биохимических циклах веществ в атмосфере и литосфере Земли [52, 53], важнейшим открытием была его роль в биологии живых существ и, в частности, человека [54].

Селен является ключевым элементом некоторых метаболических путей [55]. Существуют также исследования, демонстрирующие эффект селена в борьбе с раком [56], понижении смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [57] и предотвращении утраты костной ткани [58]. Большой процент людей на Земле (500–1100 миллионов) живут с недостатком селена [51, 59], в частности, этим страдают области бывшей Югославии, Польши, Китая и России. Вместе с тем в больших количествах селен может быть токсичен для человека, и существует также ряд недугов, вызываемых переизбытком селена в организме. Именно поэтому в своей статье о применении селена против рака Brozmanová et al. называют селен «палкой о двух концах» [56].

1.3 Биомедицинские применения наноструктур селена

Учитывая всё вышесказанное, можно понять природу интереса исследователей к биомедицинскому эффекту наноматериалов селена. Действительно, как было отмечено выше, высокое соотношение площади поверхности к объему и различные уникальные морфологические и физико-химические свойства часто позволяют наноматериалам быть эффективней их объемного варианта. В разделах 1.3 и 1.4 будет описано разнообразие и эффективность данных методов в различных задачах биомедицины, в разделе 1.5 будут подробно разобраны возможные механизмы влияния селеновых наноматериалов на бактерии, а в разделах 1.6 и 1.7 будет проведено сравнение возможных методов синтеза подобных наноструктур.

В своей работе Tan et al. [20] проводят подробный обзор изучаемой области. Перед тем как подробно описать антибактериальный эффект наноструктур селена,

коротко упомянем другие их эффекты, демонстрирующие широкий спектр возможных применений и актуальность исследования синтеза таких наноматериалов.

Как и обычный селен, наноразмерный селен применяется в борьбе с раком. Так, Bhattacharjee et al. [60] после *in vivo* эксперимента на мышах отмечают способность наночастиц селена воздействовать на саму опухоль и уменьшать её объём, а также уменьшать токсический эффект химиотерапии, что может найти применение в лечении рака у людей. В другой работе Kong et al. [61] указывают на эффективность наночастиц селена против клеток рака простаты. Существует также обширный корпус работ, указывающих на защитные свойства наночастиц селена против последствий химио- и радиотерапии.

Наноструктуры селена также обладают антигрибковыми свойствами. Отмечается их способность противодействовать росту *Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans* [62], при этом авторы делают вывод, что дрожжевые клетки более подвержены воздействию, чем плесневые клетки.

Биоплёнка *Candida albicans* также является объектом исследования в статье Guisbiers et al. [63]. На Рисунке 1.5 наглядно показаны стадии антигрибкового эффекта наночастиц селена. Можно наблюдать прикрепление наночастиц селена к стенке *Candida albicans*, их проникновение во внешнюю мембрану грибка и нарушение целостности внешней клеточной мембраны, им вызванное. На фотографиях это проявляется в виде стягивания и складывания мембраны.

Кроме этого, исследованы антипаразитарные свойства селеновых наноматериалов. В частности, широкий спектр работ исследует значительный их эффект на лейшимании (паразитические протисты рода *Leishmania*) [64-66]. Так, например, Beheshti et al. [64] проводят *in vivo* и *in vitro* тесты наночастиц селена против *Leishmania major*. Авторы приходят к выводу, что как профилактическое применение наночастиц селена, так и ежедневное инъектирование мышей, не подверженных профилактике, приводит к быстрому заживлению поражений, типичных для кожного лейшманиоза (см. Рисунок 1.6).

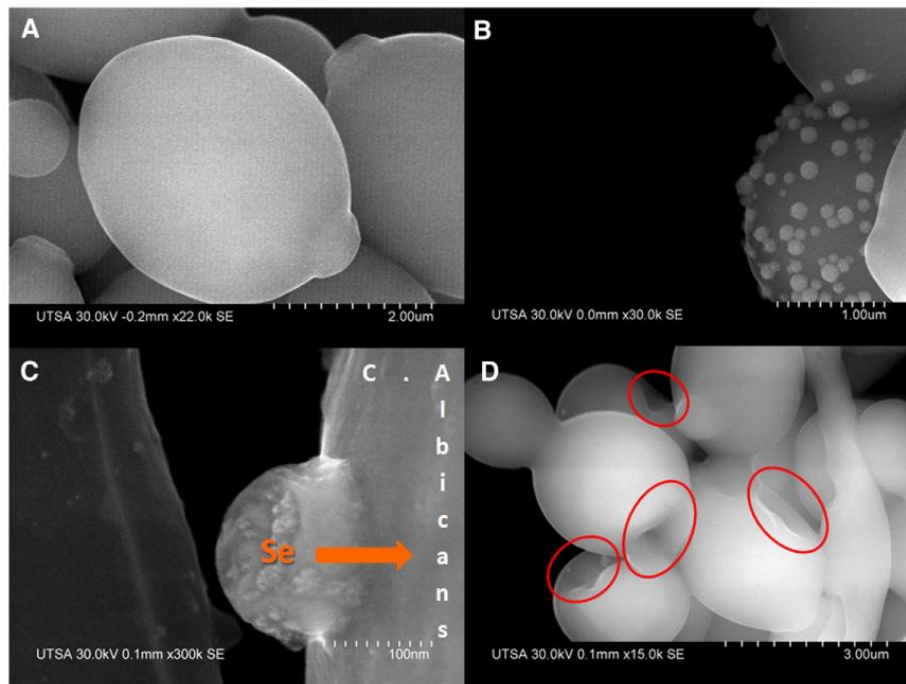


Рисунок 1.5 – (А) Биоплёнка *Candida albicans* (контроль), (В) прикрепление селеновых наночастиц к биоплёнке, (С) проникновение селена во внешнюю мембрану *Candida albicans*, (D) индуцированные селеновыми наночастицами стягивания и складывания внешней клеточной мембраны. [63]

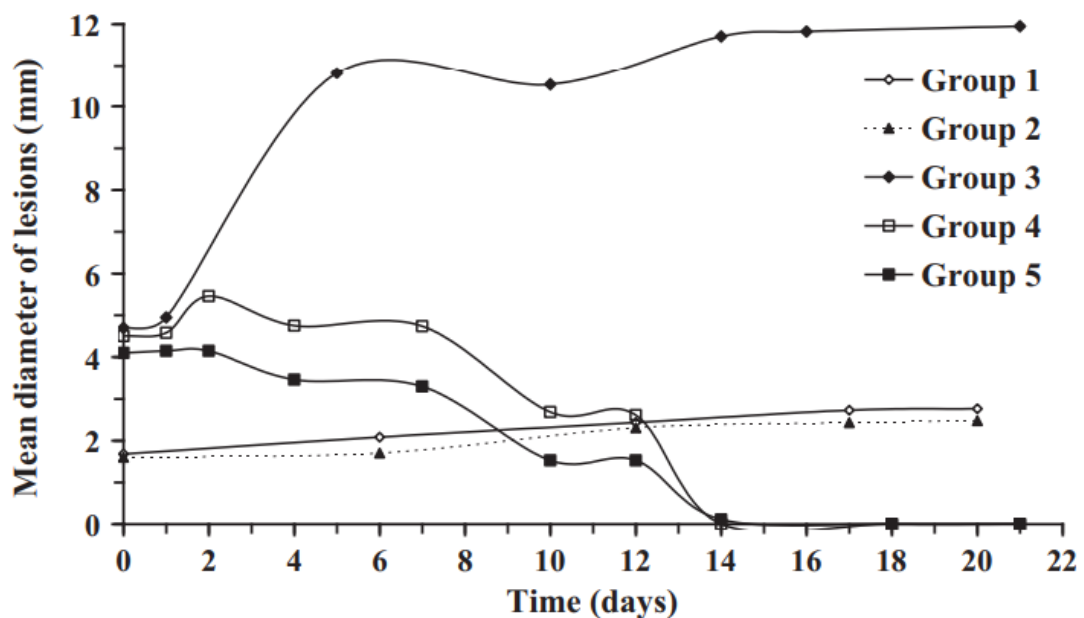


Рисунок 1.6 – Антипаразитарный эффект наночастиц селена. Зависимость диаметра зоны поражения от времени представлен для контроля (группа 3) и для различных групп мышей, интраперитонеально инъецированных наночастицами селена в различных концентрациях. [64]

Отметим, наконец, ещё некоторые особые применения наноструктур селена. Tran et al. [67] используют селеновые нанокластеры как покрытие для титановых костных имплантов. Кроме подавления роста клеток остеогенной саркомы, авторы отмечают усиленную пролиферацию здоровых остеобластов. Принципиально другим является использование наночастиц селена для доставки лекарства в организм. Chen et al. [68] связывают наночастицы селена с двухъядерным рутениевым комплексом для эффективной доставки в организм малых интерферирующих РНК с возможностью отслеживания распространения лекарства.

В целом можно отметить, что селеновые наноматериалы нашли широкое применение в различных областях биомедицины.

1.4 Антибактериальные свойства наноструктур селена

Самым же изученным и одним из самых перспективных для применения селеновых наноматериалов в биомедицине является их антибактериальный эффект. Одной из причин такой популярности является тот факт, что при значительной антибактериальной эффективности наноматериалы селена менее токсичны, чем, например, наноматериалы серебра, которые, как упоминалось в разделе 1.2, являются наиболее антибактериально эффективными [69].

Наноструктуры селена отлично справляются с грамположительными бактериями, в то же время в литературе нет полного согласия касательно их влияния на грамотрицательные бактерии. Рассмотрим данное явление на примере некоторых статей, использующих в качестве целевых культур две наиболее популярные и являющиеся самыми известными представителями двух классов бактерий — грамположительные *Staphylococcus aureus* и грамотрицательные *Escherichia coli*.

Первая статья, описывающая антибактериальный эффект наночастиц селена на золотистый стафилококк, датируется 2011 годом [70]. Наночастицы, полученные химическим путём, со средним размером порядка 40–60 нм использовались в виде раствора с различными концентрациями (7.8, 15.5 и 31

мкг/мл). Данные растворы смешивались с бактериями и культивировались в инкубаторе на протяжении 3, 4 и 5 часов соответственно. Итоговые концентрации бактерий были получены переводом измеренной оптической плотности смеси.

На Рисунке 1.7 представлены полученные концентрации бактерий (шкала логарифмическая). Можно отметить, что присутствие наночастиц селена уменьшило концентрацию бактерий по сравнению с контролем в 20 раз для отметки в 3 часа, в 50 раз для отметки в 4 часа и в 60 раз для отметки в 5 часов. Можно также отметить, что увеличение концентрации селена в 4 раза практически не влияет на результат, что может быть связано с высокой долей уничтоженных бактерий.

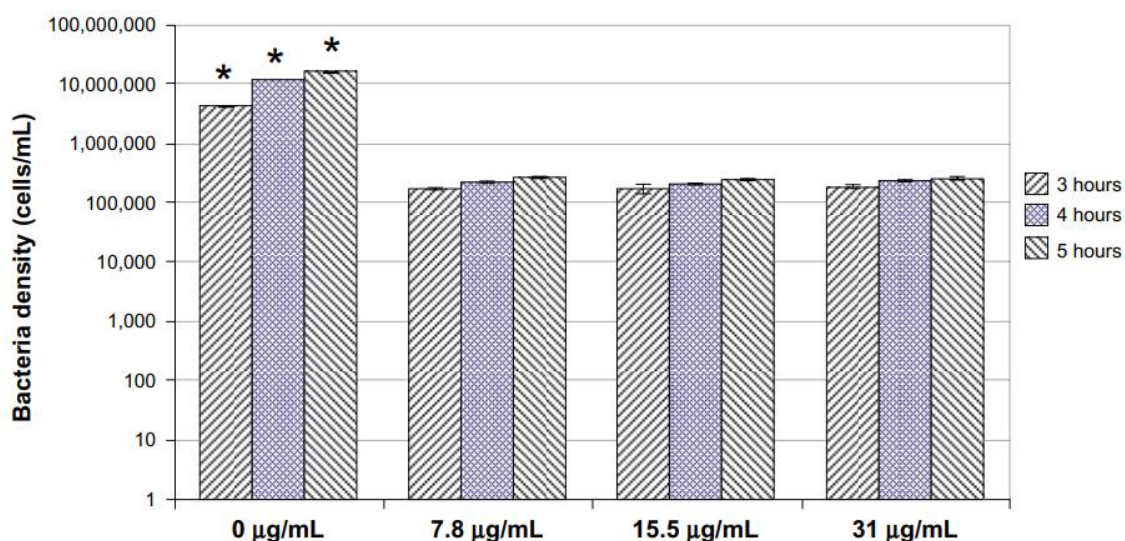


Рисунок 1.7 – Концентрация бактерий *Staphylococcus aureus* через 3, 4 и 5 часов при использовании растворов селеновых наночастиц с различными концентрациями. [70]

В более поздней работе того же автора [71] сравнивается влияние наночастиц селена уже на оба вышеупомянутых штамма бактерий. Наночастицы были вновь получены химическими методами и были стабилизированы поливиниловым спиртом, их диаметр лежал в пределах от 40 до 150 нм, с максимумом в районе 70 нм. Бактерии были смешаны с водными растворами наночастиц в пропорции 100 мл на 100 мл и оставлены в 96-луночной плашке, с регулярным измерением

оптической плотности. В данной работе рост бактерий сравнивается напрямую по оптической плотности на длине волны 630 нм, а концентрации изменяются в миллионных долях (ppm).

На Рисунке 1.8 можно заметить значительный ингибирующий эффект полученных растворов на рост золотистого стафилококка, причём данный эффект усиливается по мере увеличения концентрации наночастиц. В то же время кишечная палочка остаётся почти незатронутой добавлением селена.

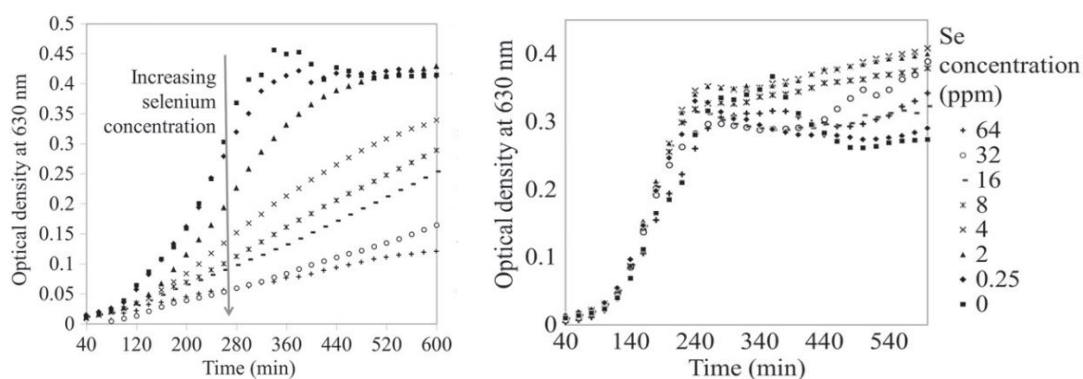


Рисунок 1.8 – Оптическая плотность культур *Staphylococcus aureus* (слева) и *Escherichia coli* (справа) в зависимости от концентрации наночастиц селена. [71]

В своей работе авторы указывают на одно из возможных объяснений этого феномена: синтезированные наночастицы оказались отрицательно-заряженными, так же, как и внешняя мембрана кишечной палочки, в силу чего между ними создавалось сильное электростатическое отторжение. В то же время стенка грамположительных бактерий значительно менее отрицательно заряжена, чем стенка грамотрицательных бактерий, особенно стенка золотистого стафилококка, которая, в зависимости от условий окружающей среды и стадии роста бактерии, имеет заряд от -3 до +1 мВ, благодаря чему селеновые наночастицы могут легче взаимодействовать с бактерией. Важно отметить, что подобная асимметрия, при которой наночастицы демонстрируют лучший ингибирующий эффект на грамположительные частицы, чем на грамотрицательные, представлена не только для селеновых наноматериалов. Premanathan et al. [72], например, описывают похожее явление для наночастиц оксида цинка.

Другой важный вывод статьи Tran et al. заключается в том, что наночастицы селена, во-первых, нетоксичны по отношению к фибробластам мыши, а во-вторых, не демонстрируют гемолитического эффекта по отношению к эритроцитам даже при наибольшей концентрации селена (128 частей на миллион).

В работе Guisbiers et al. [73] также исследуется влияние селеновых наноматериалов на данные две бактерии. В своей работе авторы используют лазерный синтез наночастиц под слоем жидкости ($\lambda = 355$ нм, $\tau = 3.6$ нс, $\nu = 20$ Гц, $F = 2.5$ Дж/см², $T_{\text{экс}} = 15$ мин), наночастицы также имеют отрицательный дзета-потенциал (среднее значение -45.6 мВ) и распределение размеров со средним значением 115 ± 38 нм. Количество бактерий считается авторами путём измерения оптической плотности на длине волны 562 нм и перевода её в концентрацию.

На Рисунке 11 представлены основные результаты авторов. Авторы ссылаются на работу Tran et al. и соглашаются с тем, что стафилококк подавляется значительно эффективней, в силу структуры его стенки. Вместе с тем результаты авторов расходятся в отношении кишечной палочки — в данной работе её рост также замедляется, пусть и меньше. Авторы предполагают, что различие может быть вызвано разными методами синтеза наноструктур.

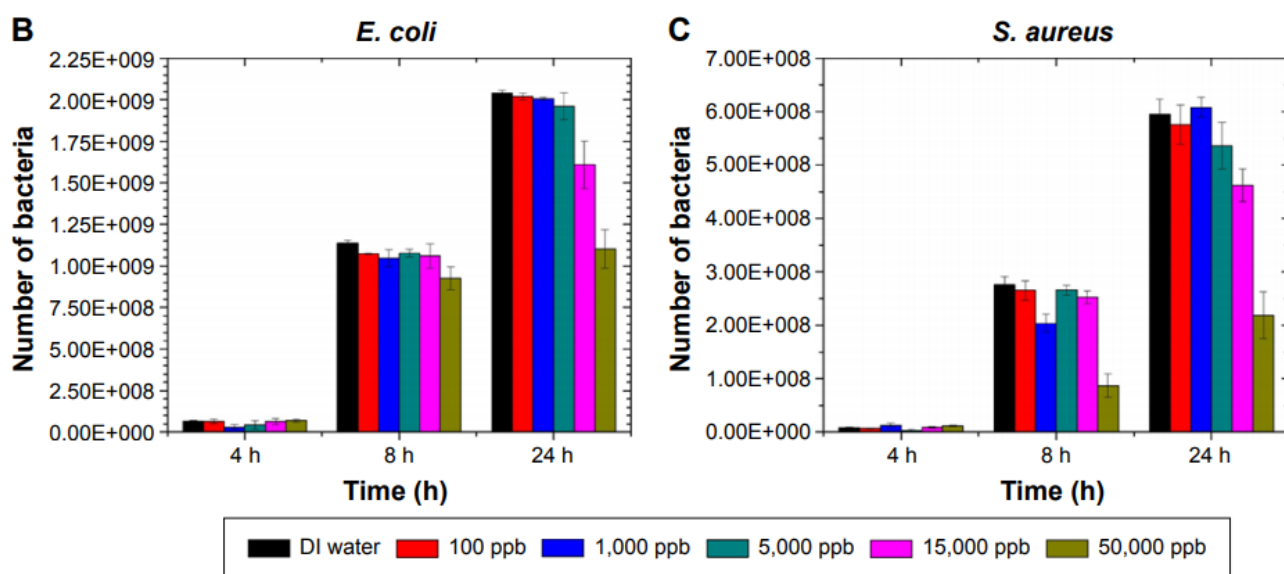


Рисунок 1.9 – Количество бактерий *Escherichia coli* (слева) и *Staphylococcus aureus* (справа) от времени и концентрации наночастиц селена. [73]

Ещё одна более ранняя работа того же автора [74] фокусируется на кишечной палочке. Авторы применяют наносекундный лазер ($\lambda = 355/532/1064$ нм, $\tau = 3.6$ нс, $\nu = 10$ Гц, $F = 2.0$ Дж/см², $T_{\text{экс}} = 15$ мин) с различной длительностью импульса для синтеза наночастиц под слоем жидкости (дистиллированная вода и этанол) и проводят антибактериальные тесты для самых стабильных образцов. Авторы отмечают различную морфологическую структуру наночастиц (аморфные и кристаллические) в зависимости от их размера.

На Рисунке 1.10 можно отметить, что наличие селеновых наноматериалов оказывает антибактериальный эффект на кишечную палочку, однако он незначителен. Как возможную причину авторы указывают низкую концентрацию получившихся растворов.

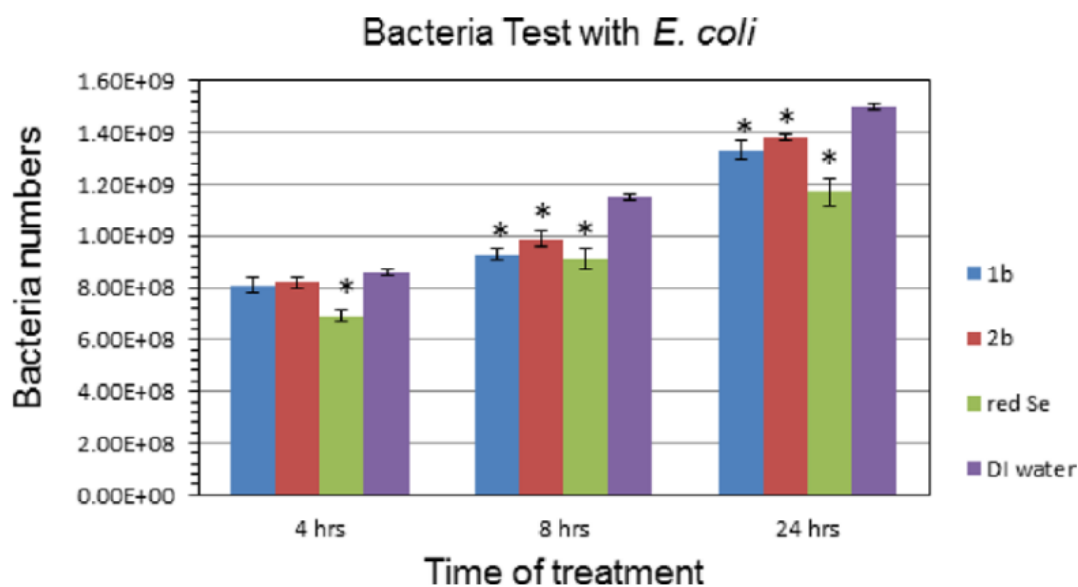


Рисунок 1.10 – Количество бактерий *Escherichia coli* в зависимости от времени.

1b: вода, 355 нм, двукратное облучение, **2b:** вода, 532 нм, двукратное облучение,
red Se: красный селен. [74]

Селеновые наноматериалы применяются и для уничтожения других бактерий. Palomo-Siguero et al. [75] исследуют и демонстрируют антибактериальный эффект наночастиц селена, модифицированных хитозаном, на грамположительные бактерии *Lactobacillus bulgaricus*.

Ionin et al. [76] также показывают способность селеновых нанопокровов (состоящих из сферических наночастиц и наностержней) оказывать ингибирующий эффект на грамотрицательную синегнойную палочку (*Pseudomonas aeruginosa*). Антибактериальный эффект против данной бактерии также демонстрируется в работе Wang and Webster [77].

Nguyen et al. [78] используют наночастицы селена, полученные химическим методом так же, как в работе Tran and Webster [70], для тестирования их антибактериальных свойств против нескольких популярных патогенных бактерий. Авторы, вслед за многими коллегами, подтверждают антибактериальный эффект наноструктур против *Staphylococcus aureus* и его отсутствие против *Escherichia coli*, но также указывают на его отсутствие для грамотрицательных бактерий рода *Salmonella* и грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes*.

Mittal et al. [79] используют химически синтезированные биметаллические наночастицы серебро-селен размера порядка 30–35 нм для поражения бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* (сенная палочка, грамположительная). Стоит отметить, что в данной работе антибактериальный эффект измеряют другим образом — как диаметр зоны ингибирования роста бактерии. Так, наночастицы демонстрируют диаметр зоны в 18 ± 0.5 мм для кишечной палочки и 19 ± 0.6 мм для сенной. Это значение можно сравнить с отрицательным контролем (0 мм) и положительным контролем (антибиотик хлорамфеникол) — 24 ± 0.2 мм и 31 ± 0.3 мм, чтобы понять, что наноматериалы чрезвычайно эффективны.

Резюмируя вышеперечисленные исследования, можно сказать, что селеновые наноматериалы представляют значительный интерес благодаря их низкой токсичности, широкому спектру применений (как антибактериальных, так и прочих биомедицинских) и способности синергично работать с другими материалами. Вместе с тем достаточно очевидно, что данная научная область ещё только развивается: нарастает количество эмпирических данных, которые ставят новые вопросы и обращают внимание на существующие противоречия. Представляется интересным более подробно изучить антибактериальные эффекты наноструктур селена.

1.5 Механизмы уничтожения патогенных бактерий

Выше были кратко упомянуты механизмы, с помощью которых наноматериалы могут поражать бактерии. Рассмотрим их теперь подробнее, на примере конкретно селена, потому что он, во-первых, является предметом исследования данной работы, а во-вторых, демонстрирует сразу несколько потенциальных механизмов действия, благодаря чему является очень наглядным примером.

С этой точки зрения представляет большой интерес работа Huang et al. [19], в которой авторы не только перечисляют возможные механизмы, но и количественно проверяют некоторые из них. Наночастицы в работе авторов получены химическим путём и обладают размерами порядка 40–200 нм.

Авторы исследуют четыре потенциальных механизма воздействия селеновых наноструктур. Первым из них является *нарушение метаболизма путём нарушения концентрации внутриклеточной АТФ*. АТФ (аденозинтрифосфат) является универсальным источником энергии в клетках и играет важнейшую роль в энергообмене клетки, в том числе в её метаболизме и дыхании [80].

На Рисунке 1.11а представлена зависимость концентрации АТФ *Staphylococcus aureus* от размера наночастиц селена и концентрации раствора наночастиц. Можно отметить значительное сокращение количества АТФ для всех концентраций и размеров наночастиц, особенно эффективными оказываются наночастицы порядка 81 нм. Истощение АТФ приводит к гибели клеток [81], что может являться одним из механизмов антибактериального эффекта наноструктур селена.

Второй механизм наиболее полно описан в литературе. Это *генерация активных форм кислорода (АФК)*, присущая для самых разных наноматериалов. Вступая в контакт с внутриклеточным молекулярным кислородом, наноструктуры образуют супероксид и гидроксильные группы [82].

В работе Chen et al. [83] описывается механизм продуцирования активных форм кислорода в раковых клетках при контакте с наночастицами селена. В виде

супероксида и перекиси водорода АФК участвуют в дыхательной цепи митохондрий, а селеновые наноструктуры способны понижать потенциал мембраны митохондрии, стимулировать их выработку и тем самым инициировать апоптоз.

На Рисунке 1.11b изображена зависимость доли клеток, активно производящих АФК, от размера наночастиц и их концентрации. Можно отметить, что для наночастиц размером в 43 и 81 нм виден значительный рост доли таких клеток. Данный потенциальный механизм подавления бактерий является особенно важным, так как он сам по себе многогранен и приводит к множеству различных последствий. В частности, АФК могут наносить урон ДНК клетки, приводя к активации режима SOS, останавливающего деление клетки [84], наносить урон её мембране [85], повышать концентрацию цитозольного кальция [86], а также нарушать метаболизм клетки другими путями. Совокупное влияние данных явлений называется окислительным стрессом и способно значительно влиять на жизнеспособность клетки.

Третьим антибактериальным механизмом является *деполяризация мембраны*. Lok et al. [87] отмечают влияние данного эффекта при воздействии серебряных наночастиц на *Escherichia coli*. Huang et al. также проверяют данный механизм, результаты исследования представлены на Рисунке 1.11c. Можно заметить, что небольшие селеновые наночастицы (43 и 81 нм) привели к некоторой деполяризации мембраны.

Четвёртый механизм, отмечаемый авторами, — это *нарушение целостности мембраны бактерии*. На Рисунке 1.11d–k представлены СГИМ-изображения стафилококка при обработке наночастицами разного размера, в различном масштабе. Необработанный стафилококк имеет сферическую форму, а его поверхность — гладкая. В то же время бактерии, обработанные наночастицами размером 43 нм, демонстрируют «морщинистую» топологию с локальными нарушениями целостности мембраны. На изображениях большего масштаба можно наблюдать наночастицы селена, присоединившиеся к бактериям.

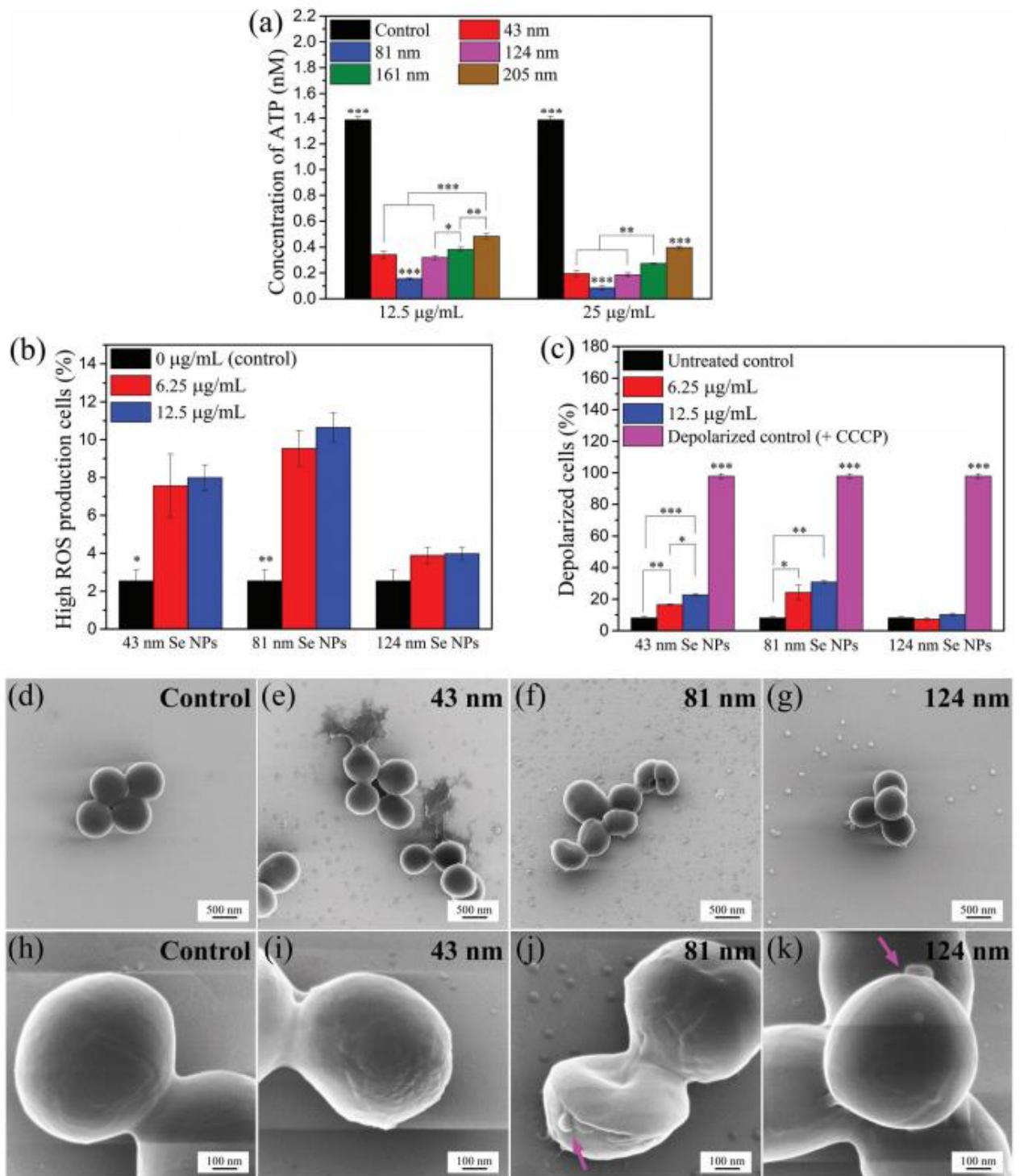


Рисунок 1.11 – Зависимость (а) концентрация АТФ, (б) доли клеток с высоким уровнем генерации активных форм кислорода, (с) доли деполяризованных клеток *Staphylococcus aureus* в зависимости от размера наночастиц и концентрации раствора наночастиц. (d)–(k) Изображения стафилококка при обработке наночастицами разного размера, в различном масштабе, полученные на сканирующем гелиевом ионном микроскопе. [19]

Другой работой, в которой подробно изучаются механизмы антибактериального действия функциональных селеновых наноматериалов, является статья Huang et al. [88]. В данной работе авторы синтезируют синергичные наноконплексы — наночастицы селена с добавлением кверцетина, ацетилхолина и их комбинации. Наночастицы получены химическими методами, характерный размер: Qu@SeNPs — 80 ± 10 нм, Ach@SeNPs — 53 ± 15 нм, Qu-Ach@SeNPs — 120 ± 23 нм. Идея использования таких наноконплексов состоит в том, что данные вещества обладают целым рядом возможных биологических эффектов, и применение комплексных функциональных материалов позволит учёным бороться с супербактериями. Именно поэтому в качестве объекта исследования в работе выступает MRSA, или метициллинрезистентный золотистый стафилококк, а также целый ряд других многорезистентных бактерий.

Авторы отмечают, что Qu-Ach@SeNPs являются наиболее эффективными из изученных образцов, и выделяют несколько механизмов уничтожения бактерий. Во-первых, наноконплексы способны взаимодействовать с мембраной клетки и повышать её проницаемость. Это приводит к нарушению функциональности мембраны и проникновению цитоплазмы за её пределы, а также позволяет наноконпозитам проникать внутрь клетки и поражать её ДНК. На Рисунке 1.12 можно наблюдать данный эффект на бактерии золотистого стафилококка и кишечной палочки. На изображениях присутствуют как деформированные (B, F) бактерии, так и поражённые (C, D, G, H).

Во-вторых, авторы также отмечают повышение выработки активных форм кислорода в клетках.

Подводя промежуточные итоги, можно отметить значительный потенциал селеновых наноматериалов в задаче уничтожения бактерий с точки зрения различных механизмов данного процесса. Как сами по себе, так и в комбинации с другими биоактивными веществами, наноструктуры селена способны ингибировать и поражать бактерии целым рядом способов, что обеспечивает их эффективность и способность обходить сопротивляемость бактерий.

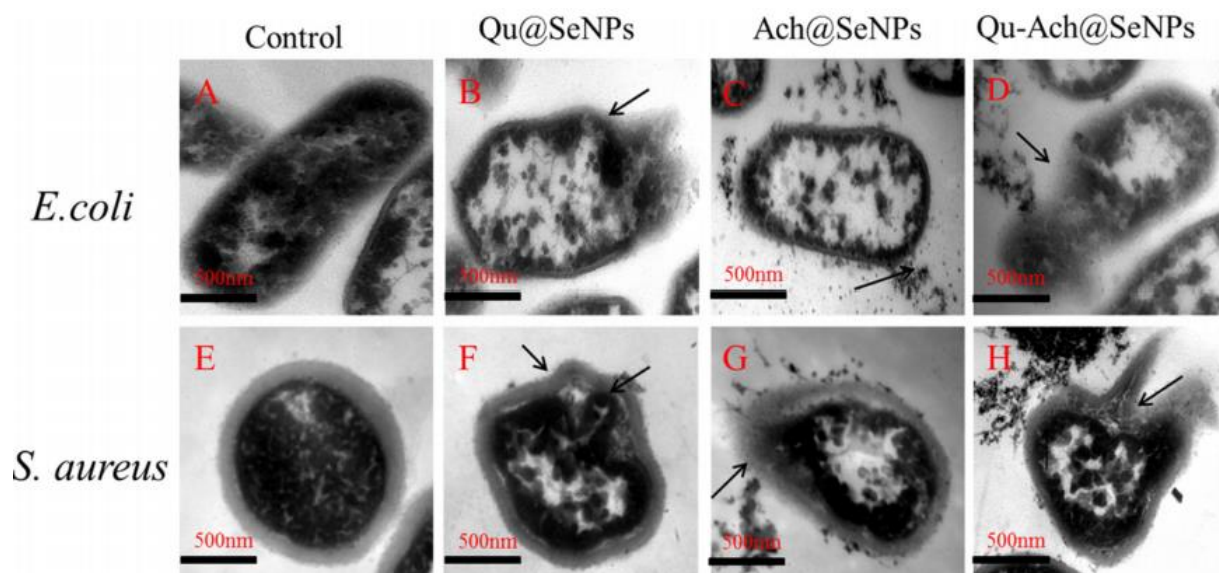


Рисунок 1.12 – Структура бактерий золотистого стафилококка и кишечной палочки после контакта с различными наноконплексами. [88]

1.6 Способы получения наноматериалов

При упоминании работ, исследующих селеновые наноматериалы, были коротко указаны способы их получения, однако они не были описаны подробно. В то же время это является ключевой стадией всего процесса их антибактериального применения — сложное, дорогое или нестабильное получение наноматериалов значительно минимизирует их преимущества перед антибиотиками. Наиболее общо самые распространенные методы синтеза селеновых наноматериалов можно поделить на три категории — *химические*, *биологические* и *физические (лазерные)*. Рассмотрим их подробнее.

Химические методы получения селеновых наноматериалов являются наиболее традиционными и часто упоминались выше. Чаще всего встречаются восстановительные реакции со стабилизатором. Так, Tran and Webster [70] восстанавливают селенит натрия (Na_2SeO_3) с помощью глутатиона ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$), а в качестве стабилизатора используют бычий сывороточный альбумин. После смешения реагентов в дистиллированной воде наночастицы были получены центрифугированием на 13,000 оборотов в минуту, стерилизацией под

ультрафиолетом и последующим пятикратным ресуспендированием в дистиллированной воде.

Полученные наночастицы обладают сферической формой и размерами в пределах от 40 до 60 нм (см. Рисунок 1.13).

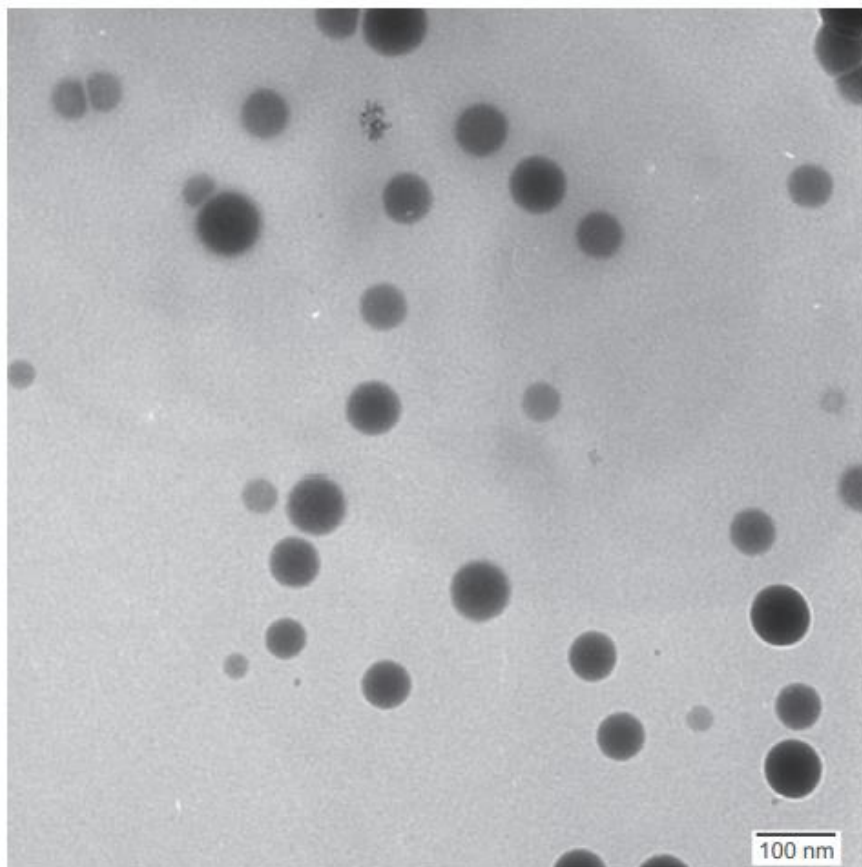


Рисунок 1.13 – Наночастицы селена, стабилизированные в бычьем сывороточном альбумине и разведённые в воде. [70]

В другой работе того же автора [71] в качестве основы также используется селенит натрия, но он восстанавливается L-аскорбиновой кислотой ($C_6H_8O_6$), а в качестве стабилизатора использовался поливиниловый спирт. Полученные наночастицы также были центрифугированы и ресуспендированы в воде, их размер составил от 40 до 150 нм, с максимумом в районе 70 нм.

В подробно разобранной работе Huang et al. [19], исследующей механизмы уничтожения селеном бактерий, стабилизатором также являлся поливиниловый спирт, однако в качестве основы был выбран диоксид селена (SeO_2), а в качестве

восстановителя — тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Авторы контролировали размер наночастиц с помощью различных концентраций реагента и времени протекания реакции. Как было описано в разделе 1.5, размеры наночастиц составляли 43, 81, 124, 161 и 205 нм соответственно (см. Рисунок 1.14).

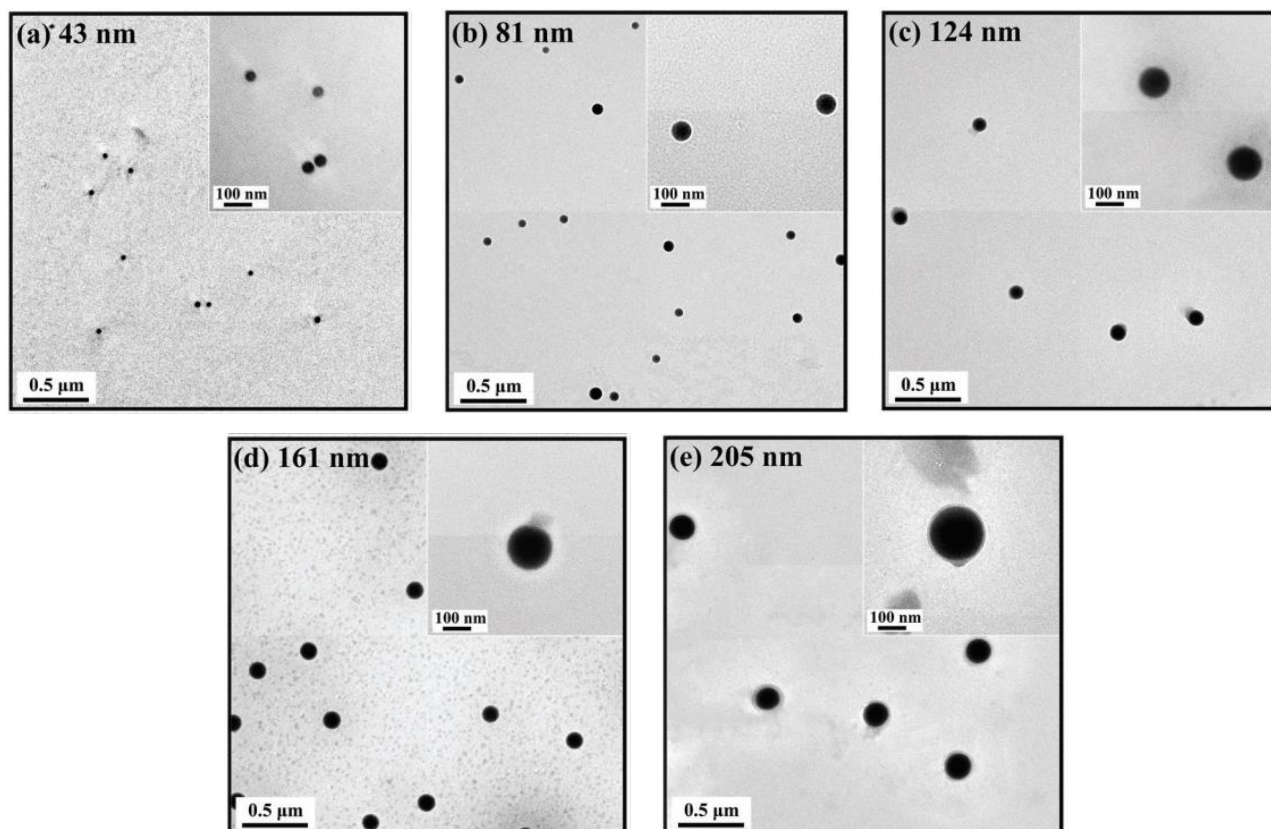


Рисунок 1.14 – Наночастицы селена, стабилизированные в поливиниловом спирте и разведённые в воде. [19]

Chen et al. [89] в своей работе используют селенит натрия и глюкозу ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) для синтеза нано- и субмикрочастиц селена (300–500 нм).

Kumar et al. [90] используют селенистую кислоту (H_2SeO_3) и гидрохинон ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) для синтеза наночастиц с размером 210 ± 20 нм.

К преимуществам химических методов можно отнести высокий уровень контроля над морфологией получаемых частиц, широкий спектр применяемых для синтеза реагентов и отработанность технологий. Вместе с тем данные технологии весьма сложны в своей реализации, могут представлять опасность для экологии из-

за использования реагентов, многоступенчаты и требуют проверки химической чистоты получаемых наноструктур.

Принципиально по-другому синтезируются селеновые наноматериалы *биологическими методами*. Обширный обзор данной технологической области был проведён в 2016 году Wadhvani et al. [91]. Можно отметить некоторую природную симметрию — так же, как наноструктуры селена способны ингибировать бактерии и грибки, они могут быть ими же и синтезированы.

В случае бактерий синтез может осуществляться внеклеточно, внутриклеточно или на мембране [91]. Так, например, Shoeibi and Mashreghi [92] описывают способность энтерококка фекального (*Enterococcus faecium*) внеклеточно синтезировать наночастицы селена из селенита натрия, добавленного в культуру в разных концентрациях. После получения наночастицы были центрифугированы и промыты в дистиллированной воде.

На Рисунке 1.15 можно наблюдать полученные наночастицы. Они обладают сферической формой и размерами в пределах от 29 до 195 нм. Что любопытно, в данной работе авторы исследуют антибактериальный эффект данных наночастиц против других бактерий, и они демонстрируют его против грамположительных *Staphylococcus aureus*. Для синтеза могут также применяться многие другие бактерии.

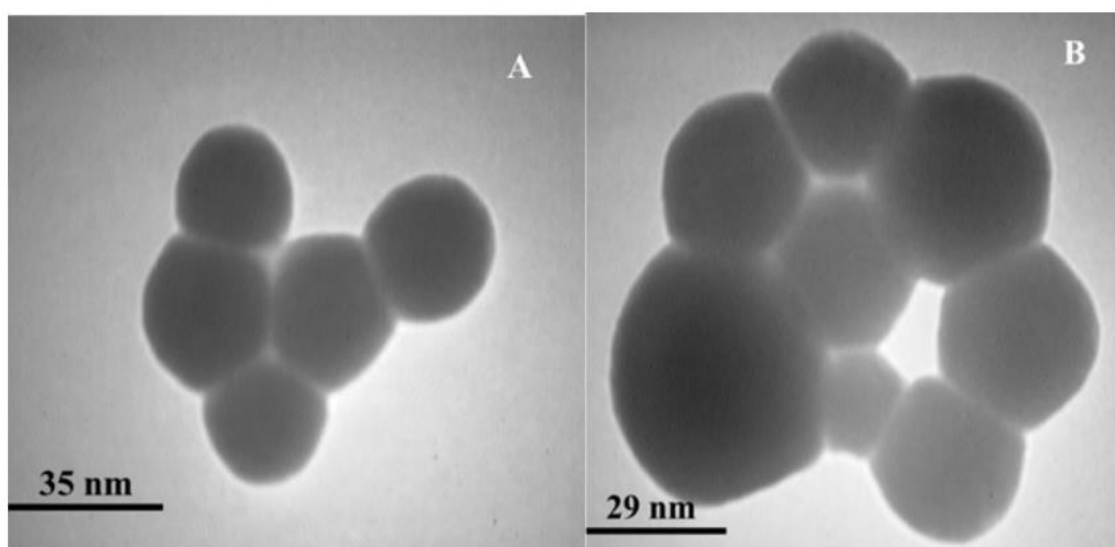


Рисунок 1.15. Наночастицы, синтезированные *Enterococcus faecium*. [92]

Некоторые работы также посвящены синтезу селеновых наноструктур с помощью грибов [93] и растений [94].

К преимуществам биологических методов можно отнести их стабильность благодаря естественной оболочке из органических молекул, которая не позволяет им слипнуться (для чего в химических методах используют стабилизаторы), а также их экологическую чистоту. К недостаткам можно вновь отнести их относительную сложность.

1.7 Лазерный синтез наноматериалов

Перспективной альтернативой вышеперечисленным методам являются методы физические, а именно методы получения наноструктур селена с помощью лазерной абляции. Лазерная абляция относительно проста технологически, чиста экологически, химически стерильна и не требует для синтеза ни дополнительных химикатов, ни выращивания особых культур. Несмотря на то, что в некоторых выборочных работах абляцию селена проводили в вакууме [95, 96], в настоящее время безусловным лидером среди технологий является *лазерная абляция под слоем жидкости (pulsed laser ablation in liquid, PLAL)*.

Упрощённая схема лазерной абляции под слоем жидкости представлена на Рисунке 1.16. В данной технологии образец (в нашем случае, чистый селен) помещается на дно кюветы с жидкостью. Кювета может быть как обычной параллелепипедной, так и полусферической, чтобы получить бóльшую концентрацию наноматериалов за счёт меньшего объёма жидкости. Слой жидкости над образцом должен быть достаточно большим, чтобы не допустить выход воздушного пузыря на поверхность, но достаточно малым, чтобы не ослабить лазерное излучение. В качестве жидкости чаще всего выступает дистиллированная вода, но возможно также использование полиэтиленгликоля, ацетона, этанола и других жидкостей. Образец облучается лазером, происходит абляция вещества (конкретный механизм которой зависит от параметров лазерного излучения), и аблированные наноструктуры оказываются в жидкости.

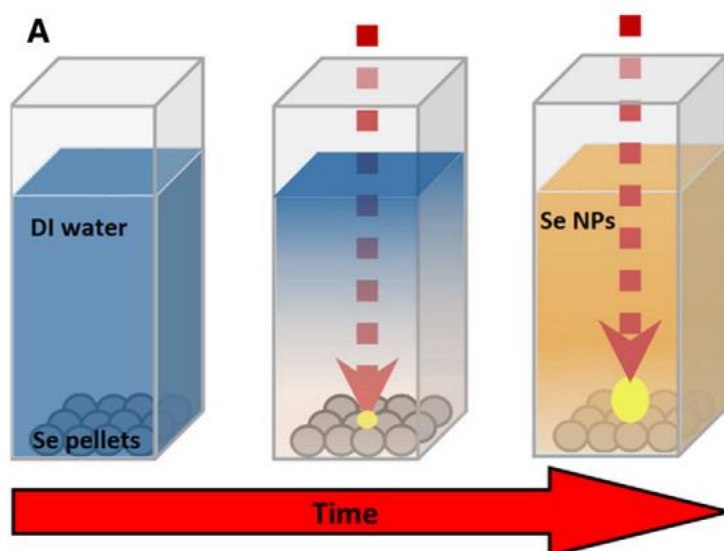


Рисунок 1.16. Упрощённая схема лазерной абляции под слоем жидкости. [63]

Преимуществами такого метода относительно абляции на воздухе или в вакууме являются сохранение всех синтезируемых наноматериалов в объеме жидкости, а также синтез напрямую коллоидного раствора — одного из самых удобных способов хранения наночастиц, которое находит применение во множестве задач, в том числе в задаче уничтожения патогенных бактерий. Для получения коллоидного раствора селена по такой технологии не требуются ни реагенты, ни промывка, ни ресуспендирование.

Первая статья, использующая вариацию данного метода для получения селеновых наноматериалов, датируется 2010 годом и принадлежит Singh et al. [97]. Стоит отметить, что у авторов изначально есть нанопорошок селена (средний размер частиц 69 нм), который авторы помещают в воду и облучают с целью получить квантовые точки значительно меньшего размера. Авторы используют лазер со следующими параметрами: Nd:YAG, $\lambda = 1024$ нм, $\tau = 10$ нс, $\nu = 10$ Гц, $E_{\text{имп}} = 20$ мДж, и облучают им центр коллоидной колонны, предотвращая осаждение частиц постоянным магнитным перемешиванием. Авторы проводят данный эксперимент с различной длительностью экспозиции: 2, 4, 6, 8, 10 и 15 минут. Во время экспериментов авторы отмечают яркий свет и громкие хлопки: звуки объясняются фрагментацией селенового порошка и схлопыванием

кавитационных пузырей, а свет — свечением селеновой плазмы. В качестве механизмов процесса авторы отмечают плавление/испарение селена, а также его фрагментацию в силу электростатического отталкивания частей. Максимальное 15-минутное облучение позволило превратить 69-нанометровые наночастицы α -Se в 3-нанометровые квантовые точки β -Se.

Первой же работой, где наночастицы селена были получены более традиционным методом (описанным в начале раздела), была работа 2012 года, выполненная нашими соотечественниками Kuzmin et al. [98]. В данной статье авторы используют поликристаллический селен в качестве мишени, в роли жидкости выступала очищенная вода, а лазер имел следующие параметры: пары меди, $\lambda = 510.6$ нм и 578.2 нм, $\tau = 15$ нс, $\nu = 15$ кГц, $P = 7$ Вт. Выбор лазера объясняется его хорошим поглощением в коллоидном растворе селена (который имеет характерный красный цвет). Авторы отмечают стабильность полученных коллоидов, которые не агломерировались за месяц. Полученные наночастицы аморфны (в отличие от изначального образца), обладают размером 20–100 нм, средним размером 60 нм и представлены на Рисунке 1.17.

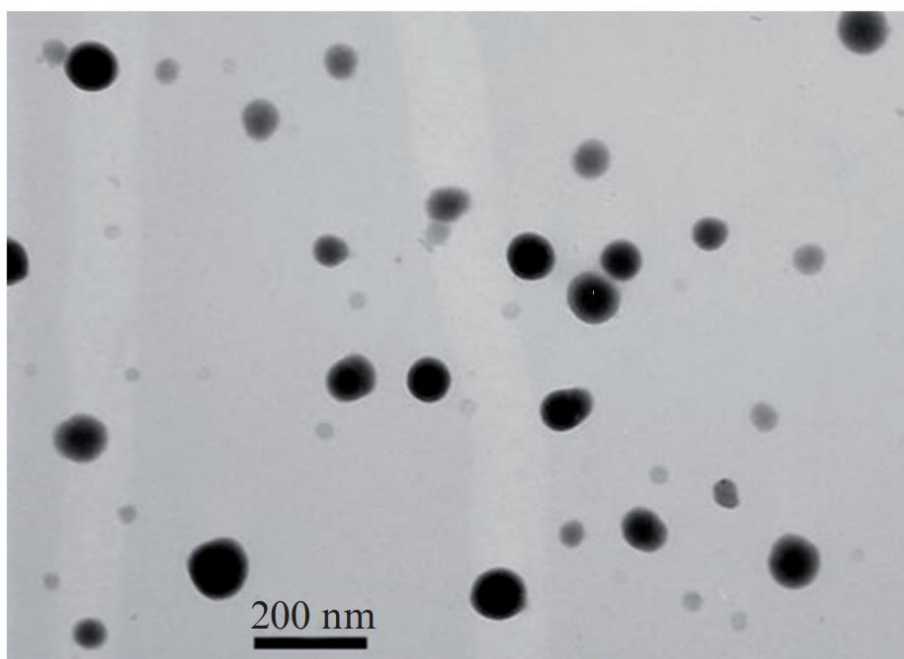


Рисунок 1.17 – Наночастицы, полученные абляцией в воде с использованием лазера на парах меди. [98]

Авторы предлагают следующий возможный механизм аморфизации наночастиц: под давлением окружающего водяного пара наночастицы отрываются от поверхности расплавленного слоя и стремительно охлаждаются, становясь аморфными. При высушивании наночастиц на подложке с нагревом до 120–150°C, наночастицы снова становились кристаллическими, что соотносится температурой перехода селена из аморфного состояния в кристаллическое (115–125 °C).

В следующей работе [21] авторы используют эксимерный лазер со следующими параметрами: KrF, $\lambda = 248$ нм, $\tau = 6$ нс, $\nu = 50$ Гц, $F = 1$ Дж/см², $T = 5$ мин, для обработки селеновой мишени под слоем деионизированной воды с использованием магнитной мешалки. После синтеза коллоиды также подвергаются центрифугированию для отделения наночастиц от субмикрочастиц. После центрифугирования размер частиц составил 62 ± 11 нм.

Авторы также проводят исследование оригинальной мишени и полученных наночастиц методами спектроскопии комбинационного рассеяния. На Рисунке 1.18 можно отметить, что, опять же, смешанная кристаллически-аморфная структура селена сменилась на аморфную, с её характерным глубоко-красным цветом. Процесс синтеза наночастиц наносекундным лазерным излучением авторы описывают так: происходит нагрев, плавление, испарение вещества и образование плазмы. Вещество удаляется с поверхности из-за ударной волны, инициированной расширением плазмы. Так как в данном режиме плазма пространственно ограничена, это приводит к критическим значениям температуры и давления.

Впоследствии Van Overshelde and Guisbiers [99] применяют данный лазер для фрагментации селенового микропорошка для получения наночастиц.

Далее были опубликованы работы по антибактериальному применению селеновых наноматериалов, полученных лазерной абляцией под слоем жидкости, уже рассмотренные в разделе 1.4 [73, 74]. Guisbiers et al. [74], используя различные гармоники Nd:YAG лазера (355, 532 и 1024 нм), приходят к выводу, что наночастицы селена, полученные абляцией под слоем жидкости, можно применять для уничтожения патогенных бактерий.

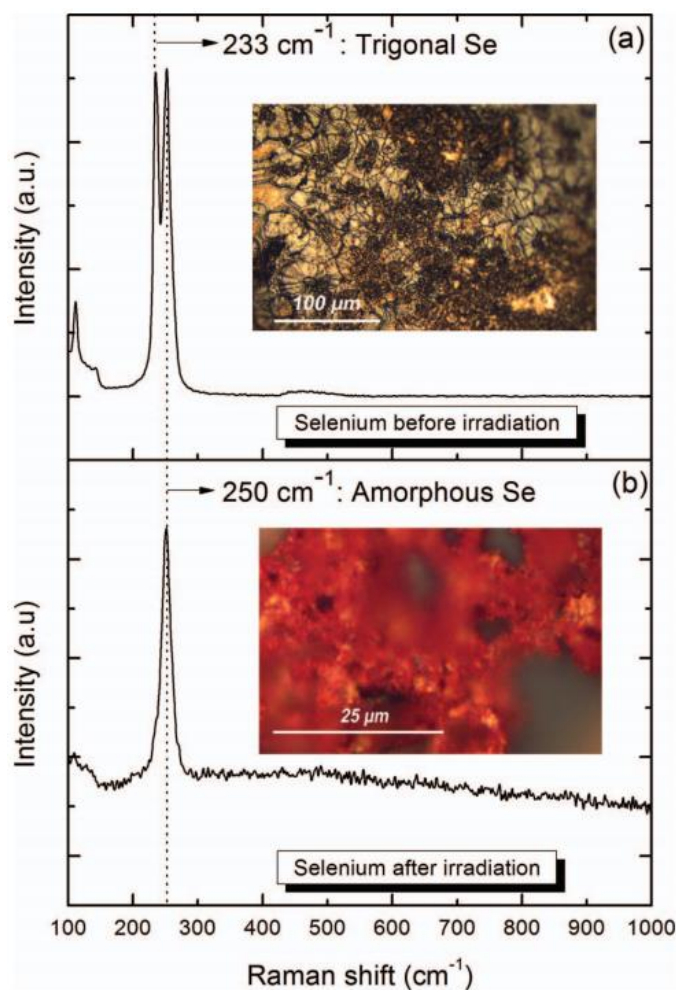


Рисунок 1.18 – Спектры комбинационного рассеяния **(а)** изначальной селеновой мишени **(b)** полученных наночастиц. Снимки сделаны методами оптической микроскопии. [21]

Авторы также впервые отмечают различную структуру наночастиц в зависимости от их размера: наночастицы размером более 300 нм аморфны, а наночастицы размером менее 80 нм — кристаллические. Другой важный вывод этой статьи состоит в том, что вода предпочтительней этанола как среда из-за лучших показателей стабильности получаемых коллоидов.

В работе Roldugin et al. [100] похожие условия (Nd:YAG, $\lambda = 1064$ нм, $\tau = 12$ нс, $\nu = 1$ Гц, $E_{\text{имп}} = 2.5$ Дж) были использованы для синтеза наночастиц селена в дистиллированной воде. Авторы отмечают, что наночастицы порядка 15 нм аморфны, а наночастицы порядка 100 нм — кристаллические.

В одной из следующих своих работ группа авторов Guisbiers et al. делает следующий шаг вперёд — наночастицы селена впервые синтезируются фемтосекундным лазерным излучением [63]. В разделе 1.3 было рассмотрено влияние полученных наночастиц на грибки, теперь же рассмотрим подробно сам синтез наночастиц. Авторы используют титан-сапфировый лазер со следующими параметрами: $\lambda = 800$ нм, $\tau < 100$ фс, $\nu = 80 \pm 1$ МГц, $P = 3$ Вт. Пучок лазера составлял 1.2 мм, в качестве среды выступала деионизированная вода. Авторы отмечают, что, в отличие от наносекундных импульсов, при облучении мишени фемтосекундным излучением в качестве механизма отрыва материала от мишени выступает фотофрагментация. Исследуя «экранирующий пузырь», возникающий на поверхности мишени и центрированный относительно места попадания лазерного излучения на вещество, авторы делают вывод, что это не кавитационный пузырь (вызванный давлением), а пузырь кипения (вызванный перегревом воды). Полученные наночастицы находятся в пределах размеров от 50 до 400 нм, в зависимости от времени экспозиции (от 5 до 60 минут) и, вновь, большие наночастицы получились аморфными, а маленькие — кристаллическими.

В работе Ionin et al. [101] в качестве образца использовался монокристаллический γ -Se, в качестве жидкости — деионизированная вода. В качестве излучателя использовался волоконный лазер со следующими параметрами: $\lambda \approx 1030$ нм, $\tau \approx 310$ фс, $\nu = 0\text{--}2$ МГц, $E_{\text{макс}} \leq 10$ мкДж. Лазерное излучение фокусировалось на поверхности образца, максимальная плотность энергии составляла $F = 2.2$ Дж/см².

Полученные наночастицы представлены на Рисунке 1.19. Можно отметить их средний размер, равный 140 нм, а также их способность слипаться в своего рода конгломераты. Спектроскопия комбинационного рассеяния показала наличие различных фаз в наночастицах. Авторы отмечают, что использование фемтосекундного излучения обеспечивает тот факт, что плазма появляется раньше факела абляции и позволяет произойти прямому отлёту продуктов отслаивания с минимальным окислением.

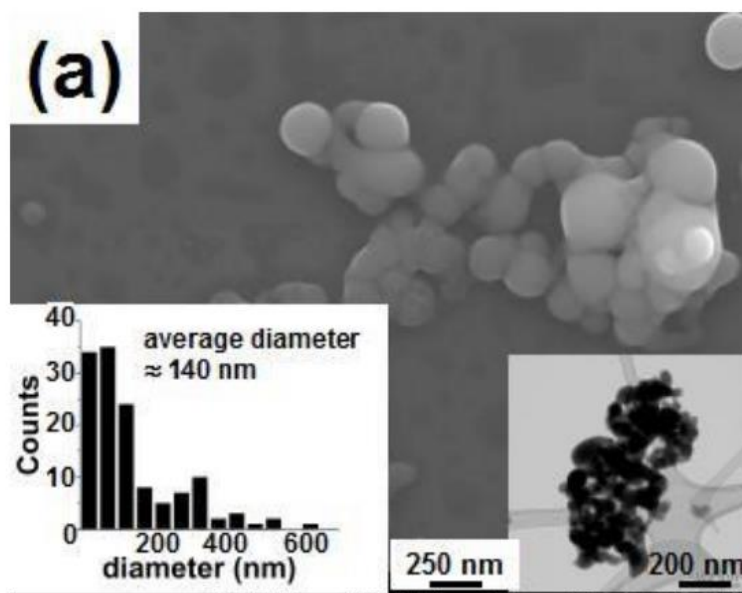


Рисунок 1.19 – Наночастицы, полученные абляцией в воде при излучении фемтосекундного лазера. [101]

Что касается пикосекундного лазерного излучения, удалось найти только одно его упоминание в литературе в отношении селеновых наноматериалов. Saraeva et al. [102] исследуют зависимость массового выхода наночастиц селена от длительности импульса лазера и покрывают диапазон от 300 фс до 8.6 пс. Авторы указывают на рост порогов абляции, связанный с усилением значимости термических процессов при переходе с фемтосекунд на пикосекунды. Однако данная длительность импульса всё ещё относится к ультракоротким импульсам, и представляет интерес исследование промежуточного варианта — лазерных режимов с длительностью импульса в десятки и сотни пикосекунд, то есть большей, чем характерное время электрон-фононного взаимодействия.

Подводя итоги, можно сказать, что синтез наноструктур селена методом лазерной абляции под слоем жидкости — перспективная, но вместе с тем новая и ещё недостаточно изученная область, а применение этих наноструктур для ингибирования бактерий изучено ещё меньше. Требуется более общее, сравнительное исследование различных режимов лазерного излучения в данной задаче и их влияния на антибактериальные свойства получаемых наноматериалов.

1.8 Выводы

Из обзора литературы можно сделать несколько важных выводов.

1. В задаче уничтожения патогенных бактерий традиционно активно применяются антибиотики, однако они обладают рядом серьезных недостатков — в частности, токсичностью и развитием сопротивления у бактерий. Существует значительное количество бактерий, резистентных ко многим лекарствам (супербактерий).

2. Перспективной альтернативой антибиотикам являются наноструктуры металлов, оксидов и полупроводников. Они успешно справляются с широким рядом патогенных бактерий.

3. Одним из представляющих интерес элементов для синтеза наноматериалов является селен. Он нетоксичен для человека и продемонстрировал свою эффективность против ряда бактерий, а также некоторых грибов и паразитов. Одной из причин его эффективности является многообразие возможных механизмов поражения им бактерий.

4. Существует множество способов получения селеновых материалов, в том числе химические и биологические. Особый интерес в связи с химической чистотой, эффективностью и технологической простотой представляет абляция селена под слоем жидкости. Важно отметить, что данная технологическая область сравнительно молода и требует более подробных исследований. Так, режимы получения наночастиц селена (длительности импульса лазера и т. д.) изучены не исчерпывающе, а антибактериальный эффект наночастиц селена, полученных таким методом, исследуется всего в нескольких статьях.

Исходя из данных выводов, в работе была поставлена следующая *цель*:

Комплексное исследование различных режимов получения селеновых наноматериалов методом лазерной абляции под слоем жидкости, изучение морфологии полученных наноструктур и их антибактериального эффекта.

Для достижения данной цели в работе поставлены следующие *задачи*:

1. Получить наноструктуры селена методом лазерной абляции под слоем жидкости, используя нано-, пико- и фемтосекундную лазерные установки.
2. Исследовать оптические свойства получаемых коллоидных растворов методом оптической спектрофотометрии, исследовать морфологию получаемых наноструктур методами сканирующей электронной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния.
3. В сотрудничестве с НИИ им. Пастера исследовать антибактериальный эффект полученных наноматериалов против различных штаммов бактерий диско-диффузионным методом и методом определения минимальной ингибирующей концентрации, определить наиболее эффективные режимы.
4. Провести анализ полученных результатов, сделать выводы о возможности управления параметрами получаемых наноструктур, а также об их антибактериальной эффективности.

ГЛАВА 2. СИНТЕЗ СЕЛЕНОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

На первом этапе работы синтезировались наноматериалы селена, а также изучались их физические свойства. В данный раздел входят:

1. Синтез коллоидных растворов наноструктур селена при различных режимах лазерного излучения.
2. Оценка макроскопических свойств получаемых растворов.
3. Исследование и анализ оптических свойств получаемых растворов.
4. Исследование морфологии наноструктур селена в коллоидах методом сканирующей электронной микроскопии.
5. Оценка фазового состава наноструктур селена методом спектроскопии комбинационного рассеяния.
6. Анализ результатов и подведение выводов о получаемых коллоидных растворах, наноструктурах в них и особенностях их синтеза.

2.1 Получение наноматериалов

Учитывая различия в механизмах формирования наночастиц полупроводников при различной длительности импульса лазерного излучения [103], представляет особый интерес изменение именно этого параметра. Исходя из этого, эксперименты были проведены на трёх лазерных установках, подробные характеристики представлены в Таблице 2.1.

Можно отметить, что длительности импульса отличаются на шесть порядков, покрывая основные технологические режимы, в то же время длины волн излучения всех установок очень близки и лежат в ближнем ИК-диапазоне, что позволяет обеспечить: 1) схожее поглощение излучения в образце, 2) несильное поглощение излучения в воде, оптический путь в которой должен пройти пучок. Кроме того, широкий спектр различных параметров позволяет протестировать различные технологические режимы.

Таблица 2.1 – Используемые лазерные установки и их параметры.

Установка	Минимаркер	Ekspla	Avesta Antaus
Активная среда	Иттербиевое волокно	Nd:YAG	Иттербиевое волокно
Длительность импульса, τ	200 нс	25 пс	215 фс
Длина волны, λ	1064 нм	1064 нм	1030 нм
Частота излучения, ν	1.6–100 кГц	10 Гц	10–200 кГц
Энергия в импульсе, $E_{\text{макс}}$	1 мДж	5 мДж	25 мкДж

Принципиальная схема эксперимента была одинакова для всех экспериментов и представлена на Рисунке 2.1.

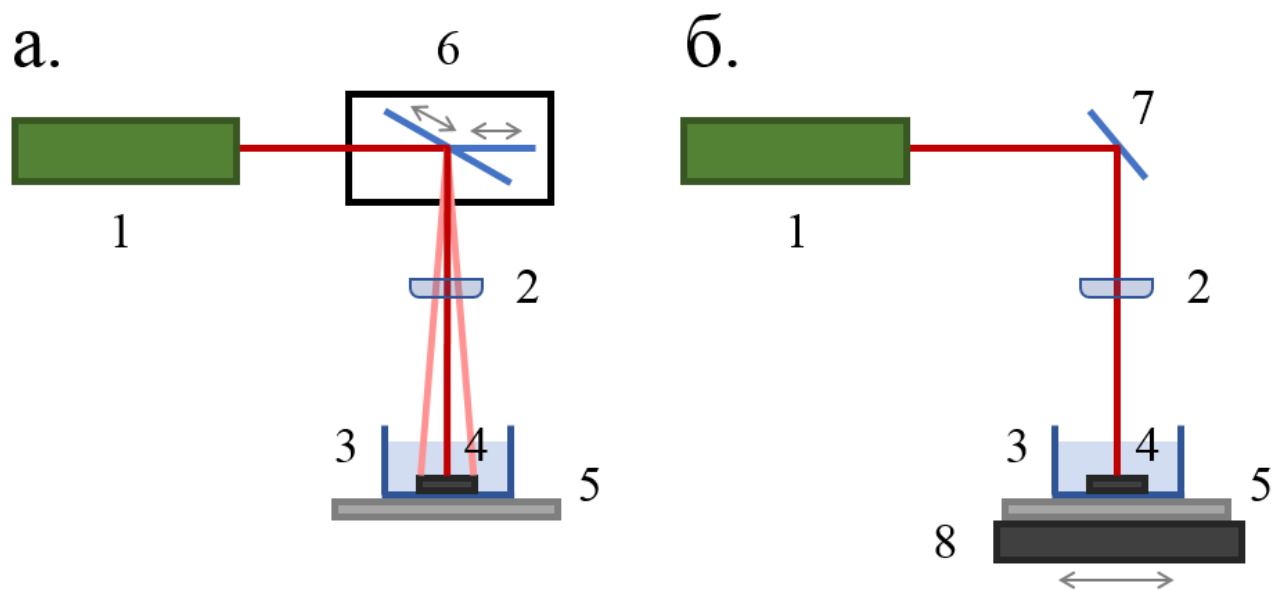


Рисунок 2.1 – Схема эксперимента: (а) наносекундная установка, (б) пикосекундная и фемтосекундная установки. 1 – лазер, 2 – собирающая линза, 3 – кювета с жидкостью, 4 – образец, 5 – подставка, 6 – сканирующая система, 7 – отражающее зеркало, 8 – координатный стол.

Излучение лазера фокусировалось на поверхности образца (или, в случае пикосекундного излучения, ниже поверхности образца), помещённого на дне кюветы под слоем жидкости. В качестве образцов использовался химически чистый селен, в качестве жидкости — вода для инъекций БУФУС. Слой воды над поверхностью образца составлял ≈ 1 мм, объём воды в кювете составлял 3 мл.

С целью предотвратить образование глубоких треков или кратеров, влияющих на ход образования коллоидов, производилось сканирование поверхности: в случае наносекундной установки для этого использовалась входящая в неё сканирующая система, состоящая из двух зеркал, в случае же пико- и фемтосекундной установок, где такой системы нет, сам образец двигался относительно лазерного пучка с помощью координатного стола.

В различных экспериментах для разных установок варьировались энергия в импульсе, количество проходов лазерного излучения, а также частота. Конкретные значения изменяемых параметров лазерного излучения будут представлены вместе с соответствующими им результатами.

Коллоидные растворы наноструктур селена были успешно получены на всех установках. Можно отметить экологическую и химическую чистоту данного метода, а также его технологическую простоту — получение готового раствора занимает всего несколько минут.

2.2 Макроскопические свойства

Внешний вид и цвет коллоидных растворов, полученных на разных установках при наибольшей энергии в импульсе, представлен на Рисунке 2.2. Можно отметить, что раствор, полученный с помощью наносекундной установки, обладает более насыщенным красным цветом, что может указывать на отличие фазы селена [21].

Полученные образцы также обладают очень специфичным неприятным запахом, сродни запаху гниения. Любопытно отметить, что данный запах практически отсутствует для растворов, полученных на пикосекундной установке,

даже при высоких концентрациях. Это указывает на потенциально меньшее выделение селеноводорода, что может представлять интерес для чистоты и безопасности процесса синтеза.

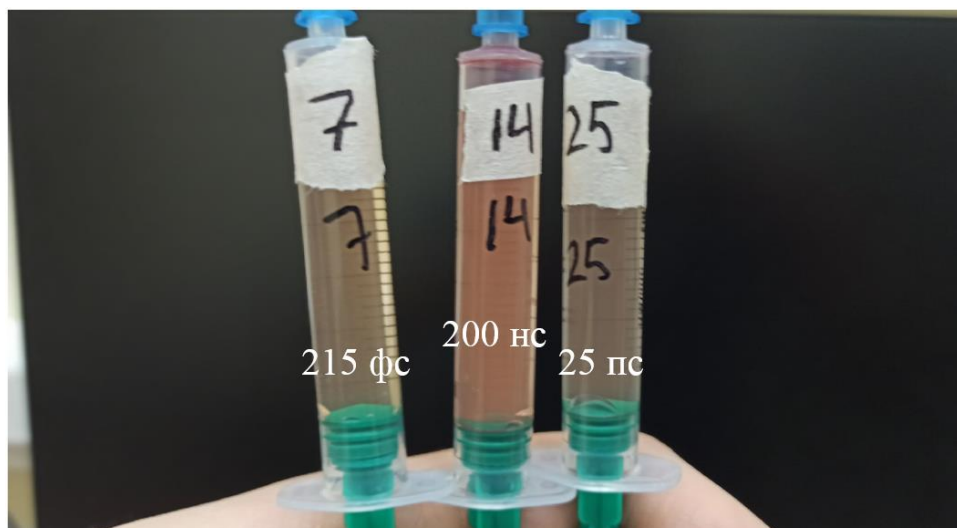


Рисунок 2.2 – Внешний вид коллоидных растворов селена, полученных на различных лазерных установках.

Что касается процесса их получения, особенности режимов заключаются в следующем. При использовании наносекундного и фемтосекундного лазеров кроме самих наноструктур на поверхности воды образуется также своеобразная селеновая плёнка. В случае фемтосекундного излучения она равномерно покрывает почти всю поверхность кюветы, а при наносекундном излучении (из-за высокой энергии в импульсе) — плавает в виде островковых фрагментов. Так как у пикосекундного излучения в нашей работе значительно более низкая частота, коллоидные растворы формировались равномернее, без плёнки.

2.3 Оптические свойства

Для всех полученных наноструктур селена были измерены спектры пропускания с помощью спектрофотометра СФ-56.

Спектры пропускания коллоидов, полученных на наносекундной установке с различной энергией в импульсе, представлены на Рисунке 2.3. Сканирование

проводилось с частотой 10 кГц по спирали 3 на 3 мм, в 4 прохода со скоростью 500 мм/с. Общая зависимость заключается в том, что при увеличении энергии в импульсе пропускание синтезируемого коллоида снижается (в след за Ayuyzhy et al. [104] сравнивается пропускание на длине волны 450 нм, см. внутренний график на Рисунке 2.3). Это связано с тем, что абляция происходит более активно при поглощении большей энергии, и концентрация коллоида повышается. Важно также отметить, что эта зависимость иногда нарушается. Данное явление не наблюдалось в предварительных экспериментах, где наноматериалы генерировались в один проход. Это означает, что скорее всего, излучение последующих проходов частично поглощаются частицами, сгенерированными предыдущими, и так как этот процесс вариативный и неконтролируемый, пропускание может несколько отличаться. Возможным решением данной неточности является использование кювет с прокачкой или магнитным перемешиванием [21, 97, 104].

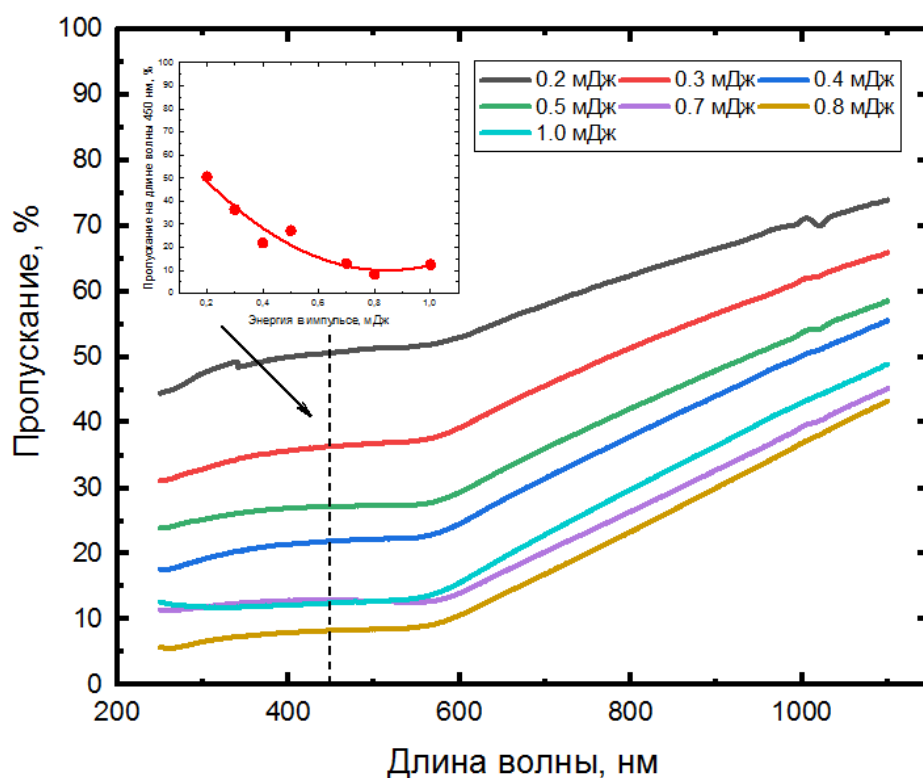


Рисунок 2.3 – Спектры пропускания коллоидных растворов, полученных на наносекундной лазерной установке, в зависимости от энергии в импульсе. **Слева сверху:** зависимость пропускания на длине волны 450 нм от энергии в импульсе.

Спектры пропускания коллоидов, полученных на пикосекундной установке, представлены на Рисунке 2.4. Сканирование проводилось змейкой 2 на 2 мм в течение 3 минут со скоростью 2 мм/с. Можно отметить, что форма спектров похожа на форму спектров структур, полученных на наносекундной установке, с чуть более сглаженной формой в ближней ИК области. Кроме того, видно, что при энергии импульса больше 1.7 мДж концентрация коллоидов достигает насыщения и практически не меняется.

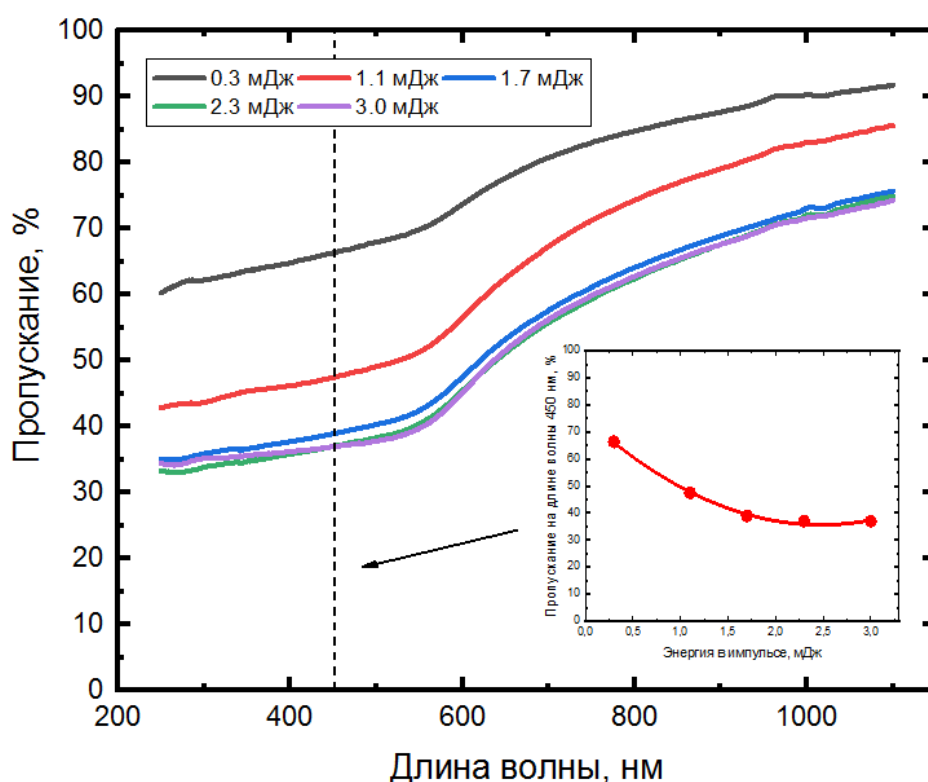


Рисунок 2.4 – Спектры пропускания коллоидных растворов, полученных на пикосекундной лазерной установке, в зависимости от энергии в импульсе.

Справа снизу: пропускание на длине волны 450 нм от энергии в импульсе.

Спектры пропускания коллоидов, полученных на фемтосекундной установке, представлены на Рисунке 2.5. Наноматериалы синтезировались с частотой 50 кГц аналогично пикосекундному излучению. Можно заметить, что данные спектры значительно отличаются от предыдущих. При увеличении энергии в импульсе нано- и пикосекундного излучения пропускание равномерно

уменьшается во всём световом диапазоне. В то же время для фемтосекундного излучения значительно меняется только УФ и видимая область, а пропускание в ИК области практически не меняется. Данное явление может указывать на различную фазу и свойства получаемых наноматериалов.

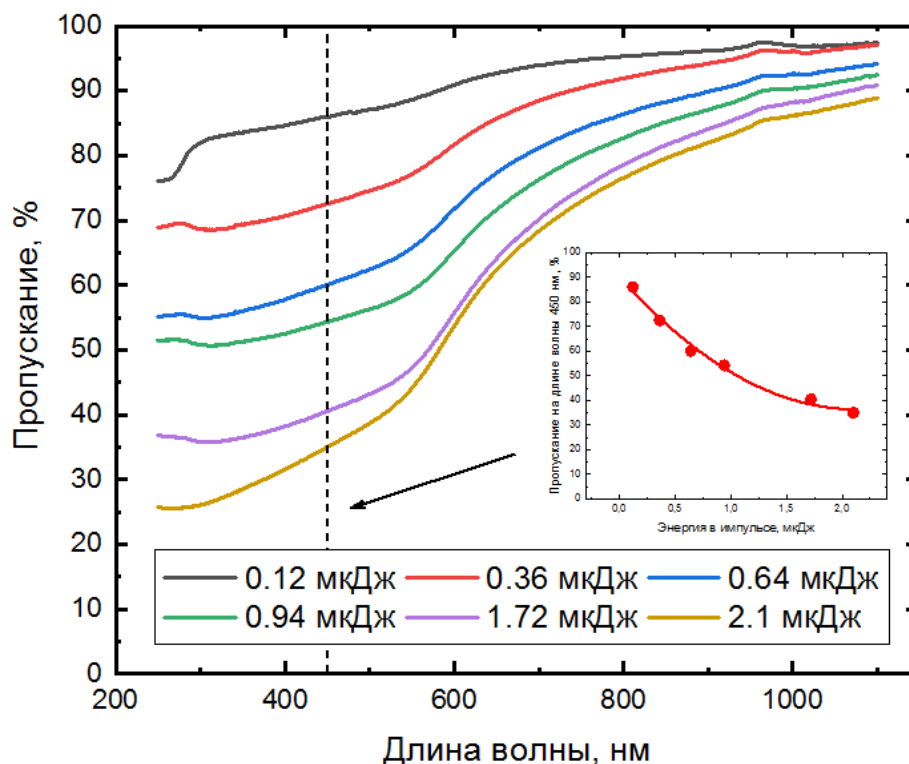


Рисунок 2.5 – Спектры пропускания коллоидных растворов, полученных на фемтосекундной лазерной установке, в зависимости от энергии в импульсе.
Справа снизу: пропускание на длине волны 450 нм от энергии в импульсе.

Так как условия эксперимента значительно отличаются в силу особенностей установок (различная методика сканирования, отличающиеся на порядки частота излучения и энергия в импульсе), все эксперименты проводились с изменением энергии в импульсе, чтобы получить коллоиды с разными концентрациями. Так как концентрация раствора может повлиять на его антибактериальные свойства, для их последующего сравнения представляет интерес выбрать различные режимы, обеспечивающие схожее пропускание. Для наглядности их спектры представлены на одном изображении на Рисунке 2.6.

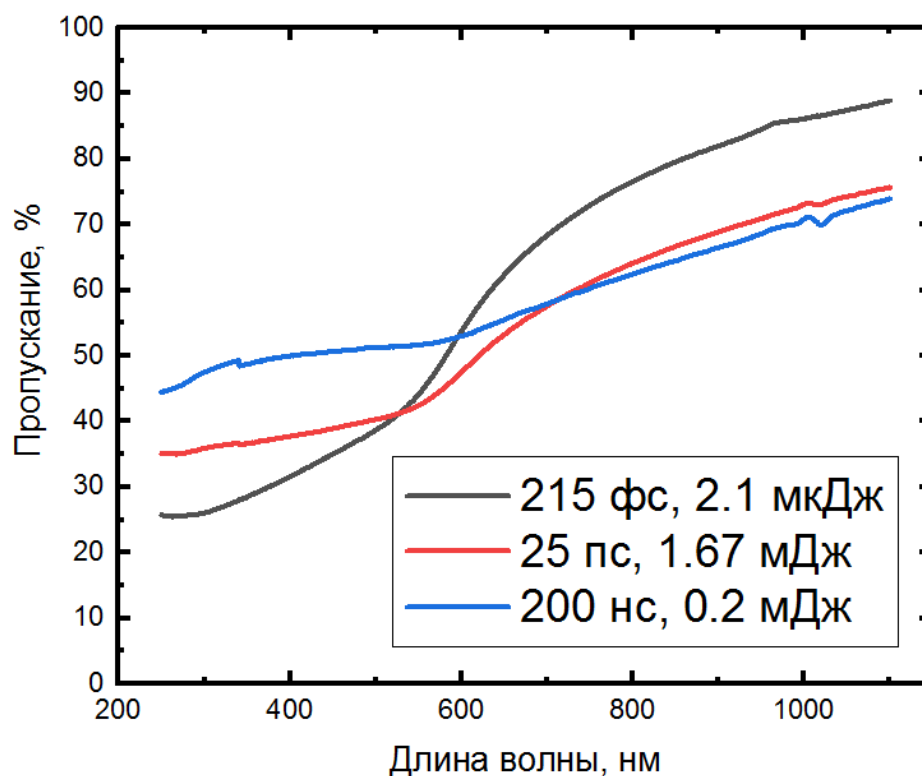


Рисунок 2.6 – Спектры пропускания коллоидных растворов, полученных на различных установках.

Можно увидеть, что форма спектра значительно зависит от длительности импульса лазерного излучения.

2.4 Морфология

В предварительном эксперименте коллоидный раствор, полученный на наносекундной установке со следующими параметрами: $\nu = 4$ кГц, $E_{\text{имп}} = 0.2$ мДж, $\nu = 200$ мм/с, был высушен на пластине кремния и исследован методом сканирующей электронной микроскопии (см. Рисунок 2.7).

Можно заметить, что характерный размер индивидуальных частиц составляет порядка 200-300 нм. Однако кроме привычных сферических наночастиц в коллоидах присутствуют также более сложные наноструктуры, которые можно назвать *нанокораллами*. Они достигают микронных размеров и имеют различные сложные формы. Структуры, напоминающие подобные, уже были представлены в литературе, в работе Ionin et al. [101].

Природа существования таких частиц может быть связана с явлением переконденсации, а также с небольшим количеством проходов в нашей работе. Так, Аууузху et al. указывают, что при формировании наноразмерного селена в неподвижной жидкости, полученные структуры обладают характерным размером 500–1700 нм, а чтобы получить из них привычные наноструктуры порядка 100–140 нм, авторы дополнительно фрагментируют коллоиды на протяжении длительного времени.

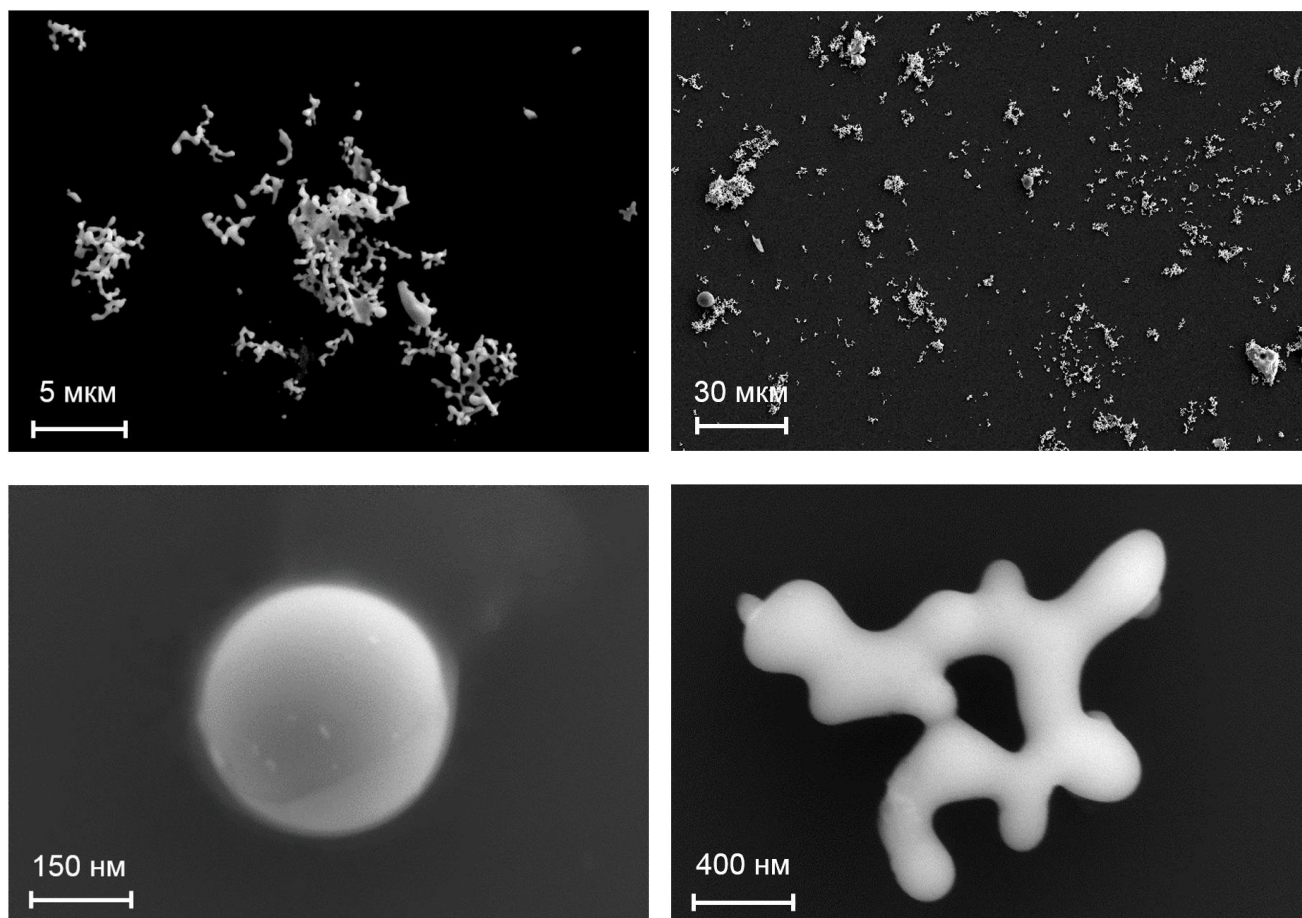


Рисунок 2.7 – СЭМ-снимки селеновых наноматериалов, полученных методом наносекундной лазерной абляции под слоем жидкости.

Чтобы более подробно изучить данное явление, СЭМ-снимки были также сделаны для всех исследуемых длительностей импульсов, описанных в предыдущем разделе. СЭМ-снимки для коллоидов, полученных на наносекундной установке ($\nu = 10$ кГц, $E_{\text{имп}} = 0.2$ мДж, $v = 500$ мм/с, 4 прохода) представлены на

Рисунке 2.8 вместе с их характерными размерами. Структура полученных наноматериалов схожа с предыдущим режимом. Фрагменты нанокораллов имеют ширину порядка 400–500 нм.

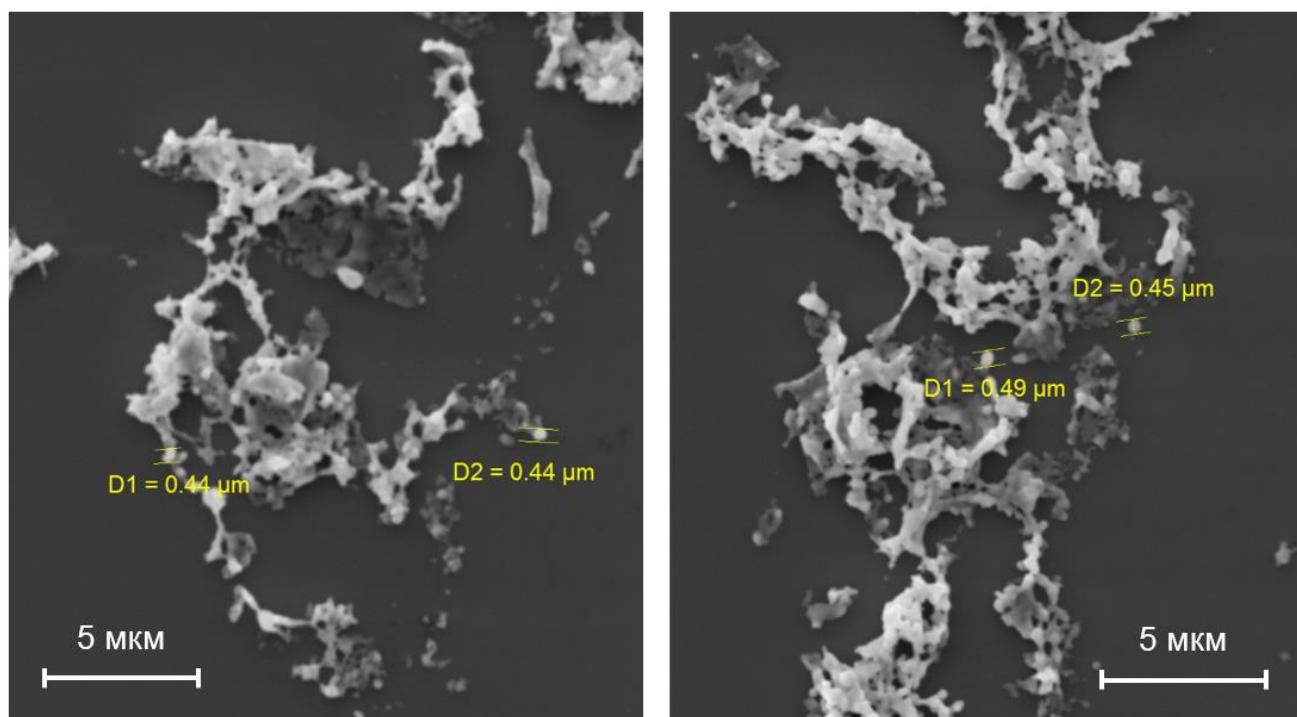


Рисунок 2.8 – СЭМ-снимки селеновых наноматериалов, полученных методом наносекундной лазерной абляции под слоем жидкости.

Как было указано в разделе 2.1, при формировании коллоидных растворов наносекундным лазерным излучением на поверхности коллоида формировалась заметная густая плёнка. Данная плёнка также была собрана и изучена методами сканирующей электронной микроскопии, полученные изображения представлены на Рисунке 2.9.

Любопытно отметить, что, наряду с уже отмеченными выше коралловидными структурами, в этой плёнке значительно больше сформированных сферических наночастиц, чем в самом коллоиде. По наиболее полно отразившим данные наночастицы изображениям была построена гистограмма диаметров наночастиц, представленная на Рисунке 2.10. Распределение размеров похоже на нормальное, с максимумом в диаметре 160 нм.

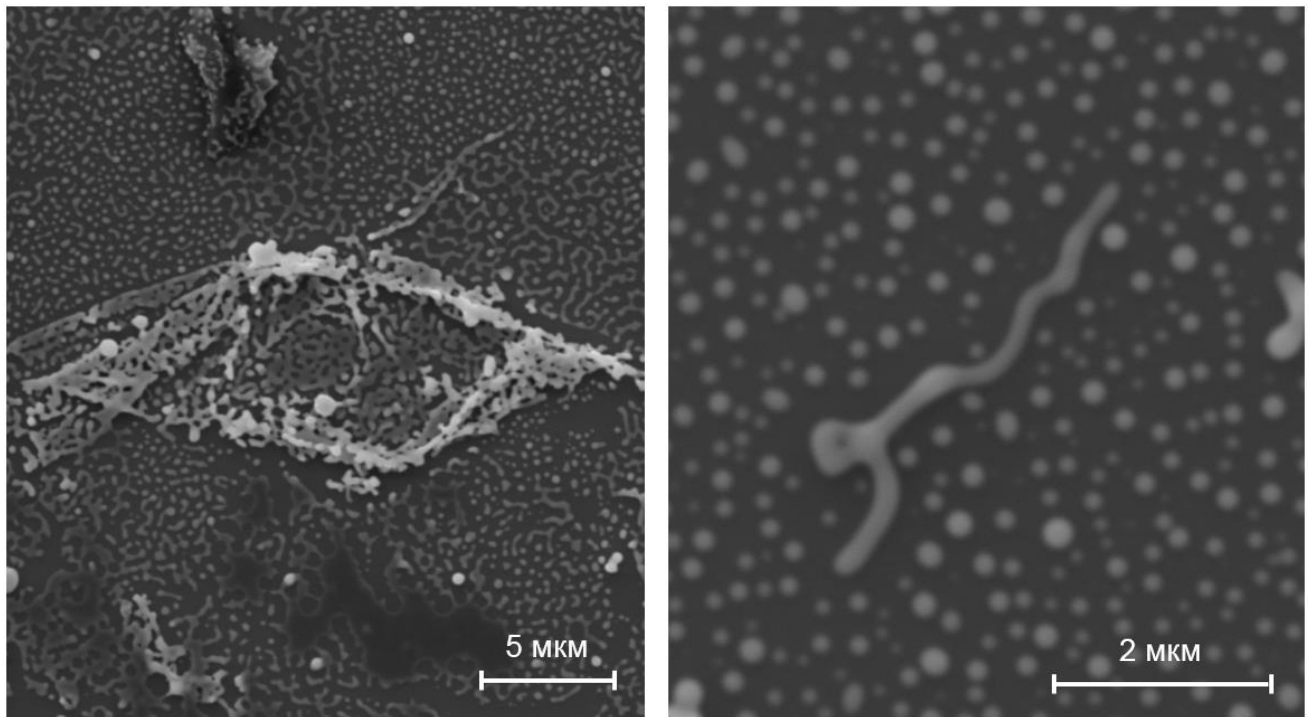


Рисунок 2.9 – СЭМ-снимки плёнки на поверхности коллоидного раствора селена, полученного методом наносекундной лазерной абляции под слоем жидкости.

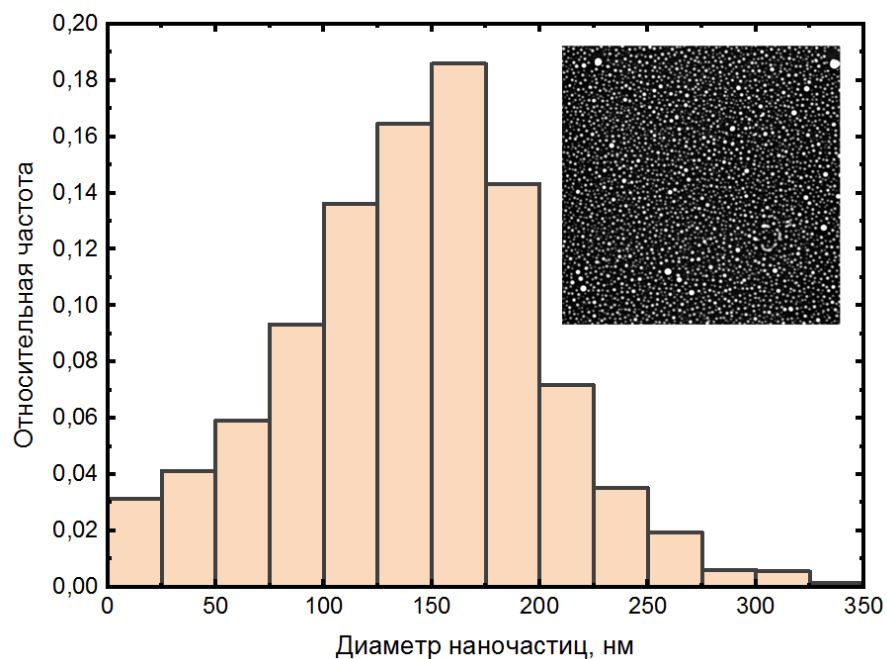


Рисунок 2.10 – Распределение диаметров наночастиц в плёнке на поверхности коллоидного раствора селена, полученного методом наносекундной лазерной абляции под слоем жидкости.

Справа сверху: СЭМ-снимок измеряемых наночастиц.

СЭМ-изображения наноструктур, полученных на пикосекундной установке ($\nu = 10$ Гц, $E_{\text{имп}} = 3$ мДж, $T = 3$ минуты), представлены на Рисунке 2.11. Можно отметить, что связанные структуры меньше, чем для наносекундного излучения, а также в коллоиде больше наночастиц. Данное обстоятельство может указывать на важность выбора частоты лазерного излучения при синтезе селеновых наноматериалов.

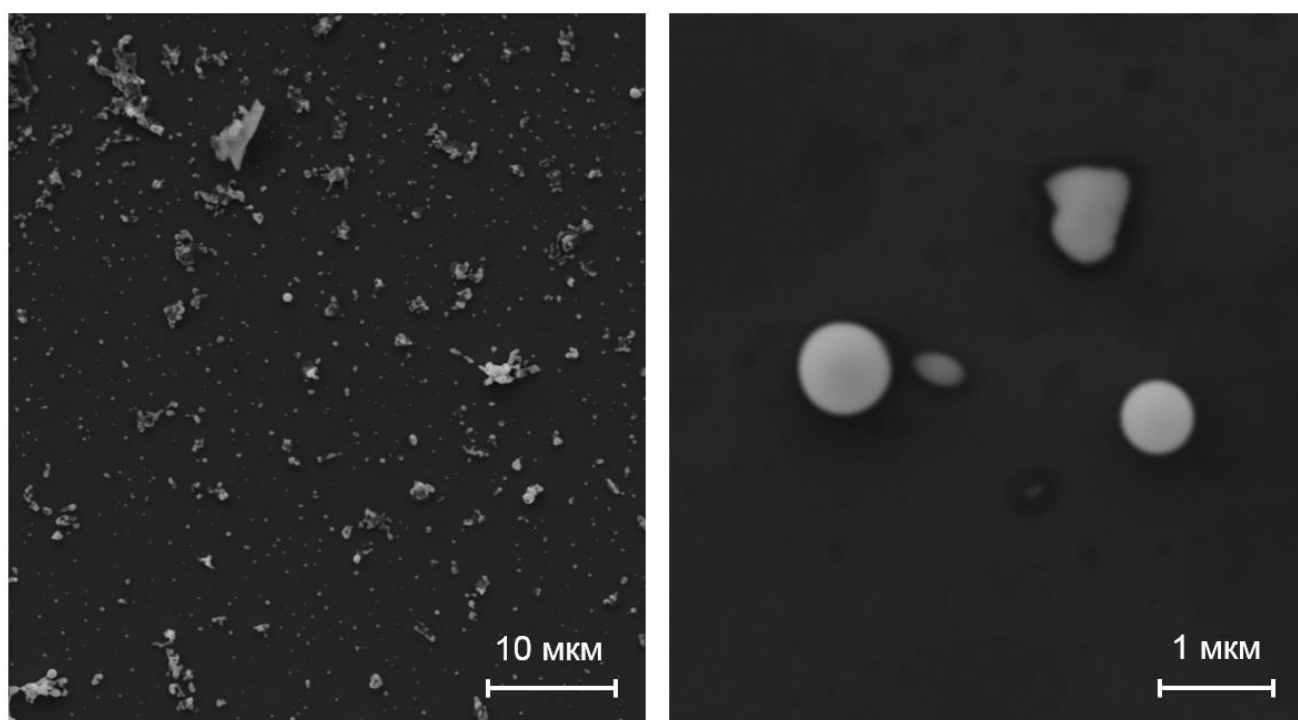


Рисунок 2.11 – СЭМ-снимки селеновых наноматериалов, полученных методом пикосекундной лазерной абляции под слоем жидкости.

Последними были получены СЭМ-снимки для наноматериалов, полученных на фемтосекундной лазерной установке ($\nu = 10$ кГц, $E_{\text{имп}} = 1$ мкДж, $T = 3$ минуты), они представлены на Рисунке 2.12. Данные наноструктуры похожи на наноструктуры, полученные на наносекундной установке, что, скорее всего, связано с одним порядком частоты. Типичная ширина элементов коралловидной структуры также составляет 300–500 нм, а сами структуры могут достигать десятков микрон. Обнаруженные отдельные наночастицы обладают размерами порядка 200–400 нм.

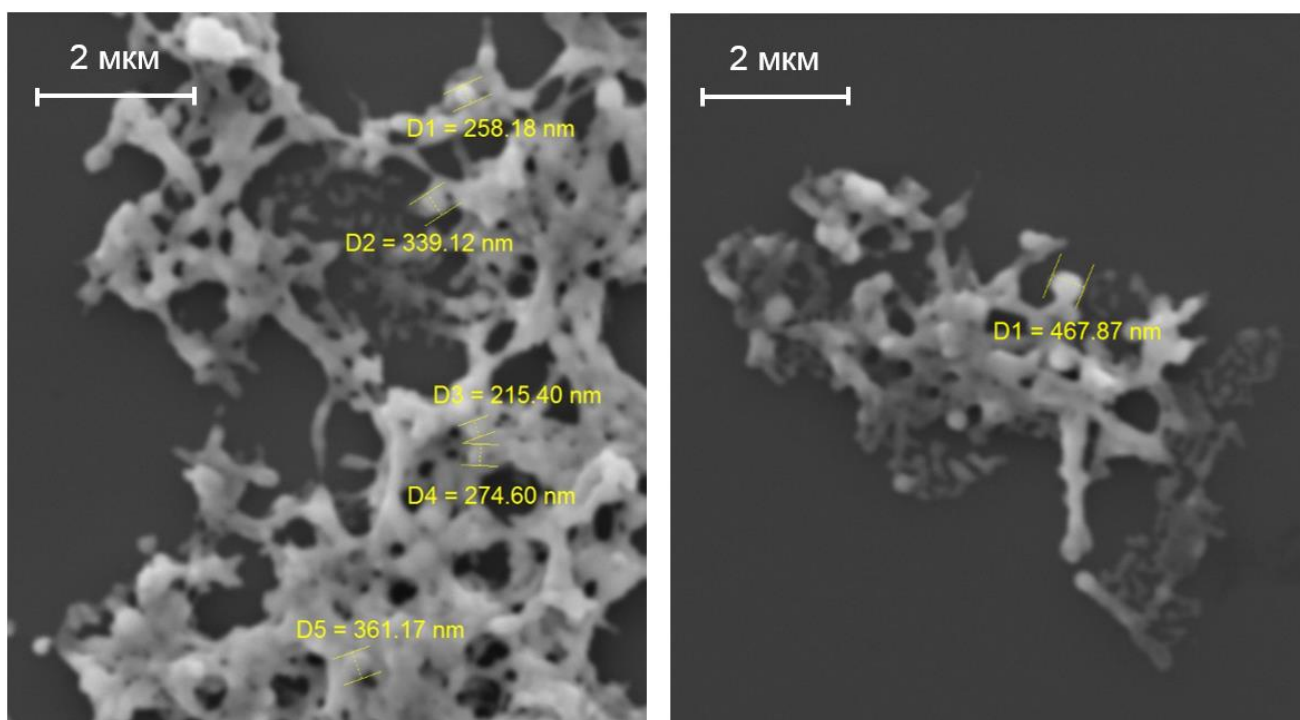


Рисунок 2.12 – СЭМ-снимки селеновых наноматериалов, полученных методом фемтосекундной лазерной абляции под слоем жидкости.

Сложная морфология синтезируемых наноструктур, а также формирование на поверхности некоторых коллоидов, селеновой плёнки, представляет большой интерес для дальнейших исследований.

2.5 Фазовый состав

Так как селен существует в различных фазах (аморфной и кристаллических) и так как спектры пропускания различных коллоидов указывают на различия в наноструктурах между ними, было проведено исследование фазового состава наиболее отличающихся коллоидов.

С данной целью были сделаны четыре коллоида: три с помощью наносекундной установки ($\nu = 10$ кГц, $v = 500$ мм/с, 1 проход, варьируемая энергия в импульсе) и один с помощью фемтосекундной установки ($\nu = 200$ кГц, $E_{\text{имп}} = 20$ мкДж, $v = 2$ мм/с, 1 проход). Результаты спектроскопии комбинационного рассеяния представлены на Рисунках 2.13 и 2.14.

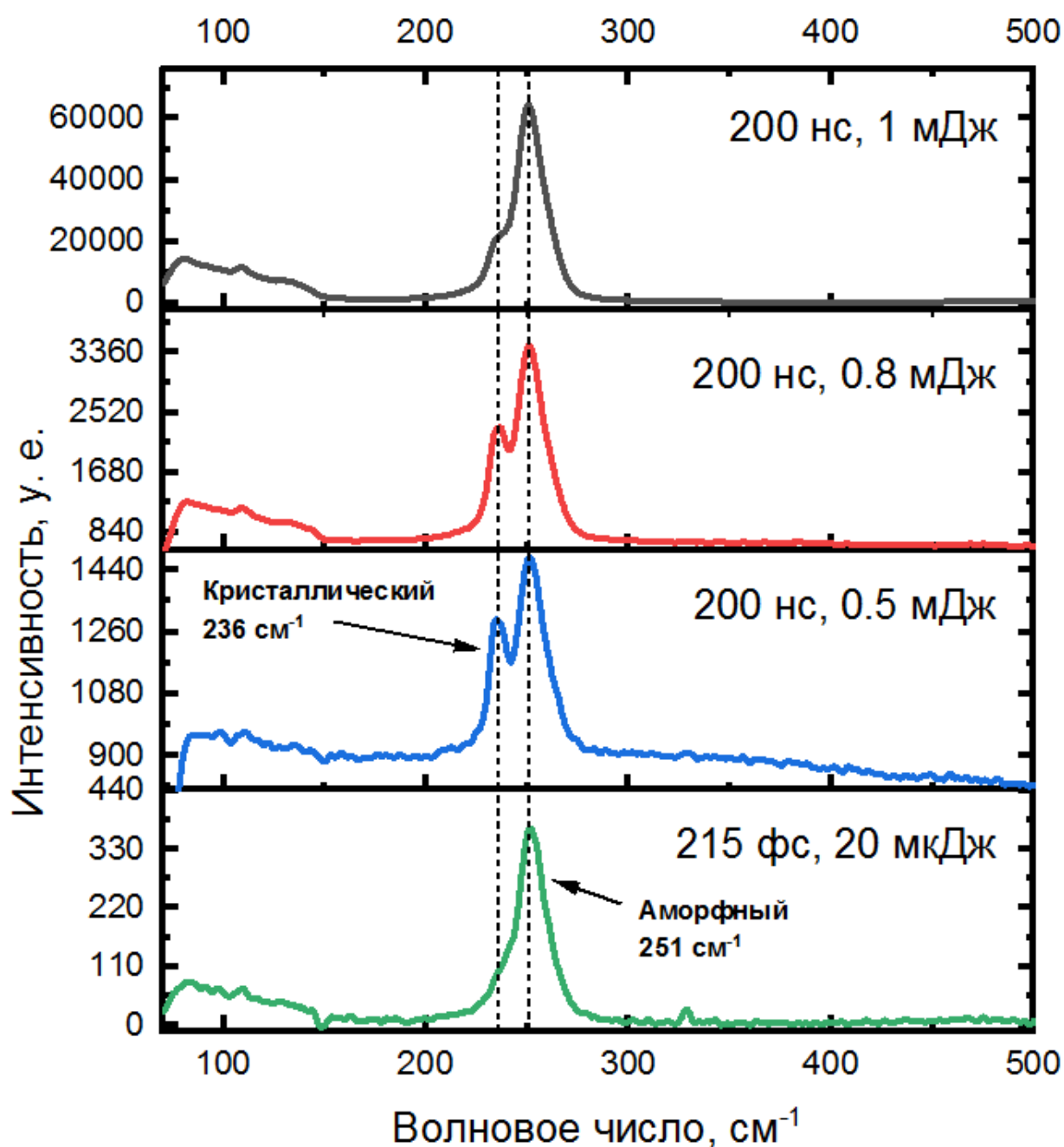


Рисунок 2.13 – Спектры комбинационного рассеяния для различных селеновых наноструктур.

Сложность снятия спектров комбинационного рассеяния для селена заключается в том, что при превышении определенной плотности мощности на образце отмечается фотокристаллизация [105], что приводит к изменению соотношения аморфной и кристаллической фазы. Из оригинальных спектров, представленных на Рисунке 2.13, было произведено вычитание локальной базовой линии и нормировка, обработанный результат представлен на Рисунке 2.14.

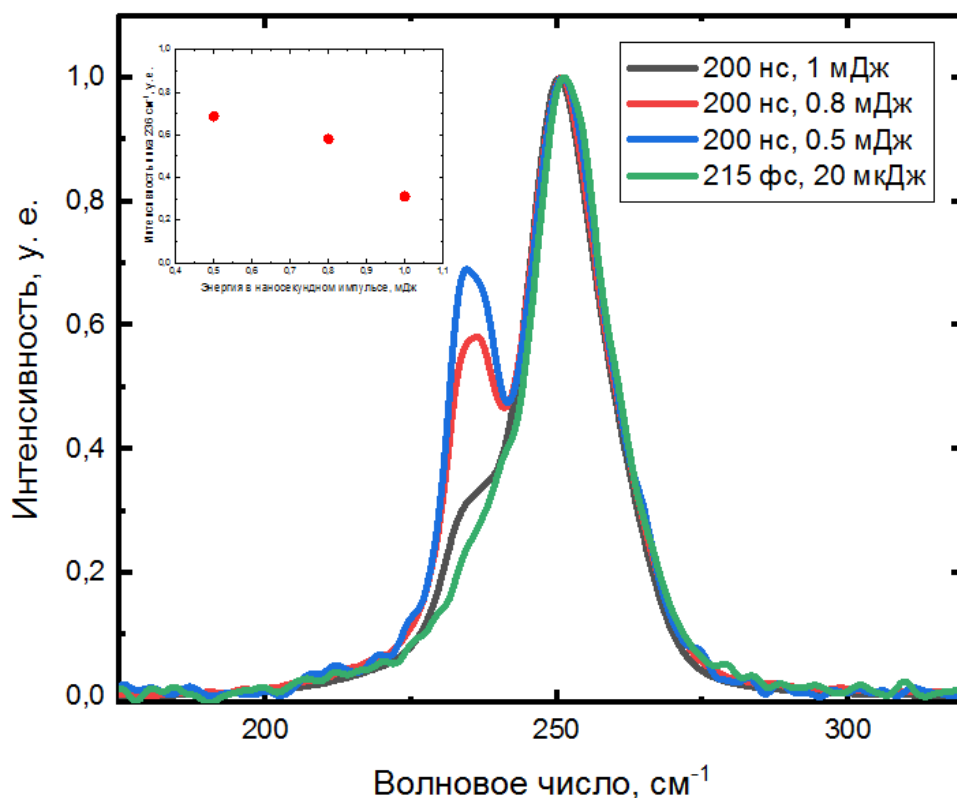


Рисунок 2.14 – Спектры комбинационного рассеяния для различных селеновых наноструктур. Слева сверху: зависимость интенсивности пика 236 см^{-1} от энергии в наносекундном импульсе.

На спектрах видно, что пик с центром 251 см^{-1} имеет гауссову форму, в то же время полоса с максимумом 236 см^{-1} является асимметричной и немного сдвигается. Данные пики принадлежат, соответственно, аморфному и кристаллическому селену [21].

Можно заметить, что наиболее аморфными фазами обладает селен, полученный абляцией фемтосекундным излучением, а также наиболее мощным наносекундным излучением. Преимущественное наличие аморфной фазы в коллоидном растворе, полученном наносекундным излучением, подтверждается его характерным красным цветом. В то же время кристаллическая фаза добавляется при уменьшении энергии в наносекундном лазере (см. внутренний график на Рисунке 2.14). Опираясь на статьи Guisbiers et al. [74] и Roldugin et al. [100], можно предположить, что данное отличие указывает на различные размеры синтезируемых наночастиц, которые при этом формируются с разной фазой.

2.6 Выводы

На основании проведённых экспериментов по синтезу коллоидных растворов селеновых наноматериалов, а также исследованию их свойств и морфологии можно сделать несколько важных выводов.

Во-первых, лазерная абляция под слоем жидкости представляется перспективной и гибкой технологией для получения наноструктур селена — коллоидные растворы были получены на всех установках, данный процесс не потребовал много ресурсов и времени.

Во-вторых, получаемые наноматериалы обладают сложной морфологией и не всегда представляют собой обычные сферические наночастицы, иногда они собираются в своего рода нанокораллы. Кроме того, для высокочастотного наносекундного и фемтосекундного излучения на поверхности воды формировалась плёнка: исследования морфологии данной плёнки для наносекундного излучения показали, что в ней больше сферических наночастиц.

В-третьих, на свойства получаемых коллоидов влияет не только энергия в импульсе и мощность, но также и длительность импульса. Из-за различных механизмов абляции длительность импульса влияет практически на все свойства коллоидного раствора и наноматериалов в нём: цвет, оптические свойства, фазовое соотношение. Коллоидные растворы, полученные с помощью низкочастотного пикосекундного излучения, практически не обладают характерным запахом селена, спектры пропускания, полученные на фемтосекундной лазерной установке, значительно отличаются от спектров коротких лазерных импульсов, а фазовый состав зависит от длительности импульса излучения и энергии в импульсе.

Соответственно, с помощью подбора правильного режима лазерного излучения возможно управление перечисленными параметрами.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА СЕЛЕНОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

На втором этапе работы исследовались антибактериальные свойства полученных коллоидных растворов наноструктур селена против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий. Данные исследования проходили при содействии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

В данный раздел входят:

1. Описание методологии проводимых антибактериальных тестов.
2. Исследование эффективности наноструктур селена, полученных на наносекундной лазерной установки, против широкого спектра бактерий диско-диффузионным методом.
3. Исследование их эффективности против бактерий группы ESKAPE методом определения минимальной ингибирующей концентрации.
4. Исследование эффективности наноструктур селена, полученных в различных режимах лазерного излучения, против штаммов бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* диско-диффузионным методом.
5. Анализ результатов и подведение выводов об антибактериальной эффективности синтезированных коллоидов.

3.1 Методология

Эксперименты на выявление антибактериальных свойств наноматериалов против определённых штаммов бактерий проводились двух типов. Перед всеми экспериментами исследуемый раствор проходил обработку в УЗ-ванной с целью предотвращения слипания и агломерации наноструктур.

Первый тип эксперимента — *диско-диффузионный метод (ДДМ)*. В данном эксперименте изучаемый штамм бактерии инокулируется на плотную питательную среду в чашке Петри. К питательным средам выдвигается важное требование,

закрывающееся в равномерности их слоя, для чего контролируется количество агара в чашке и горизонтальность поверхности. Инокулюм чаще всего наносится тампоном на питательную среду, образуя заметные на фотографиях характерные «разводы».

Изучаемый препарат наносится на агар на специальных бумажных дисках. Метод основан на способности препарата диффундировать в питательную среду, угнетая рост инокулированных микроорганизмов. Эффективность препарата оценивается обычно через сутки, измерение производится по диаметру зоны ингибирования. Чем больше зона подавления роста бактерий — тем более уязвим данный штамм к данному препарату.

Второй тип эксперимента — определение *минимальной ингибирующей концентрации (МИК)*. Его суть состоит в том, что препарат тестируется в разных концентрациях, и минимальная его концентрация, при которой появляется заметное ингибирование, регистрируется как МИК.

Обе данные методологии позволяют сравнивать как действие одного препарата на разные бактерии, так и действие разных препаратов на одни бактерии. Так как данный метод в любом случае подразумевает относительное сравнение, кроме отрицательного контроля (неингибированный рост бактерий) можно также ввести положительный контроль — известный, хорошо показывающий себя антибиотик.

3.2 Диско-диффузионный метод для различных бактерий

В предварительных экспериментах антибактериальное действие наноструктур селена проверялось против широкого спектра различных бактерий. Для этого были выбраны коллоидные растворы, полученные на наносекундной установке ($\nu = 4$ кГц, $E_{\text{имп}} = 0.2$ мДж, $v = 200$ мм/с). В качестве скрининга выступил диско-диффузный метод в силу его более простой технологической реализации.

Коллоидный раствор был протестирован против десяти различных бактерий, как грамположительных, так и грамотрицательных. Задачей данного эксперимента

было выявить бактерии, поддаваемые ингибированию селеном, поэтому в качестве меры считалось просто наличие или отсутствие зоны ингибирования. Результаты эксперимента представлены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Ингибирующий эффект наноструктур селена, полученных на наносекундной установке, против различных бактерий.

Грам	Название бактерии	Форма	Ингиб.
Положит.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Кокк	+
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Палочка	±
	<i>Bacillus subtilis</i>	Палочка	±
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Кокк	—
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Кокк	—
	<i>Enterococcus faecium</i>	Диплококк	—
Отрицат.	<i>Escherichia coli</i>	Палочка	—
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Палочка	—
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Палочка	—
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Диплококк	—

Можно заметить, что одна бактерия — золотистый стафилококк — продемонстрировала значительное ингибирование относительно контроля (см. Рисунок 3.1). Ещё на две — сенную палочку и дифтерийную коринебактерию — коллоиды оказали влияние, однако не сформировали такой заметной зоны подавления. Все эти бактерии — грамположительные, что подтверждает более эффективное подавление селеном именно грамположительных бактерий.

Что касается грамотрицательных бактерий, то ни на одной из них не было отмечено заметного ингибирования. Скорее всего, это связано с особенностями их оболочки и, возможно, её потенциалом. Согласно изученной литературе, это наиболее широкий спектр проверенных бактерий для наноструктур селена, полученных методом лазерной абляции под слоем жидкости.



Рисунок 3.1 – Зона ингибирования золотистого стафилококка коллоидным раствором наноструктур селена, полученных на наносекундной установке:

Sf – контроль, **Se** – селен.

3.3 Определение минимальной ингибирующей концентрации для различных бактерий

Для более подробного исследования антибактериального эффекта коллоидов наноструктур селена, полученных на наносекундной установке, были исследованы их минимальные ингибирующие концентрации.

В качестве целевой группы бактерий была выбрана группа ESKAPE. Название группы образовано из первых букв названий шести бактерий, входящих в неё: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*. Данная группа представляет особый интерес для изучения, так как она выделяет бактерии, наиболее подверженные развитию резистентности антибиотикам [106, 107].

В данном эксперименте применялся положительный контроль — антибиотик ципрофлоксацин, демонстрирующий антибактериальный эффект широкого спектра, включая бактерии ESKAPE [108]. Результаты эксперимента продемонстрированы в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Минимальная ингибирующая концентрация коллоидных растворов наноструктур селена, полученных на наносекундной лазерной установке, против различных бактерий и ципрофлоксацина.

Грам	Название бактерии	Форма	МИК антибиотик, мкг/мл	МИК селен, мкг/мл
+	<i>Enterococcus faecium</i>	Диплококк	0.3	> 5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Кокк	0.6	0.75
–	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Палочка	2.5	> 5
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Палочка	0.6	> 5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Палочка	1.25	> 5
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Палочка	1.25	> 5

Меньшее значение минимальной ингибирующей концентрации соответствует лучшей эффективности данного препарата. Можно заметить, что для всех грамотрицательных бактерий, а также для энтерококка, селеновые наноматериалы не демонстрируют ингибирующего эффекта. В то же время их эффект на золотистый стафилококк чрезвычайно силен и близок к эффекту антибиотика. Данные результаты вновь подтверждают устоявшееся в литературе мнение, что селеновые наноструктуры имеют значительный антибактериальный эффект именно на золотистый стафилококк, но не всегда справляются с грамотрицательными бактериями.

3.4 Диско-диффузионный метод для различных режимов излучения

Целью всех последующих экспериментов было сравнение антибактериального эффекта селеновых наноматериалов, полученных при различных режимах лазерного излучения. На основании результатов представленных выше экспериментов основным объектом исследования стали штаммы *Staphylococcus aureus* как наиболее перспективные с точки зрения ингибирования селеном и представляющие особую опасность с точки зрения резистентности.

В силу большого количества исследуемых режимов предпочтение было отдано диско-диффузионному методу благодаря его большей технологической простоте.

В первом эксперименте этой серии сравнивались наноструктуры, полученные наносекундным лазерным излучением и неизученным до этого пикосекундным. Наносекундные образцы были получены в режиме: $\nu = 10$ кГц, $\nu = 500$ мм/с, $E_{\text{имп}} = 1$ мДж, варьировалось количество проходов — 1, 2, 3 и 4. Пикосекундный образец был получен с энергией в импульсе $E_{\text{имп}} = 3$ мДж, наноструктуры синтезировались излучением в точку на протяжении 3 минут.

Все образцы вновь показали отрицательный результат против грамотрицательных *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*. В силу этого в дальнейших экспериментах в качестве референтной грамотрицательной бактерии использовалась только кишечная палочка. Результаты ингибирования золотистого стафилококка представлены в Таблице 3.3 и на Рисунке 3.2.

Таблица 3.3 – Диаметры зоны ингибирования золотистого стафилококка при различных режимах формирования селеновых наноматериалов.

Режим	200 нс				25 пс
	1 прох.	2 прох.	3 прох.	4 прох.	
Зона ингиб., мм	4	0	0	0	6

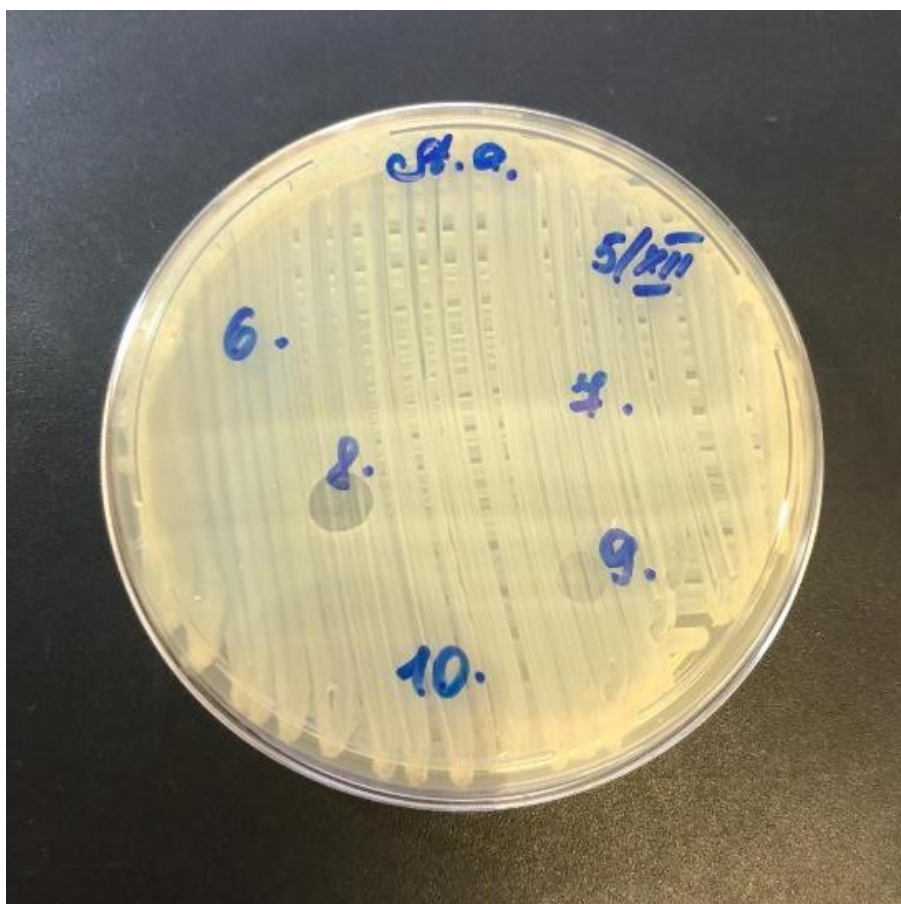


Рисунок 3.2 – Зоны ингибирования золотистого стафилококка селеновыми наноматериалами, полученными на (9) наносекундной и (8) пикосекундной установках.

Можно отметить следующие результаты. Наноструктуры, синтезированные пикосекундным излучением, показали более сильный антибактериальный эффект, что представляет значительный интерес. Вместе с тем наноструктуры, полученные на наносекундной установке, продемонстрировали антибактериальный эффект только после 1 прохода, но не при последующих проходах.

Данное явление может быть объяснено следующим. В данном эксперименте между синтезом наночастиц и тестированием их антибактериальных свойств прошёл значительный промежуток времени (около двух месяцев). Так как коллоиды были синтезированы в обычных кюветах без прокачки и хранились в обычных шприцах, они могли агломерироваться за время хранения. Возможно, повторные проходы меняют свойства наночастиц так, что делают их более

подверженными агломерации. Данный эффект представляет значительный интерес с точки зрения применения коллоидных растворов селена в реальных клинических условиях, поэтому требует в дальнейшем более подробного изучения.

Чтобы избежать возможного эффекта данного явления, был проведён дополнительный, самый полный эксперимент. Антибактериальный эффект тестировался для всех режимов, описанных в разделе 2.2 — семь коллоидов, полученных на наносекундной установке, пять коллоидов, полученных на пикосекундной установке и шесть коллоидов, полученных на фемтосекундной установке с варьируемой энергией в импульсе. Диско-диффузионные эксперименты были проведены в течение нескольких дней с момента синтеза коллоидов.

Внешний вид чашки Петри с золотистым стафилококком, ингибируемым различными коллоидами, представлен на Рисунке 3.3. Подробные значения диаметров зон ингибирования представлены в Таблице 3.4.

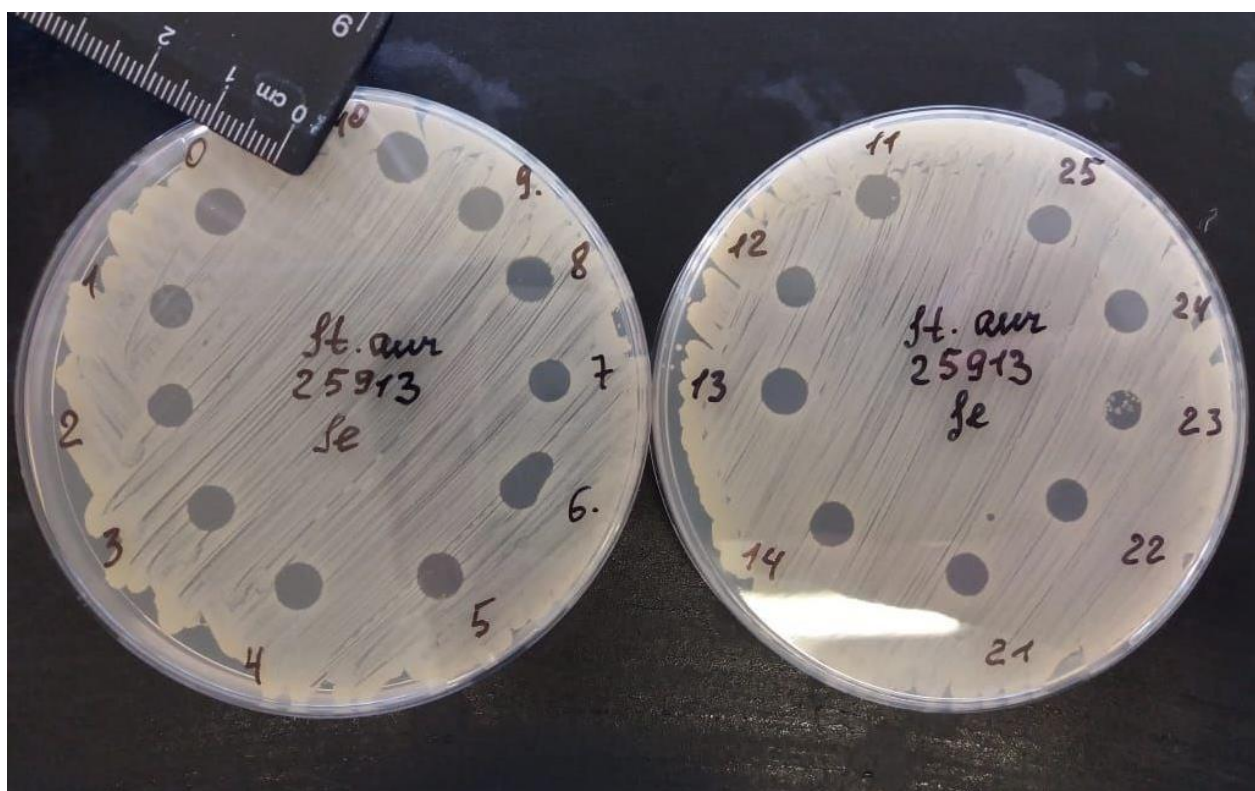


Рисунок 3.3 – Ингибирование золотистого стафилококка различными коллоидными растворами наноструктур селена через 1 сутки после контакта.

Таблица 3.4 – Диаметры зоны ингибирования золотистого стафилококка коллоидными растворами селеновых наноматериалов через 1 сутки и через 3 суток после контакта. Цветом выделены режимы, отмеченные в разделе 2.2 как имеющие схожее пропускание.

Режим		Диаметр зоны ингибирования через 1 сутки, мм	Диаметр зоны ингибирования через 3 суток, мм
200 нс	0.2 мДж	5.9	7
	0.3 мДж	5.8	6.3
	0.4 мДж	6.5	7.3
	0.5 мДж	5.8	6.6
	0.7 мДж	5.1	5.7
	0.8 мДж	6	6.8
	1.0 мДж	5.5	6.5
25 пс	0.3 мДж	5.7	6.2
	1.1 мДж	5.4	6.1
	1.7 мДж	5.0	5.5
	2.3 мДж	5.6	6.6
	3.0 мДж	5.1	5.7
215 фс	0.12 мкДж	5.6	5.9
	0.36 мкДж	5.9	6.3
	0.64 мкДж	6.3	6.6
	0.94 мкДж	6.1	6.6
	1.72 мкДж	5.7	5.8
	2.10 мкДж	5.6	5.8

Можно заметить, что все значения диаметров схожи — все коллоидные растворы ингибируют золотистый стафилококк приблизительно одинаково. Учитывая точность измерения диаметров, не приходится говорить о каких-то

непосредственных зависимостях. Через трое суток все значения диаметров увеличились, для фемтосекундных образцов чуть меньше, чем для наносекундных и пикосекундных. Данный эксперимент подтверждает, что коллоидные растворы селеновых наноматериалов, полученные на любой длительности импульса, способны ингибировать рост бактерий *Staphylococcus aureus*.

Тестирование всех образцов на штамме *Escherichia coli* вновь продемонстрировало неспособность селеновых наноматериалов ингибировать данную культуру (см. Рисунок 3.4).

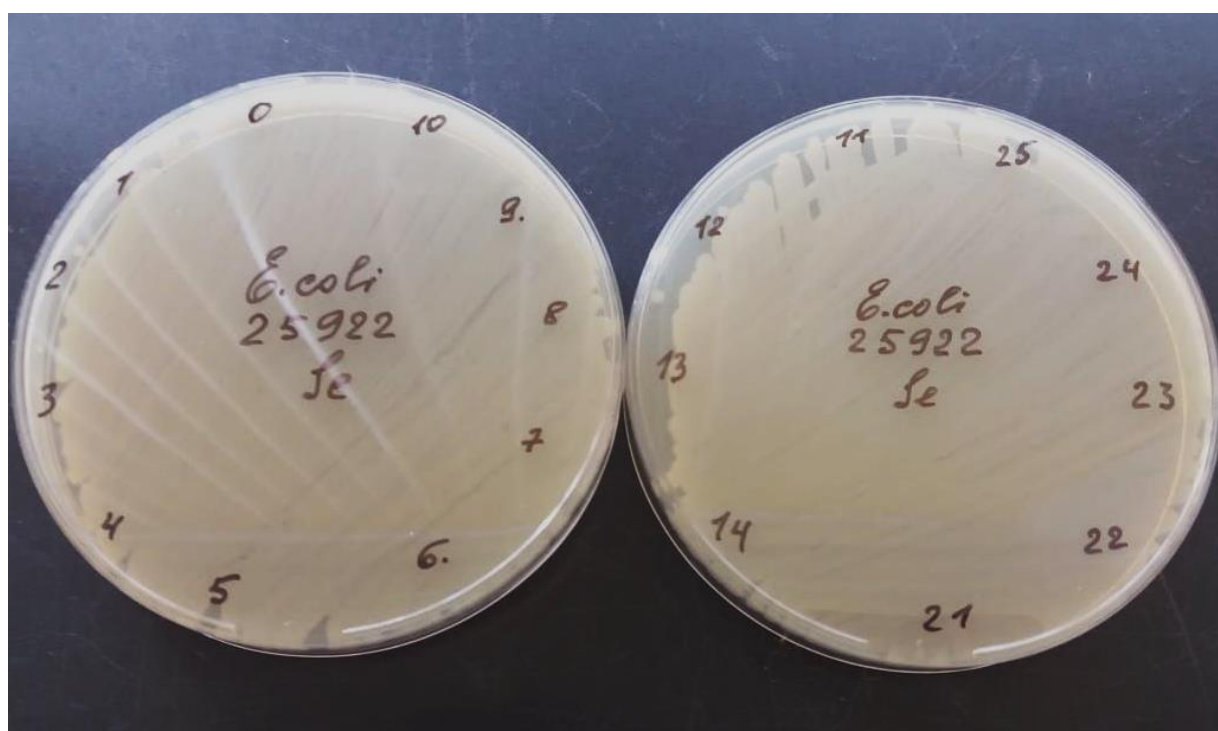


Рисунок 3.4 – Отсутствие ингибирования кишечной палочки различными коллоидными растворами наноструктур селена через 1 сутки после контакта.

3.5 Выводы

Проведённые эксперименты позволяют сделать несколько важных выводов об антибактериальных свойствах полученных коллоидов:

Во-первых, наноструктуры селена демонстрируют отличные антибактериальные свойства против золотистого стафилококка (близкие к антибиотикам), а также потенциально могут иметь эффект на другие

грамположительные бактерии. В то же время грамотрицательные бактерии ни разу не показали реакции в рамках наших экспериментов.

Во-вторых, антибактериальные свойства проявляются для коллоидных растворов, полученных на всех лазерных установках, что обеспечивает широкую применимость и универсальность данного метода.

В-третьих, результат взаимодействия коллоида и бактерий потенциально зависит от возраста коллоида и от условий его хранения. Данное явление требует более подробного исследования и особого внимания при постановке эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время медицина не стоит на месте, подвергается множеству испытаний и активно развивается. Человечество живёт в вечной гонке с бактериями — они вырабатывают устойчивость к антибиотикам, которые со временем становятся менее эффективными. Одной из перспективных альтернатив антибиотикам являются наночастицы металлов, оксидов и полупроводников. Они имеют значительный антибактериальный потенциал и под частую менее токсичны для человека. Среди самых перспективных наноматериалов — селен, демонстрирующий антибактериальный, антигрибковый и антипаразитарный эффекты, но при этом не являющийся токсичным.

В данной работе было проведено исследование применения коллоидных растворов селеновых наноматериалов, полученных с помощью метода лазерной абляции под слоем жидкости, для подавления патогенных бактерий. Были исследованы процесс генерации коллоидов, морфология получаемых наноструктур и их антибактериальные свойства.

Коллоиды были синтезированы на трёх лазерных установках: с нано-, пико- и фемтосекундной длительностью импульса, что позволило впервые сравнить все эти режимы для данной задачи в одной работе. Для всех режимов генерации процесс не занял много времени и представляется перспективным с точки зрения технико-экономических показателей, химической и экологической чистоты.

Морфология и свойства полученных растворов и наноструктур в них были подробно изучены. Следует отметить, что выбор длительности импульса и частоты играет в их разнообразии значительную роль. Получаемые коллоиды отличаются цветом, наличием растворенных в коллоидах газов и оптическими свойствами: так, спектры пропускания коллоидов, полученных на фемтосекундной установке, визуально отличаются от остальных. Что касается самих наноструктур, про них можно сказать следующее. Во-первых, они обладают сложной морфологией: кроме сферических наночастиц, встречаются протяжённые связанные «нанокораллы» микронных размеров. Во-вторых, они отличаются фазой, от аморфной до

кристаллической, и изменение параметров лазерного излучения позволяет контролировать данные изменения.

Антибактериальные тесты показали потенциал селеновых коллоидов против грамположительных бактерий, в частности — отличный эффект на золотистый стафилококк (сравнимый с эффектом антибиотика), однако показали и их неприменимость для грамотрицательных бактерий. Что особенно ценно — золотистый стафилококк ингибируется одинаково хорошо коллоидами с разной длительностью импульса. Импульсы в десятки пикосекунд используются в данной задаче впервые: и для получения наноструктур селена, и для тестирования их антибактериальных свойств. Важно отметить, что на антибактериальные свойства коллоидов могут оказывать влияние такие технические детали, как время и способ хранения. Использование кювет с прокачкой, магнитного перемешивания и центрифуг может позволить избежать нежелательных последствий в виде агломерации наночастиц.

На пересечении биологии и физики лежит потенциал кардинально изменить медицину, и хочется верить, что активные исследования в области лазерных биомедицинских технологий внесут в это изменение свой вклад.

Автор работы хотел бы выразить благодарность:

1. Междисциплинарному ресурсному центру по направлению «Нанотехнологии» Санкт-Петербургского Государственного Университета и, в частности, Калганову Владимиру Дмитриевичу — за проведение измерений на сканирующем электронном микроскопе.
2. Международному научному центру Растворной химии передовых материалов и технологий Университета ИТМО и, в частности, Назаровой Елене Александровне и Анастасовой Елизавете Ярославне — за проведение измерений на сканирующем электронном микроскопе.
3. Ресурсному центру «Оптические и лазерные методы исследования вещества» Санкт-Петербургского Государственного Университета и, в

частности, Панькину Дмитрию Васильевичу — за проведение спектроскопии комбинационного рассеяния.

4. Санкт-Петербургскому научно-исследовательскому институту эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и, в частности, доктору медицинских наук, заведующей лабораторией медицинской бактериологии Краевой Людмиле Александровне — за проведение экспериментов по определению антибактериальных свойств образцов и рецензирование работы.
5. Кандидату технических наук, доценту кафедры радиотехнической электроники Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета Смирнову Артему Анатольевичу — за рецензирование работы.

И особенно научному руководителю, кандидату технических наук, ассистенту факультета лазерной фотоники и оптоэлектроники Самохвалову Андрею Александровичу — за помощь в выполнении всех этапов работы, многочисленные консультации по различным теоретическим вопросам и три года научного руководства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McKibbin W. J., Fernando R. The global macroeconomic impacts of COVID-19: Seven scenarios // – 2020.
2. Bradbury-Jones C., Isham L. The pandemic paradox: the consequences of COVID-19 on domestic violence // Journal of clinical nursing. – 2020.
3. Galea S., Merchant R. M., Lurie N. The mental health consequences of COVID-19 and physical distancing: The need for prevention and early intervention // JAMA internal medicine. – 2020.
4. Mustajab D., Bauw A., Rasyid A., Irawan A., Akbar M. A., Hamid M. A. Working From Home Phenomenon As an Effort to Prevent COVID-19 Attacks and Its Impacts on Work Productivity // TIJAB (The International Journal of Applied Business). – 2020. – Т. 4, № 1. – С. 13-21.
5. Omary M. B., Eswaraka J., Kimball S. D., Moghe P. V., Panettieri R. A., Scotto K. W. The COVID-19 pandemic and research shutdown: staying safe and productive // The Journal of clinical investigation. – 2020. – Т. 130, № 6.
6. Kandel N., Chungong S., Omaar A., Xing J. Health security capacities in the context of COVID-19 outbreak: an analysis of International Health Regulations annual report data from 182 countries // The Lancet. – 2020.
7. Yuen K.-S., Ye Z.-W., Fung S.-Y., Chan C.-P., Jin D.-Y. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions // Cell & bioscience. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 1-5.
8. Nesse R. M., Stearns S. C. The great opportunity: evolutionary applications to medicine and public health // Evolutionary Applications. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 28-48.
9. Duployez C., Le Guern R., Tinez C., Lejeune A.-L., Robriquet L., Six S., Loiez C., Wallet F. Panton-Valentine Leukocidin-Secreting Staphylococcus aureus Pneumonia Complicating COVID-19 // Emerging Infectious Diseases. – 2020. – Т. 26, № 8.
10. Prüss A., Kay D., Fewtrell L., Bartram J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level // Environmental health perspectives. – 2002. – Т. 110, № 5. – С. 537-542.

11. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* // *British journal of experimental pathology*. – 1929. – T. 10, № 3. – C. 226.
12. Adedeji W. The treasure called antibiotics // *Annals of Ibadan postgraduate medicine*. – 2016. – T. 14, № 2. – C. 56.
13. Yılmaz Ç., Özcengiz G. Antibiotics: pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps // *Biochemical pharmacology*. – 2017. – T. 133. – C. 43-62.
14. Rouveix B. Antibiotic safety assessment // *International journal of antimicrobial agents*. – 2003. – T. 21, № 3. – C. 215-221.
15. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2010. – T. 74, № 3. – C. 417-433.
16. Khan S. N., Khan A. U. Breaking the spell: combating multidrug resistant ‘superbugs’ // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – T. 7. – C. 174.
17. Ren G., Hu D., Cheng E. W., Vargas-Reus M. A., Reip P., Allaker R. P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications // *International journal of antimicrobial agents*. – 2009. – T. 33, № 6. – C. 587-590.
18. Slavin Y. N., Asnis J., Häfeli U. O., Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity // *Journal of nanobiotechnology*. – 2017. – T. 15, № 1. – C. 65.
19. Huang T., Holden J. A., Heath D. E., O'Brien-Simpson N. M., O'Connor A. J. Engineering highly effective antimicrobial selenium nanoparticles through control of particle size // *Nanoscale*. – 2019. – T. 11, № 31. – C. 14937-14951.
20. Tan V. I. C., Hinchman A., Williams R., Tran P. A., Fox K. Nanostructured biomedical selenium at the biological interface // *Biointerphases*. – 2018. – T. 13, № 6. – C. 06D301.
21. Van Overschelde O., Guisbiers G., Snyders R. Green synthesis of selenium nanoparticles by excimer pulsed laser ablation in water // *Apl Materials*. – 2013. – T. 1, № 4. – C. 042114.
22. McFall-Ngai M. Care for the community // *Nature*. – 2007. – T. 445, № 7124. – C. 153-153.

23. Brown L., Wolf J. M., Prados-Rosales R., Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – T. 13, № 10. – C. 620-630.
24. Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians // *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. – 2017. – T. 33, № 3. – C. 300.
25. Yoneyama H., Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2006. – T. 70, № 5. – C. 1060-1075.
26. Lagacé-Wiens P., Rubinstein E. Adverse reactions to β -lactam antimicrobials // *Expert opinion on drug safety*. – 2012. – T. 11, № 3. – C. 381-399.
27. Arkaravichien PhD W. Cefazolin induced seizures in hemodialysis patients // *J Med Assoc Thai*. – 2006. – T. 89, № 11. – C. 1981-3.
28. Stefano G. B., Samuel J., Kream R. M. Antibiotics may trigger mitochondrial dysfunction inducing psychiatric disorders // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2017. – T. 23. – C. 101.
29. Heta S., Robo I. The side effects of the most commonly used group of antibiotics in periodontal treatments // *Medical Sciences*. – 2018. – T. 6, № 1. – C. 6.
30. Eliopoulos G. M., Blázquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance // *Clinical infectious diseases*. – 2003. – T. 37, № 9. – C. 1201-1209.
31. Huh A. J., Kwon Y. J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era // *Journal of controlled release*. – 2011. – T. 156, № 2. – C. 128-145.
32. Czaplewski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V. A., Foster S., Gilmore B. F., Hancock R. E., Harper D. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review // *The Lancet infectious diseases*. – 2016. – T. 16, № 2. – C. 239-251.
33. Ghosh C., Sarkar P., Issa R., Haldar J. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance // *Trends in microbiology*. – 2019.

34. Kenny C., Furey A., Lucey B. A post-antibiotic era looms: can plant natural product research fill the void? // *British journal of biomedical science*. – 2015. – T. 72, № 4. – C. 191-200.
35. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future // *International journal of nanomedicine*. – 2017. – T. 12. – C. 1227.
36. Mühling M., Bradford A., Readman J. W., Somerfield P. J., Handy R. D. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment // *Marine environmental research*. – 2009. – T. 68, № 5. – C. 278-283.
37. Klasen H. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver // *Burns*. – 2000. – T. 26, № 2. – C. 131-138.
38. Dibrov P., Dzioba J., Gosink K. K., Häse C. C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2002. – T. 46, № 8. – C. 2668-2670.
39. Salomoni R., Léo P., Montemor A., Rinaldi B., Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa* // *Nanotechnology, science and applications*. – 2017. – T. 10. – C. 115.
40. AshaRani P., Low Kah Mun G., Hande M. P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // *ACS nano*. – 2009. – T. 3, № 2. – C. 279-290.
41. Drake P. L., Hazelwood K. J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review // *The Annals of occupational hygiene*. – 2005. – T. 49, № 7. – C. 575-585.
42. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N. H. M., Ann L. C., Bakhori S. K. M., Hasan H., Mohamad D. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism // *Nano-Micro Letters*. – 2015. – T. 7, № 3. – C. 219-242.
43. Wang Z. L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications // *Journal of physics: condensed matter*. – 2004. – T. 16, № 25. – C. R829.

44. Yahya N., Daud H., Tajuddin N. A., Daud H. M., Shafie A., Puspitasari P. Application of ZnO nanoparticles EM wave detector prepared by sol-gel and self-combustion techniques // *Journal of Nano Research*. – T. 11 –Trans Tech Publ, 2010. – C. 25-34.
45. de Souza R. C., Haberbeck L. U., Riella H. G., Ribeiro D. H. B., Carciofi B. A. M. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by solochemical process // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. – 2019. – T. 36, № 2. – C. 885-893.
46. Mahdy S. A., Mohammed W. H., Emad H., Kareem H. A., Shamel R., Mahdi S. The antibacterial activity of TiO₂ nanoparticles // *Journal of University of Babylon*. – 2017. – T. 25, № 3. – C. 955-961.
47. Hamal D. B., Haggstrom J. A., Marchin G. L., Ikenberry M. A., Hohn K., Klabunde K. J. A multifunctional biocide/sporocide and photocatalyst based on titanium dioxide (TiO₂) codoped with silver, carbon, and sulfur // *Langmuir*. – 2010. – T. 26, № 4. – C. 2805-2810.
48. Abdel-Raouf N., Al-Enazi N. M., Ibraheem I. B. Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2017. – T. 10. – C. S3029-S3039.
49. Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttagupta S. P., Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles // *Acta biomaterialia*. – 2008. – T. 4, № 3. – C. 707-716.
50. Şahin E., Musevi S. J., Aslani A. Antibacterial activity against *Escherichia coli* and characterization of ZnO and ZnO–Al₂O₃ mixed oxide nanoparticles // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2017. – T. 10. – C. S230-S235.
51. Tan L. C., Nancharaiah Y. V., van Hullebusch E. D., Lens P. N. Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies // *Biotechnology advances*. – 2016. – T. 34, № 5. – C. 886-907.
52. Nancharaiah Y. V., Lens P. Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2015. – T. 79, № 1. – C. 61-80.
53. Nancharaiah Y. V., Lens P. N. Selenium biomineralization for biotechnological applications // *Trends in biotechnology*. – 2015. – T. 33, № 6. – C. 323-330.

54. Rayman M. P. Selenium and human health // *The Lancet*. – 2012. – T. 379, № 9822. – C. 1256-1268.

55. Zimmerman M. T., Bayse C. A., Ramoutar R. R., Brumaghim J. L. Sulfur and selenium antioxidants: Challenging radical scavenging mechanisms and developing structure–activity relationships based on metal binding // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2015. – T. 145. – C. 30-40.

56. Brozmanová J., Mániková D., Vlčková V., Chovanec M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer // *Archives of toxicology*. – 2010. – T. 84, № 12. – C. 919-938.

57. Brown K. M., Arthur J. Selenium, selenoproteins and human health: a review // *Public health nutrition*. – 2001. – T. 4, № 2b. – C. 593-599.

58. Zhang Z., Zhang J., Xiao J. Selenoproteins and selenium status in bone physiology and pathology // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2014. – T. 1840, № 11. – C. 3246-3256.

59. White P. J., Broadley M. R., Gregory P. J. Managing the nutrition of plants and people // *Applied and Environmental Soil Science*. – 2012. – T. 2012.

60. Bhattacharjee A., Basu A., Biswas J., Sen T., Bhattacharya S. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2017. – T. 424, № 1-2. – C. 13-33.

61. Kong L., Yuan Q., Zhu H., Li Y., Guo Q., Wang Q., Bi X., Gao X. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis // *Biomaterials*. – 2011. – T. 32, № 27. – C. 6515-6522.

62. Shakibaie M., Mohazab N. S., Mousavi S. A. A. Antifungal activity of selenium nanoparticles synthesized by *Bacillus* species Msh-1 against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* // *Jundishapur journal of microbiology*. – 2015. – T. 8, № 9.

63. Guisbiers G., Lara H. H., Mendoza-Cruz R., Naranjo G., Vincent B. A., Peralta X. G., Nash K. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by pure selenium nanoparticles

synthesized by pulsed laser ablation in liquids // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2017. – T. 13, № 3. – C. 1095-1103.

64. Beheshti N., Soflaei S., Shakibaie M., Yazdi M. H., Ghaffarifar F., Dalimi A., Shahverdi A. R. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: in vitro and in vivo studies // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2013. – T. 27, № 3. – C. 203-207.

65. Mahmoudvand H., Shakibaie M., Tavakoli R., Jahanbakhsh S., Sharifi I. In vitro study of leishmanicidal activity of biogenic selenium nanoparticles against Iranian isolate of sensitive and glucantime-resistant *Leishmania tropica* // *Iranian journal of parasitology*. – 2014. – T. 9, № 4. – C. 452.

66. Soflaei S., Dalimi A., Abdoli A., Kamali M., Nasiri V., Shakibaie M., Tat M. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on *Leishmania infantum* // *Comparative Clinical Pathology*. – 2014. – T. 23, № 1. – C. 15-20.

67. Tran P. A., Sarin L., Hurt R. H., Webster T. J. Titanium surfaces with adherent selenium nanoclusters as a novel anticancer orthopedic material // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2010. – T. 93, № 4. – C. 1417-1428.

68. Chen Q., Yu Q., Liu Y., Bhavsar D., Yang L., Ren X., Sun D., Zheng W., Liu J., Chen L.-m. Multifunctional selenium nanoparticles: chiral selectivity of delivering MDR-siRNA for reversal of multidrug resistance and real-time biofluorescence imaging // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2015. – T. 11, № 7. – C. 1773-1784.

69. Biswas D. P., O'Brien-Simpson N. M., Reynolds E. C., O'Connor A. J., Tran P. A. Comparative study of novel in situ decorated porous chitosan-selenium scaffolds and porous chitosan-silver scaffolds towards antimicrobial wound dressing application // *Journal of colloid and interface science*. – 2018. – T. 515. – C. 78-91.

70. Tran P. A., Webster T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – T. 6. – C. 1553.

71. Tran P. A., O'Brien-Simpson N., Reynolds E. C., Pantarat N., Biswas D. P., O'Connor A. J. Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli* // *Nanotechnology*. – 2015. – T. 27, № 4. – C. 045101.

72. Premanathan M., Karthikeyan K., Jeyasubramanian K., Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2011. – T. 7, № 2. – C. 184-192.

73. Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E., Mimun L., Mendoza-Cruz R., Larese-Casanova P., Webster T., Nash K. Inhibition of *E. coli* and *S. aureus* with selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in deionized water // *International journal of nanomedicine*. – 2016. – T. 11. – C. 3731.

74. Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E., Arellano-Jimenez M., Webster T., Larese-Casanova P., Nash K. Anti-bacterial selenium nanoparticles produced by UV/VIS/NIR pulsed nanosecond laser ablation in liquids // *Laser Physics Letters*. – 2014. – T. 12, № 1. – C. 016003.

75. Palomo-Siguero M., Gutiérrez A. M. a., Pérez-Conde C., Madrid Y. Effect of selenite and selenium nanoparticles on lactic bacteria: A multi-analytical study // *Microchemical Journal*. – 2016. – T. 126. – C. 488-495.

76. Ionin A., Ivanova A., Khmel'nitskii R., Klevkov Y. V., Kudryashov S., Levchenko A., Nastulyavichus A., Rudenko A., Saraeva I., Smirnov N. Antibacterial effect of the laser-generated Se nanocoatings on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Laser Physics Letters*. – 2017. – T. 15, № 1. – C. 015604.

77. Wang Q., Webster T. J. Inhibition of various bacterial growths on paper towels through the use of selenium nanoparticles // 2014 40th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC) –IEEE, 2014. – C. 1-2.

78. Nguyen T. H., Vardhanabhuti B., Lin M., Mustapha A. Antibacterial properties of selenium nanoparticles and their toxicity to Caco-2 cells // *Food Control*. – 2017. – T. 77. – C. 17-24.

79. Mittal A. K., Kumar S., Banerjee U. C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential // *Journal of colloid and interface science*. – 2014. – T. 431. – C. 194-199.

80. Mempin R., Tran H., Chen C., Gong H., Ho K. K., Lu S. Release of extracellular ATP by bacteria during growth // *BMC microbiology*. – 2013. – T. 13, № 1. – C. 301.

81. Chen Y., Montville T. Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A // *Journal of applied bacteriology*. – 1995. – T. 79, № 6. – C. 684-690.

82. Li Y., Zhang W., Niu J., Chen Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles // *ACS nano*. – 2012. – T. 6, № 6. – C. 5164-5173.

83. Chen T., Wong Y.-S., Zheng W., Bai Y., Huang L. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. – 2008. – T. 67, № 1. – C. 26-31.

84. Stavans J. The SOS response of bacteria to DNA damage // *Dynamics of Complex Interconnected Systems: Networks and Bioprocesses* Springer, 2006. – C. 39-47.

85. Applerot G., Lipovsky A., Dror R., Perkas N., Nitzan Y., Lubart R., Gedanken A. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury // *Advanced Functional Materials*. – 2009. – T. 19, № 6. – C. 842-852.

86. Brown D., Donaldson K., Borm P., Schins R., Dehnhardt M., Gilmour P., Jimenez L., Stone V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2004. – T. 286, № 2. – C. L344-L353.

87. Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R., He Q.-Y., Yu W.-Y., Sun H., Tam P. K.-H., Chiu J.-F., Che C.-M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles // *Journal of proteome research*. – 2006. – T. 5, № 4. – C. 916-924.

88. Huang X., Chen X., Chen Q., Yu Q., Sun D., Liu J. Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs // *Acta biomaterialia*. – 2016. – T. 30. – C. 397-407.

89. Chen H., Yoo J.-B., Liu Y., Zhao G. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and nanorods // *Electronic Materials Letters*. – 2011. – T. 7, № 4. – C. 333-336.

90. Kumar A., Sevonkaev I., Goia D. V. Synthesis of selenium particles with various morphologies // *Journal of colloid and interface science*. – 2014. – T. 416. – C. 119-123.

91. Wadhwani S. A., Shedbalkar U. U., Singh R., Chopade B. A. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2016. – T. 100, № 6. – C. 2555-2566.

92. Shoeibi S., Mashreghi M. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2017. – T. 39. – C. 135-139.

93. Vetchinkina E., Loshchinina E., Kursky V., Nikitina V. Reduction of organic and inorganic selenium compounds by the edible medicinal basidiomycete *Lentinula edodes* and the accumulation of elemental selenium nanoparticles in its mycelium // *Journal of Microbiology*. – 2013. – T. 51, № 6. – C. 829-835.

94. Sharma G., Sharma A. R., Bhavesh R., Park J., Ganbold B., Nam J.-S., Lee S.-S. Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried *Vitis vinifera* (raisin) extract // *Molecules*. – 2014. – T. 19, № 3. – C. 2761-2770.

95. Fernández-Guasti M., Haro-Poniatowski E., Diamant R., Ponce L., Jiménez E. Pulsed-laser deposition of selenium // *Journal of materials science*. – 1995. – T. 30, № 24. – C. 6253-6256.

96. Quintana M., Haro-Poniatowski E., Morales J., Batina N. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation // *Applied surface science*. – 2002. – T. 195, № 1-4. – C. 175-186.
97. Singh S. C., Mishra S. K., Srivastava R. K., Gopal R. Optical properties of selenium quantum dots produced with laser irradiation of water suspended Se nanoparticles // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2010. – T. 114, № 41. – C. 17374-17384.
98. Kuzmin P. G., Shafeev G. A., Voronov V. V., Raspopov R. V., Arianova E. A., Trushina E. N., V. G. I., Khotimchenko S. A. Bioavailable nanoparticles obtained in laser ablation of a selenium target in water // *Quantum Electronics*. – 2012. – T. 42, № 11. – C. 1042.
99. Van Overschelde O., Guisbiers G. Photo-fragmentation of selenium powder by Excimer laser ablation in liquids // *Optics & Laser Technology*. – 2015. – T. 73. – C. 156-161.
100. Roldugin V. I., Fedotov M. A., Folmanis G. E., Kovalenko L. V., Tananaev I. G. Formation of aqueous colloidal solutions of selenium and silicon by laser ablation // *Doklady Physical Chemistry*. – 2015. – T. 463, № 1. – C. 161-164.
101. Ionin A., Ivanova A., Khmel'nitskii R., Klevkov Y., Kudryashov S., Mel'nik N., Nastulyavichus A., Rudenko A., Saraeva I., Smirnov N., Zayarny D., Baranov A., Kirilenko D., Brunkov P., Shakhmin A. Milligram-per-second femtosecond laser production of Se nanoparticle inks and ink-jet printing of nanophotonic 2D-patterns // *Applied Surface Science*. – 2018. – T. 436. – C. 662-669.
102. Saraeva I. N., Nastulyavichus A. A., Kudryashov S. I., Rudenko A. A., Zayarny D. A., Ionin A. A., Klevkov Y. V., Zhilnikova M. I., Simakin A. V. The effect of laser pulsewidth on the selenium nanoparticles mass yield // *Laser Physics Letters*. – 2019. – T. 16, № 6. – C. 066004.
103. Semaltianos N. G., Logothetidis S., Perrie W., Romani S., Potter R. J., Edwardson S. P., French P., Sharp M., Dearden G., Watkins K. G. Silicon nanoparticles generated by femtosecond laser ablation in a liquid environment // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2010. – T. 12, № 2. – C. 573-580.

104. Ayyyzhy K. O., Voronov V. V., Gudkov S. V., Rakov I. I., Simakin A. V., Shafeev G. A. Laser Fabrication and Fragmentation of Selenium Nanoparticles in Aqueous Media // *Physics of Wave Phenomena*. – 2019. – T. 27, № 2. – C. 113-118.
105. Poborchii V. V., Kolobov A. V., Tanaka K. An in situ Raman study of polarization-dependent photocrystallization in amorphous selenium films // *Applied Physics Letters*. – 1998. – T. 72, № 10. – C. 1167-1169.
106. Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens // *BioMed Research International*. – 2016. – T. 2016. – C. 2475067.
107. De Oliveira D. M. P., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N. A., Schembri M. A., Beatson S. A., Paterson D. L., Walker M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2020. – T. 33, № 3. – C. e00181-19.
108. Sheppard J. G., Long T. E. Allicin-inspired thiolated fluoroquinolones as antibacterials against ESKAPE pathogens // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – T. 26, № 22. – C. 5545-5549.