

УДК 579.61

## ГИБРИДНЫЕ ЛАЗЕРНЫЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ БОРЬБЫ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ БИОПЛЕНКАМИ

© 2020 г. А. А. Ионин<sup>1</sup>, С. А. Гончуков<sup>1,4</sup>, Д. А. Зазымкина<sup>1</sup>, А. Н. Кириченко<sup>3</sup>,  
С. И. Кудряшов<sup>1</sup>, А. А. Настулявичус<sup>1,\*</sup>, Ю. М. Романова<sup>1,2</sup>, И. Н. Сараева<sup>1</sup>,  
Н. А. Смирнов<sup>1</sup>, Э. Р. Толордава<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Физический институт имени П.Н. Лебедева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Москва, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Технологический институт сверхтвердых и новых углеродных материалов”, Москва, Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, Россия

\*E-mail: ganiary\_moon@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Представлены активные и пассивные гибридные методы борьбы с биопленками и планктонной формой патогенных микроорганизмов на основе различных бактерицидных наноматериалов, полученных с помощью современных лазерных технологий. Описан инновационный мобильный лазерно-аппликационный метод полного подавления биопленок *in situ*.

DOI: 10.31857/S0367676520110137

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из проблем мирового масштаба является борьба с патогенными микроорганизмами [1]. Особенно устойчивыми являются возбудители, способные к формированию биопленок. Биопленки являются формой микробных сообществ, фиксированных на различных поверхностях [2]. Большинство организмов обладает способностью формировать биопленки. Традиционными методами борьбы с микроорганизмами считаются антибиотики, дезинфицирующие химические средства [3]. Данные методы не являются панацеей и у них есть свои минусы. Так, у микробов может появляться резистентность к антибиотикам, а химические вещества по большей части вредны и для самого человеческого организма. Решение проблемы антимикробной резистентности является одной из ключевых в современной медицине. Поэтому на повестке дня современной медицинской микробиологии стоит поиск альтернативных способов борьбы с патогенными микроорганизмами.

В последние годы появилось большое количество работ, в которых предлагают новые методы

борьбы с микроорганизмами. К таким разработкам можно отнести создание микро- или наноструктур на поверхности материалов [4–6]. Данные структуры могут обладать уникальными физико-химическими свойствами. Идею использовать наноструктуры в борьбе с микроорганизмами учёные почерпнули из природы. Известным примером является плотная текстура из наноиголок на крыльях цикады, которые обладают механическим бактерицидным эффектом, а также свойством гидрофобности.

Одним из наиболее востребованных методов получения микро-нанорельефа является лазерное текстурирование поверхности. Этот метод является востребованным благодаря своей простоте и эффективности, а также широкому кругу материалов, из которых можно получить нужные структуры. Так, искусственные нанопищковые структуры, сформированные с помощью лазерного излучения, были получены на поверхностях металлов, полупроводников, полимеров [7–9]. Успешно используются для борьбы с бактериями антибактериальные наночастицы, действующие посредством генерации синглетного

кислорода или его других реакционноспособных форм [10–14]. Также, большое внимание исследователей привлекает антимикробная фотодинамическая терапия, которая благодаря окислительно-му характеру повреждений клеточных компонентов препятствует развитию устойчивости [15–18].

В настоящей работе исследовалась бактерицидная активность различных типов наноматериалов и поверхностных наноструктур, полученных с помощью современных лазерных технологий, в отношении патогенных микроорганизмов в форме планктона и биопленок. Также, изучались возможности инновационного лазерно-апликационного метода полного подавления биопленок *in situ*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лазерная фабрикация квазирегулярных микро-наноструктур на поверхности полированной пластины кремния *n*-типа и нержавеющей стали марки 12X18H10T осуществлялась с помощью волоконного фемтосекундного лазера Satsuma с длиной волны 1030 нм, длительностью импульса: 300 фс и частотой сканирования 160 кГц. На поверхности выбирался участок размерами 1 × 1 см. Лазерное излучение фокусировалось на поверхности в пятно размером  $1/e \approx 15$  мкм. В качестве среды обработки использовались дистиллированная вода и воздух.

Генерация наночастиц и перенос металлических пленок в виде наночастиц на бактериальные биопленки осуществляли с помощью волоконного наносекундного лазера HTF MARK (Булат) (длина волны – 1064 нм, длительность импульса на полувысоте – 120 нс, максимальная энергия в импульсе – 1 мДж, частота повторения импульсов – до 80 кГц). Излучение фокусировалось и сканировалось гальваносканнером с фокусным расстоянием объектива 160 мм. Металлические пленки напылялись на полимерные подложки методом магнетронного распыления в атмосфере аргона. Пластик с напыленной на него тонкой ( $\approx 120$  нм) металлической (Au, Ag, Cu) пленкой подвергали воздействию лазерного излучения с энергией в импульсе 0.2 мДж, частотой следования импульса 20 кГц и скоростью сканирования 1500 мм/с. Минимальный размер пятна фокусировки при этом составлял  $\approx 80$  мкм, интенсивность излучения достигала 100 МВт/см<sup>2</sup>. Расстояние между мишенью и стеклом с биопленкой составляло 2 мм.

Визуализация структурированных поверхностей и наночастиц производилась с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ, JEOL 7001F). Элементный состав анализировался методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС, INCA (Oxford Instruments)).

Антибактериальное действие образцов было проверено на грамположительных бактериях золотистого стафилококка и грамотрицательных синегнойной палочки. Эти бактерии использовались в планктонной форме и форме их биопленок – прочных полимерных матриц, которые позволяют бактериям оставаться в гидратированной среде, обеспечивая тем самым их высокое антибиотическое сопротивление. 18-часовая культура каждой бактерии, которая выращивалась в питательной среде (лизогенный бульон, LB), разбавлялась свежим LB 1 : 100. Затем, 2 мл лизогенного бульона в чашке Петри помещали под исследуемое стекло. Для формирования биопленок требовалась 4-часовая инкубация при температуре 37°C.

Для исследований планктонных бактерий ночную бульонную культуру разводили 100 раз, центрифугировали и удаляли питательный бульон. Осевшие на дне пробирки бактерии ресуспендировали в физиологический раствор и разливали по 1 мл в лунки 24-луночного планшета. В лунки помещали образцы одинакового размера. Планшет с образцами ставили на качалку и инкубировали в течение 60 мин в термостате при температуре 37°C. Затем бактерии высевали на плотную питательную среду и считали КОЕ (колониеобразующая единица). Контролем в этих опытах служили пластины чистого (неструктурированного) металла и/или стекла. Опыты проводили в трех повторениях. Жизнеспособность бактерий оценивали с помощью набора красителей Live/Dead Bacterial Viability Kit. Для этого, вначале на поверхность исследуемых и контрольных образцов наносили бактериальные культуры (капли объемом 200 мкл) и инкубировали в течение 60 мин во влажной камере. Затем образцы окрашивали флуоресцентными красками пропидиум иодидом и Цито9, следуя протоколу метода окрашивания LIVE/DEAD, а после окрашивания промывали стерильной водой. Такой метод исследования позволяет выявлять живые и мертвые клетки бактерий. Живые бактерии флуоресцируют зеленым цветом, а мертвые – красным.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

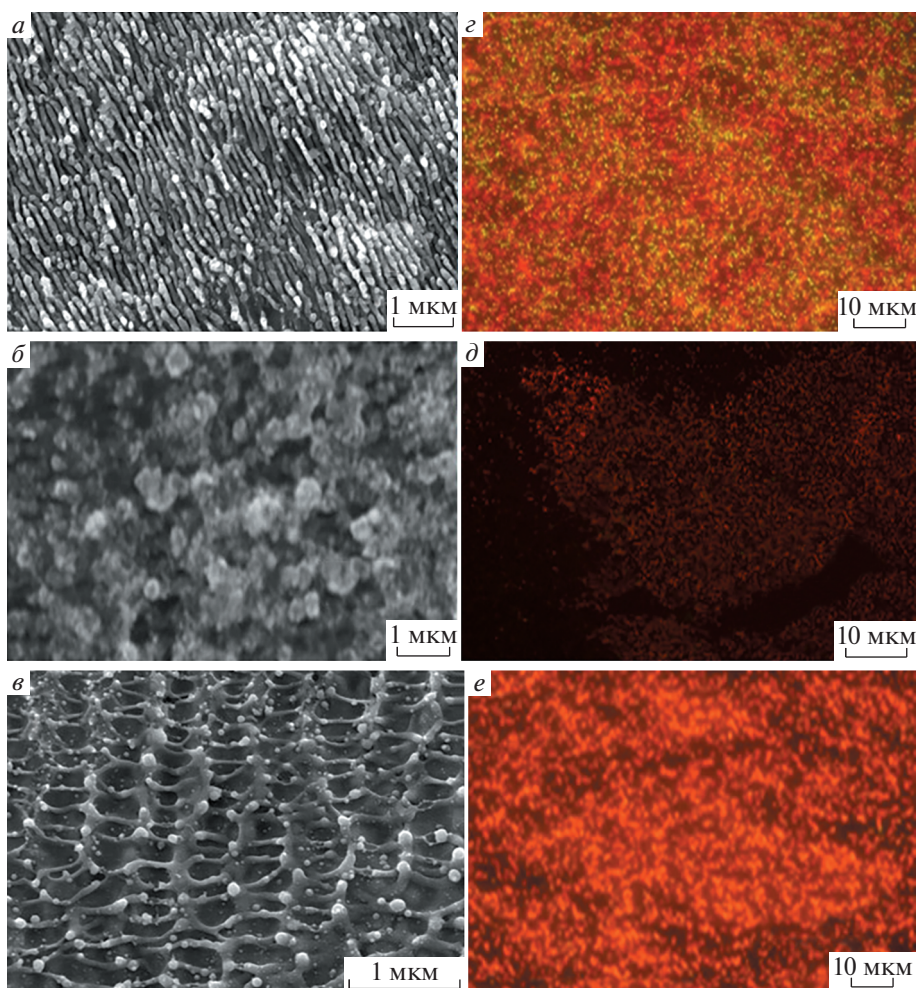
Периодические поверхностные наноструктуры, генерируемые ультракороткими лазерными импульсами в дистиллированной воде на поверхности кремния, демонстрируют уменьшение КОЕ/мл патогенных грам-положительных микроорганизмов *S.aureus* от начальной концентрации примерно на 1 порядок, что в микробиологической практике обычно считается незначительным (значительным считается уменьшение на 3–4 порядка). При этом, бактерицидное действие этих наноструктур на культуру грам-отрицательных бактерий *P. aeruginosa* места не имеет (табл. 1). Несколько лучшую бактерицидную эффективность показали крем-

ниевые структуры с нанесенными на них коллоидными серебряными наночастицами – снижение на 2 порядка для культуры *S. aureus* и полпорядка для культуры *P. aeruginosa* (табл. 1). Примечательно, что для nano-структурированной стали, содержащей значительное количество цито-токсичного никеля [5], характерно снижение на 1 порядок по обеим культурам (табл. 1). Таким образом, проведенное исследование показало, что nano/микро-структурированные образцы не обладают ярко выраженными бактерицидными свойствами по отношению к планктонной форме патогенных бактерий этих культур. Бактерицидный эффект структурированных поверхностей проявлялся только при непосредственном контакте с бактериями в красном окрашивании образцов (рис. 1). Механизм гибели бактерий обусловлен, по-видимому, механическим фактором (влияние острых шипов наноструктур) [4], а также фотодинамической активностью составляющих их наночастиц [10].

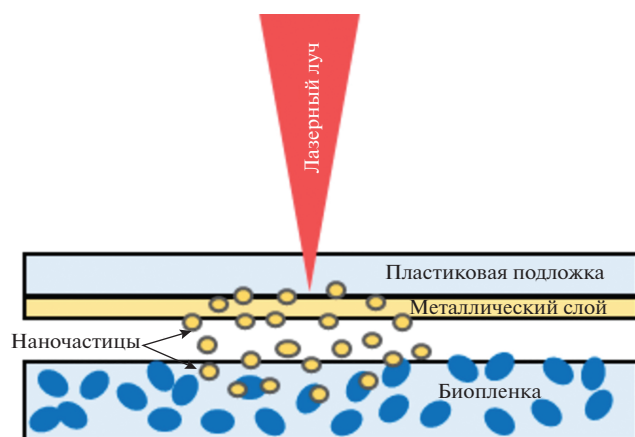
**Таблица 1.** Влияние образцов nano/микро-структурированных поверхностей на значения КОЕ/мл для клинических изолятов, находящихся в планктонном состоянии. В силу особенности процедуры измерения – десятичное разведение с титрованием – погрешность измерения не превышала единицы в том же десятичном порядке

Структурированные поверхности	КОЕ/мл бактерий	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Si структуры	$(5 \pm 1) \cdot 10^5$	$(3 \pm 1) \cdot 10^6$
Si структуры + Ag НЧ	$(2 \pm 1) \cdot 10^4$	$(6 \pm 1) \cdot 10^5$
Steel структуры	$(2 \pm 1) \cdot 10^5$	$(3 \pm 1) \cdot 10^6$
Steel (контроль)	$(2 \pm 1) \cdot 10^6$	$(5 \pm 1) \cdot 10^7$
Si (контроль)	$(4 \pm 1) \cdot 10^6$	$(3 \pm 1) \cdot 10^6$
Стекло (контроль)	$(8 \pm 1) \cdot 10^6$	$(3 \pm 1) \cdot 10^7$

В связи с тем, что nano/микро-структурированные поверхности не проявляют значимое бактерицидное действие по отношению к биопленкам,



**Рис. 1.** СЭМ-снимки структурированной поверхности кремния (а); кремния с серебряными наночастицами (б); нержавеющей стали (в); живые и мертвые бактериальные клетки на соответствующих структурированных поверхностях (г–е). Красный флуоресцентный краситель окрасил мертвые клетки, а зеленый – живые.



**Рис. 2.** Схема/принцип аппликационного лазерного переноса наночастиц с прозрачной подложки на биопленку патогенных микроорганизмов.

был разработан новый эффективный метод борьбы с биопленками с помощью лазерного переноса металлических наночастиц с поверхности полимера непосредственно на поверхность биопленки. На рис. 2 показана схема аппликационного лазерного переноса наночастиц с прозрачной подложки на биопленку патогенных микроорганизмов. При воздействии умеренно интенсивного ( $\sim 10$  МВт/см<sup>2</sup>) наносекундного лазерного излучения на нанокристаллиты металлической пленки происходило тепловое расширение материала, более выраженное в атмосферу, чем в полимерную подложку, что приводило к быстрому смещению центра масс кристаллитов от поверхности и отрыву при преодолении энергии адгезии с полимерной подложкой. Этот “прыжковый” механизм хорошо известен в технологии лазерной очистки наночастиц с критических поверхностей [19, 20]. Дополнительно, существенный импульсный на-

грев нанокристаллитов вызывал нагревание и разложение полимера в области их контакта, создающее трамплино-образную реактивную выталкивающую силу [19, 20]. В итоге, металлическая пленка в виде совокупности составляющих ее кристаллитов отлетала от мишени и через воздушный промежуток шириной в 2 мм попадала на стеклянную подложку с бактериальной биопленкой, где в итоге образовывались наблюдаемые с помощью сканирующей электронной микроскопии скопления нанокристаллитов (наночастиц), частично покрытые полимером подложки. Роль данного полимера в проявление бактерицидной активности металлических наночастиц в настоящее время активно исследуется методами ИК-микроскопии и конфокальной КР-микроскопии.

После проведения стандартных микробиологических процедур, определялось КОЕ. Результаты представлены в табл. 2. При использовании предложенного метода в ряде случаев – для серебряных и медных наночастиц – выявлена полная гибель живой суточной биопленки. При переносе золотых наночастиц и при воздействии лазера через пластиковую подложку без металлической пленки бактерицидного воздействия не выявлено. Эти результаты показывают, что бактерицидность перенесенных наночастиц не связана непосредственно с воздействием лазера и температурой наночастиц. Напротив, эффективность метода обусловлена химическими свойствами наночастиц серебра и меди – их токсичностью в отношении патогенных бактерий. Предложенный экономичный и потенциально мобильный способ позволяет повысить локальность, доступность и эффективность разрушения биопленки за счет бактерицидного эффекта металлических наночастиц при незначительном прямом лазерном воздействии на биопленку.

**Таблица 2.** Влияние аппликационного лазерного переноса наночастиц золота, меди и серебра (с контролем по аналогичному лазерному воздействию через пластиковую подложку без металлической пленки) на значения КОЕ/мл для сформированных за 24 ч биопленок. В силу особенности процедуры измерения – десятичное разведение с титрованием – погрешность измерения не превышала единицы в том же десятичном порядке (в случае нулевых показаний – на уровне единичной бактерии)

Бактерии	КОЕ/мл бактерий				
	Нано-частицы серебра	Нано-частицы меди	Нано-частицы золота	Лазер через пластик (без металлической пленки)	Нативная биопленка
<i>S. aureus</i>	0	0	$(2 \pm 1) \cdot 10^6$	$(4 \pm 1) \cdot 10^6$	$(4 \pm 1) \cdot 10^6$
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	$(3 \pm 1) \cdot 10^7$	$(10 \pm 1) \cdot 10^6$	$(3 \pm 1) \cdot 10^7$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что лазерно-нано/микро структурированные поверхности обладают бактерицидным действием в отношении патогенных бактерий в планктонной форме, причем это воздействие особенно эффективно проявляется при непосредственном контакте микробов с поверхностью. Предложенный инновационный мобильный способ аппликационного лазерного переноса наночастиц серебра или меди на поверхность зрелых бактериальных биопленок патогенных микроорганизмов *S. aureus* и *P. aeruginosa* приводит к их практически полной гибели.

Исследования поддержаны Российским научным фондом (проект № 18-15-00220).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beloeil P.A.* Борьба с устойчивостью к антибиотикам с позиций безопасности пищевых продуктов в Европе. Copenhagen: ЕРБ ВОЗ, 2011.
2. *López D., Vlamakis H., Kolter R.* // *Biofilms*. 2010. V. 2. № 7. Art. № a000398.
3. *Гренкова Т.А., Селькова Е.П., Гусарова М.П. и др.* // Эпидем. Вакцинопроф. 2014. Т. 74. № 1. С. 29.
4. *Ivanova E.P., Hasan J., Webb H. et al.* // *Small*. 2012. V. 8. № 16. P. 2489.
5. *Nastulyavichus A.A., Kudryashov S.I., Smirnov N.A. et al.* // *Laser Phys. Lett.* 2019. V. 16. № 9. Art. № 096002.
6. *Linklater D.P., Juodkazis S., Ivanova E.P.* // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 43. Art. № 16564.
7. *Kietzig A.M., Mirvakili M.N., Kamal S. et al.* // *J. Adhes. Sci. Technol.* 2011. V. 25. № 20. P. 2789.
8. *Koufaki N., Ranella A., Aifantis K.E. et al.* // *Biofabrication*. 2011. V. 3. № 4. Art. № 045004.
9. *Ranella A., Barberoglou M., Bakogianni S. et al.* // *Acta Biomater.* 2010. V. 6. № 7. P. 2711.
10. *Nastulyavichus A., Kudryashov S., Smirnov N. et al.* // *Appl. Surf. Sci.* 2019. V. 469. P. 220.
11. *Choi O., Hu Z.* // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 12. P. 4583.
12. *Ba L.A., Döring M., Jamier V. et al.* // *Org. Biomol. Chem.* 2010. V. 8. № 19. P. 4203.
13. *Jose G.P., Stefansson S., Kim M.S., Ahn S.N.* // *J. Nanobiotechnol.* 2011. V. 9. P. 1.
14. *Zonaro E., Lampis S., Turner R.J. et al.* // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 584.
15. *Wang Y., El-Din M.G., Perez-Estrada L.A. et al.* // *Photochem. Photobiol.* 2015. V. 91. № 1. P. 124.
16. *Akhlyustina E.V., Meerovich G.A., Tiganova I.G. et al.* // *J. Phys. Conf. Ser.* 2019. V. 1189. № 1. Art. № 012033.
17. *Cieplik F., Späth A., Regensburger J. et al.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 477.
18. *Li X., Tian Q., Zheng G. et al.* // *J. Surg. Res.* 2013. V. 184. № 2. P. 1013.
19. *Kudryashov S.I., Allen S.D., Shukla S.D.* // *Particul. Sci. Technol.* 2006. V. 24. P. 281.
20. *Kudryashov S.I., Allen S.D.* // *Particul. Sci. Technol.* 2008. V. 26. P. 109.