

ДЕСОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА, БАКТЕРИЦИДНАЯ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ГЕКСАГОНАЛЬНОГО НИТРИДА БОРА, НАСЫЩЕННЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

© 2020 г. К. Ю. Гудзь^{1,*}, Е. С. Пермякова¹, А. Т. Матвеев¹, А. М. Ковальский¹, С. Ю. Филиппович², П. В. Слукин³, С. Г. Игнатов³, Д. В. Штанский¹

¹ Национальный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

³ Государственный научно-исследовательский центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

*E-mail: kristinkagudz@mail.ru

Поступила в редакцию 29.06.2020 г.

После доработки 17.09.2020 г.

Принята к публикации 20.09.2020 г.

Исследование направлено на создание наноструктурированных покрытий на основе гексагонального нитрида бора с высокой сорбционной способностью в отношении различных терапевтических препаратов и пролонгированным антибактериальным действием за счет их постепенного высвобождения в физиологической среде. Покрытия получены путем взаимодействия газообразного аммиака с прекурсором из наночастиц аморфного бора. В качестве бактерицидных агентов использовали антибиотики гентамицина сульфат, ципрофлоксацин и противогрибковый препарат амфотерицин В. Кинетику высвобождения антибиотиков исследовали при различном значении pH. Антибактериальные исследования показали, что все типы покрытий оказывают бактерицидное действие против антибиотико-резистентного штамма *Escherichia coli* K-261. Покрытия, насыщенные амфотерицином В, оказали противогрибковое действие против различных штаммов аскомицета *Neurospora crassa* – дикого типа wt-987 и мутантов по азотному метаболизму – nit-2 и nit-6.

DOI: 10.1134/S1992722320040044

ВВЕДЕНИЕ

Разработка антибактериальных покрытий всегда являлась важной задачей в области биомедицинской инженерии, так как патогенные бактерии и вызываемые ими инфекции являются одной из основных причин отторжения имплантатов. Одной из перспективных стратегий подавления бактериальных инфекций является введение антибактериальных агентов в состав имплантата. Материалы, насыщенные терапевтическими препаратами, проявляют свою бактерицидную активность за счет постепенного их выхода в биологическую среду. Преимущество данного подхода состоит в локальности терапевтического воздействия и низкой дозе бактерицидного агента по сравнению с традиционными методами лекарственной терапии. Важно обеспечить интенсивный выход достаточного количества бактерицида в первые часы после хирургического вмешательства для подавления острой воспалительной реакции и последующее, более медленное высво-

бождение, для антибактериальной защиты ослабленного организма.

К настоящему времени были разработаны различные покрытия, содержащие бактерицидный агент. Например, покрытие на основе хитозана, насыщенное гентамицином, показало способность высвобождать антибиотик в нейтральной среде (pH = 7.4) в течение 168 ч [1]. Покрытие на основе магния, пропитанное ципрофлоксацином, продемонстрировало медленное высвобождение антибиотика в нейтральной среде в течение 192 ч [2]. Выход антибиотика из многослойных покрытий Ti/Van-гидроксиапатит, Ti/Van-гидроксиапатит–коллаген и Ti/Van/TiO₂, насыщенных ванкомицином, наблюдался в нейтральной среде в течение 30 ч [3]. Выход гепарина из многослойного покрытия Ti/полидопамин/(хитозан-гепарин) в кислой среде (pH = 4.3) происходил в течение 320 ч [4]. Эти работы показали возможность относительно длительного (от десятков часов до нескольких дней) высвобождения терапевтического препарата. В то же время низкая сорбцион-

ная способность покрытий и повышенная токсичность, особенно в случае поверхностной иммобилизации антибиотика, сдерживают дальнейшее развитие этого подхода [5–8].

В последние годы большое внимание уделяется изучению различных наноструктур на основе гексагонального нитрида бора (*h*-BN), которые находят применение в качестве носителей каталитически активных частиц [9], наноконтейнеров для адресной доставки лекарств [10], упрочняющей фазы в легких композиционных материалах [11–13], функциональных и супергидрофобных покрытий [14]. Такой широкий спектр применения связан с уникальным сочетанием физических и химических свойств этого материала, таких как низкая удельная плотность, высокая термическая стабильность, стойкость к окислению и высокая сорбционная способность. Недавние исследования показали, что наноструктуры BN имеют более низкую цитотоксичность и лучшую биосовместимость по сравнению с их аналогами на основе углеродных наноструктур [15–18]. В частности, наночастицы BN при концентрации <100 мг/л не оказывали негативного воздействия на клетки HPAEpic [19]. Наночастицы BN при концентрации 40 мкг/мл не оказывали токсического воздействия на клетки IAR-6-1 [10]. При концентрации <10 мкг/мл наночастицы BN являются потенциально биосовместимым материалом [20]. Было показано, что покрытие, содержащее *h*-BN, ускоряетживление имплантата, предотвращает появление инфекции и может быть использовано, в том числе, для пациентов с риском развития остеомиелита [21]. Нанотрубки BN не цитотоксичны для остеобластов ATCC CRL-11372 и макрофагов и безопасны для применения в материалах ортопедических каркасов [22]. Также было показано, что нанотрубки BN не цитотоксичны для клеток эмбриональных почек человека (HEK-293) [23]. В настоящее время наномодифицированные поверхности все более активно используются как бактерицидные инструменты при переходе к персонализированной медицине и технологиям для продолжительности и качества жизни. Наночастицы BN интенсивно исследуются благодаря их низкой токсичности, высокой химической стойкости и биосовместимости [24]. Однако помимо риска бактериальных инфекций существует риск возникновения грибковой инфекции [25], поэтому помимо бактерицидной активности следует изучать фунгицидную активность.

Целью настоящей работы были получение и изучение наноструктурированного покрытия на основе *h*-BN в качестве эффективной платформы для создания бактерицидных и фунгицидных поверхностей с высокой сорбционной и десорбционной способностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение покрытий. Покрытия на основе гексагонального нитрида бора были получены на кремневых подложках в результате взаимодействия газообразного аммиака (Horst, Москва, 99.98%) с прекурсором из наночастиц аморфного бора (99%, Авиабор, Россия) [26]. Синтез проводили в горизонтальном трубчатом реакторе (Термокерамика, Россия) при температуре 1300°C в течение 1 ч. Насыщение покрытий проводили путем нанесения растворов антибиотиков на поверхность образцов и последующей сушки в вакууме в течение 120 мин. Концентрация антибиотиков была выбрана на основе имеющихся данных для гентамицина (Белмедпрепараты, Республика Беларусь) [27] (BN/Gent = 300 мкг/см²) и амфотерицина В (Синтез, Россия) [28] (BN/Amp = 20 мкг/см²). Концентрация ципрофлоксацина (Dr.Reddy's, Индия) была такой же (BN/Cip), как и гентамицина, так как оба препарата относятся к общему классу антибиотиков.

Методы исследования поверхности. Морфология поверхности покрытий была изучена методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на сканирующем электронном микроскопе JSM-7600F (JEOL Ltd., Япония). Присоединение антибиотиков к поверхности нитрида бора изучали методом ИК-фурье-спектроскопии в режиме полного внутреннего отражения (ATR) с использованием вакуумного спектрометра Vertex 70v (Bruker, Германия) в диапазоне 400–4000 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹. Краевой угол смачивания (КУС) измеряли методом лежащей капли (5 мкл) на установке CAM 101 (KSV), оборудованной видеокамерой. Для изучения кинетики выхода терапевтического препарата из покрытий BN образцы помещали в буферные растворы и отбирали пробы с регулярным интервалом 1, 3, 6, 12 ч и 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 14 дней. Объем среды в течение всего эксперимента поддерживали постоянным путем доведения буферного раствора до исходного уровня. Кинетику высвобождения бактерицидного компонента изучали с помощью УФ-спектрофотометра Flame UV-VIS (Ocean Optics, США). Для построения калибровочной кривой предварительно измеряли поглощение растворов с концентрациями антибиотиков в диапазоне 0.005–4 мг/мл.

Антибактериальные и противогрибковые исследования. Для определения антибактериальной активности покрытий использовали госпитальный бактериальный штамм *E. coli* K-261, устойчивый к целому ряду антибиотиков, и штамм *Bacillus* F, выделенный из вечной мерзлоты [29]. В лунки с исследуемыми образцами сначала добавляли по 0.5 мл стерильного физиологического раствора (9 г/л), а потом 0.03 мл суспензии ночной культуры тест-штаммов с концентрацией клеток поряд-

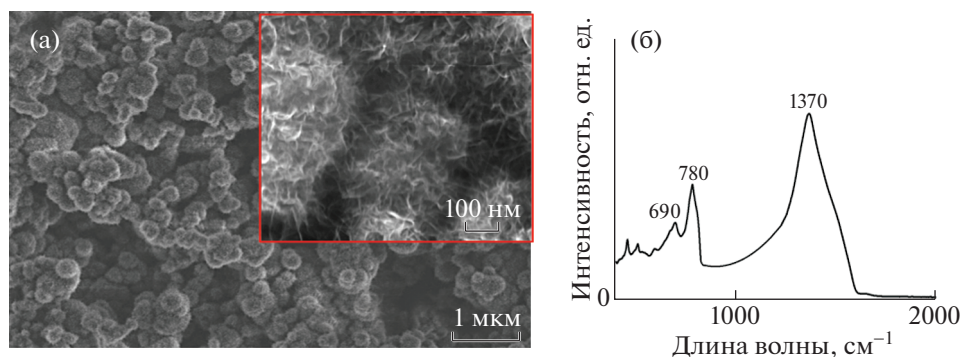


Рис. 1. СЭМ-изображение (а) и ИК-спектр (б) покрытия BN.

ка 10^4 – 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) на миллилитр. Определение концентрации КОЕ проводили методом 10-кратных разведений в 0.3 мл физраствора. Из каждого разведения высевали бактериальную суспензию по 0.01 мл на чашку Петри с питательной средой Mueller Hinton Agar (HiMedia, Индия) и культивировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

Противогрибковую активность образцов изучали методом диффузии амфотерицина В с поверхности наноструктурированных покрытий на основе *h*-BN в агар в отношении штаммов *N. crassa* (Fungal Genetics Stock Center, США) дикого типа *wt*-987 и его мутантов *nit-2* (без нитритредуктазы и нитратредуктазы) и *nit-6* (без нитритредуктазы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СЭМ-исследование показало, что покрытие BN состоит из округлых наночастиц со средним диаметром 150–200 нм (рис. 1а). Поверхность наночастиц образована многочисленными нанопластиками и наноидами BN. Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии показано, что наночастицы состоят из бора и азота с небольшим количеством примесей кислорода. ИК-спектр покрытий (рис. 1б) состоит из пиков, соответствующих плоскостным валентным колебаниям B–N (1370 см^{-1}), внеплоскостным деформационным колебаниям B–N–B (780 см^{-1}) и связи O–B–O (690 см^{-1}).

Результаты ИК-спектроскопии после иммобилизации антибиотиков представлены на рис. 2а. Гентамицин имеет в составе аминокислотные молекулы, поэтому его наличие в образце проявляется в виде пика 1550 см^{-1} , соответствующего деформационным колебаниям NH_3^+ . Отличительной чертой ципрофлоксацина является наличие карбоксильных групп, которые наблюдаются на ИК-спектре BN/Cip при 2900 см^{-1} (O–H),

1710 см^{-1} (C=O) и 1430 см^{-1} (C–O). Амфотерицин В также имеет аминокислотные молекулы. Пик 1600 см^{-1} в образце BN/Amp соответствует деформационным колебаниям NH_3^+ .

Известно, что иммобилизация антибиотиков приводит к изменению смачиваемости поверхности. Измерения КУС показали, что пропитка поверхности покрытия BN антибиотиками способствует улучшению смачиваемости поверхности, а степень смачиваемости зависит от типа антибиотика (рис. 2б–2д): значения КУС уменьшаются с 133.4° (BN) до 79.2° (BN/Gent), 13.4° (BN/Cip) и 10.1° (BN/Amp). Эти результаты подтверждают, что антибиотики были успешно привиты к поверхности BN.

КИНЕТИКА ВЫХОДА АНТИБИОТИКОВ ИЗ ПОКРЫТИЙ

Результаты исследования кинетики выхода антибиотиков при различном pH из покрытий BN представлены на рис. 3. Кинетика высвобождения антибиотиков была изучена в нейтральной, кислой и щелочной средах, чтобы выявить чувствительность покрытия BN к изменению pH. Согласно полученным данным все образцы показали максимальный выход бактерицидного компонента в течение первых 24 ч и дальнейшее постепенное высвобождение антибиотиков в течение последующих 11 дней. Концентрация высвобожденного гентамицина в первые 24 ч составила 52.8 мкг/мл (pH = 4.0), 43.3 мкг/мл (pH = 7.4) и 49.2 мкг/мл (pH = 9.0), а максимальная концентрация была 279.3 мкг/мл (pH = 4.0), 240 мкг/мл (pH = 7.4) и 252.7 мкг/мл (pH = 9.0). При увеличении кислотности среды содержание ципрофлоксацина в растворе через 24 ч выдержки образцов уменьшалось с 69.1 мкг/мл (pH = 4.0) до 30.4 мкг/мл (pH = 7.4) и 27.3 мкг/мл (pH = 9.0). Максимальная концентрация высвобожденного ципрофлоксацина составила 217.9 мкг/мл

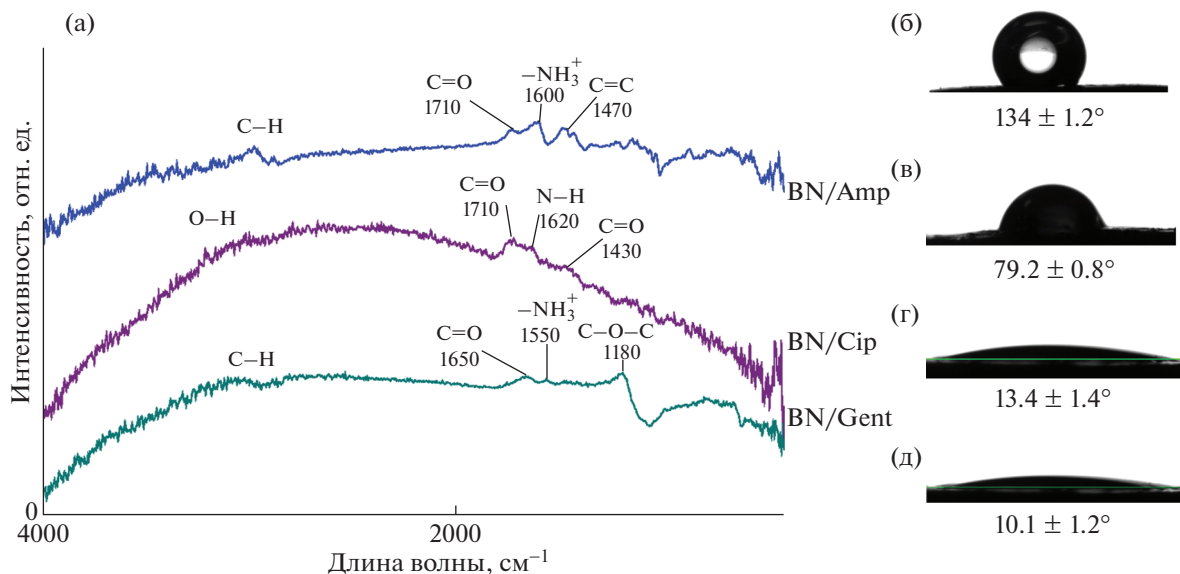


Рис. 2. ИК-спектры покрытий, загруженных антибиотиками (а). Изображение капли на поверхности покрытия BN (б) и BN/Gent (в) и соответствующие величины краевого угла смачивания.

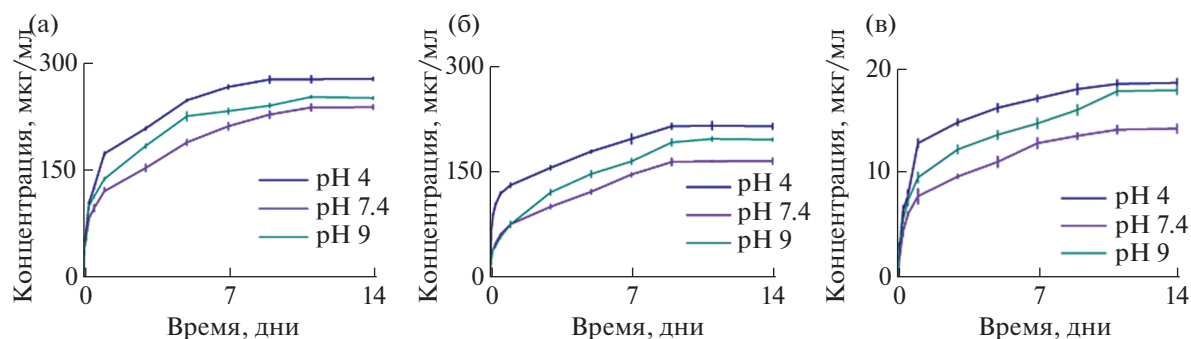


Рис. 3. Зависимость концентрации гентамицина (а), ципрофлоксацина (б) и амфотерицина В (в) от времени.

(рН = 4.0), 168.4 мкг/мл (рН = 7.4) и 199.3 мкг/мл (рН = 9.0). Концентрация амфотерицина В в первые 24 ч составляла 2.9 мкг/мл (рН = 4.0), 1.5 мкг/мл (рН = 7.4) и 2.5 мкг/мл (рН = 9.0) и увеличивалась до 18.8 мкг/мл (рН = 4.0), 14.4 мкг/мл (рН = 7.4) и 18.1 мкг/мл (рН = 9.0) к концу испытаний. Как видно из полученных результатов, более высокая концентрация антибиотиков наблюдается в кислотной и щелочной средах. Это может быть связано с рН-зависимой структурой антибиотиков, так как гентамицин и амфотерицин В имеют в своем составе NH₂-группы, а ципрофлоксацин – COOH-группы, которые в результате погружения в физиологический раствор протонируются группами OH. Известно, что протонированная молекула теряет связь с подложкой и лучше десорбируется [30]. Также важно отметить, что полученные наноструктурированные покрытия *h*-BN демонстрируют высокую степень адсорбции те-

рапевтического препарата. Это, в первую очередь, связано с развитой поверхностью покрытия *h*-BN, образованного многочисленными наночастицами, расстояние между которыми составляет несколько нанометров. Кроме того, наночастицы *h*-BN обладают отрицательным зарядом [31], что способствует электростатическому присоединению положительно-заряженного антибиотика. В пользу последнего утверждения свидетельствуют данные, представленные на рис. 3. Видно, что загрузка терапевтического агента снижается с 240–279 мкг/мл (положительно заряженный гентамицин) до 168–217 мкг/мл (ципрофлоксацин, имеющий почти нейтральный заряд) и 20 мкг/мл (отрицательно заряженный амфотерицин). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные покрытия BN обладают высокой адсорбционной и десорбционной способностью.

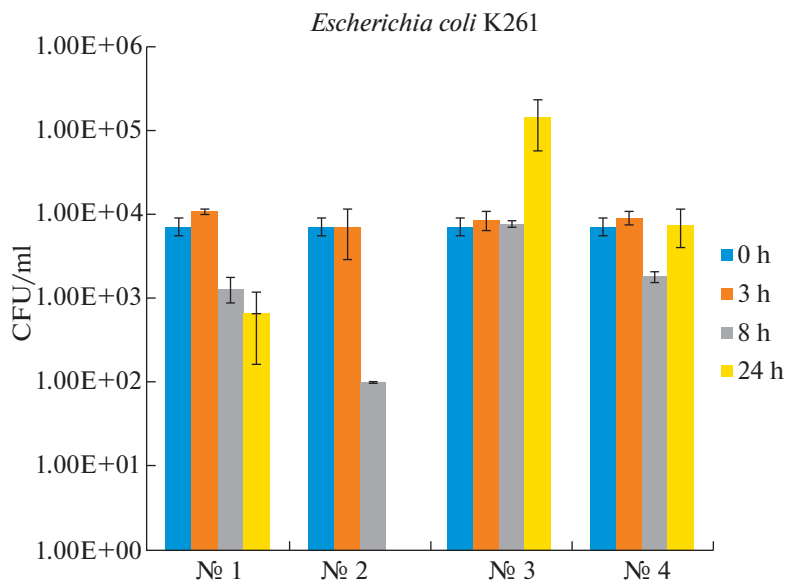


Рис. 4. Антибактериальная активность покрытий против штамма *E. coli* K-261: № 1 – BN/Cip, № 2 – BN/Gent, № 3 – Si, № 4 – контроль.

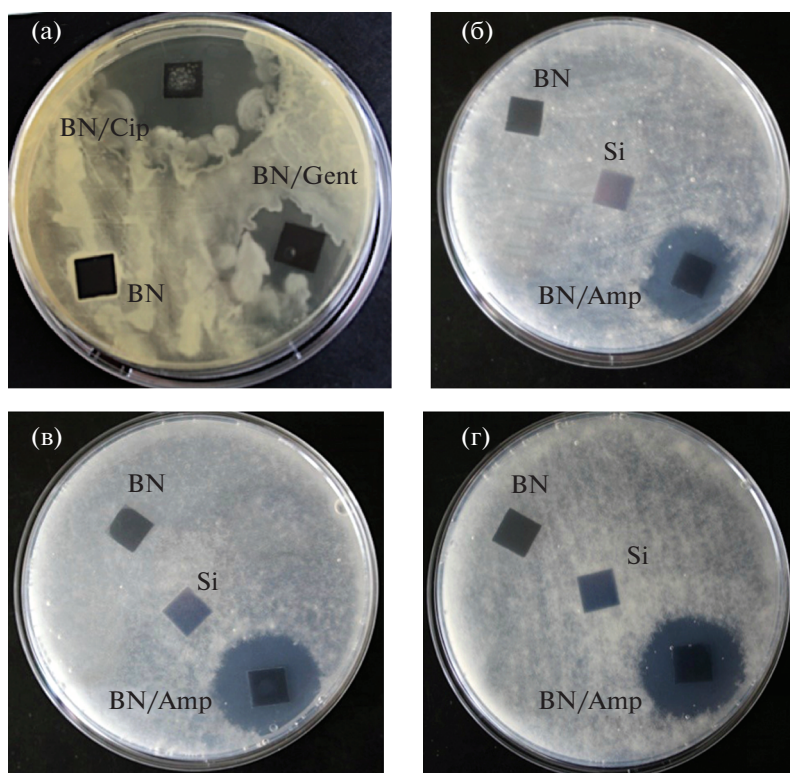


Рис. 5. Зона подавления роста бактерий *Bacillus F* (а) и аскомицета *N. crassa* wt-987 (б), *N. crassa* nit-2 (в) и *N. crassa* nit-6 (г) вокруг образцов покрытий BN, BN/Cip, BN/Gent, BN/Amp и Si (контроль).

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ

Антибактериальную активность образцов против штамма *E. coli* K-261 оценивали путем подсчета КОЕ (рис. 4). В качестве контролей использо-

вали бактериальные культуры без образцов (№ 4) и с пластиной кремния (образец № 3). В обоих тестах снижения КОЕ не наблюдалось. При исследовании образцов, насыщенных гентамицином, наблюдалось снижение численности КОЕ на 2 порядка через 8 ч и до нуля через 24 ч. При ис-

пользовании ципрофлоксацина антибактериальный эффект был менее выраженным, но также заметным и составлял 80% (8 ч) и 92% (24 ч).

На рис. 5а показаны результаты исследований антибактериальной активности покрытий BN, BN/Gent и BN/Cip против *Bacillus F*, которая является бактерией, сохранившейся в толще вечной мерзлоты и обладающей высокой устойчивостью к неблагоприятным внешним факторам [32]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рост *Bacillus F* подавляется в присутствии покрытий нитрида бора, насыщенных ципрофлоксацином и гентамицином, причем зона лизиса для образца с гентамицином составляла 31 ± 3 мм, а для образца с ципрофлоксацином 9 ± 6 мм. Для оценки фунгицидной активности (рис. 5б–5г) образцы BN и BN/Amp были помещены в суспензии спор *N. crassa* дикого типа wt-987, мутанта, дефектного по основному азотрегулирующему гену *nit-2*, и мутанта по ассимилирующему структурному гену нитритредуктазы *nit-6*. Согласно полученным результатам образцы BN/Amp эффективно подавляют рост всех трех видов культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны и получены наноструктурированные покрытия *h*-BN, обладающие высокой сорбционной способностью в отношении различных терапевтических препаратов. Методом ИК-спектроскопии и путем измерения краевого угла смачивания показано, что покрытия *h*-BN были успешно насыщены гентамицином, ципрофлоксацином и амфотерицином В. Показано, что высвобождение антибиотиков из покрытий в буферные растворы разной кислотности среды происходит в течение длительного промежутка времени (11 дней). Образцы, насыщенные гентамицином и ципрофлоксацином, эффективно подавляют рост устойчивого к антибиотикам штамма *E. coli* К-261 и штамма *Bacillus F*. Образец, насыщенный амфотерицином В, оказывает противогрибковое действие против штаммов wt-987 и мутантов *nit-2* и *nit-6* гриба *N. crassa*.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (договор 20-19-00120), а также Министерства образования и науки Российской Федерации (программа повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС» № К2А-2018-038) в части исследований методом ИК-спектроскопии (К.Ю. Гудзь).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu Y., Ji P., Lv H. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 98. P. 550. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.121>

2. Bakhsheshi-Rad H.R., Hadisi Z., Hamzah E. et al. // Mater. Lett. 2017. V. 207. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.07.072>
3. Ionita D., Bajenaru-Georgescu D., Totea G. et al. // Int. J. Pharm. 2017. V. 517. P. 296. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.062>
4. Zhou W., Jia Z., Xiong P. et al. // Mater. Sci. Eng. C. 2018. V. 90. P. 693. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.069>
5. Glinel K., Thebault P., Humblot V. et al. // Acta Biomaterialia. 2012. V. 8. P. 1670. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011>
6. Bhardwaj M., Singh B.R., Sinha D.K. et al. // Pharm. Anal. Acta. 2016. V. 7. P. 523. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000523>
7. Giedraitiene A., Vitkauskienė A., Naginiene R. et al. // Medicina (Kaunas). 2011. V. 47. № 3. P. 137. <https://doi.org/10.3390/medicina47030019>
8. Woodford N., Johnson A.P., Morrison D. et al. // Clin. Microbiol. Rev. 1995. V. 8. P. 585.
9. Konopatsky A.S., Leybo D.V., Firestein K.L. et al. // J. Catal. 2018. V. 368. P. 217. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2018.10.016>
10. Sukhorukova I.V., Zhitnyak I.V., Kovalskii A.M. et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. V. 7. P. 17217. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04101>
11. Yamaguchi M., Tang D.M., Zhi C. et al. // Acta. Mater. 2012. V. 60. P. 6213. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.07.066>
12. Firestein K.L., Shteinman A.E., Golovin I.S. et al. // Mater. Sci. Eng. A. 2015. V. 642. P. 104. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2015.06.059>
13. Yamaguchi M., Bernhardt J., Firestein K. et al. // Acta. Mater. 2013. V. 61. № 20. P. 7604. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2013.08.062>
14. Pakdel A., Bando Y., Shtansky D. et al. // Surf. Innov. 2013. V. 1. № 1. P. 32. <https://doi.org/10.1680/si.12.00007>
15. Chen X., Wu P., Rousseas M., Okawa D. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 890. <https://doi.org/10.1021/ja807334b>
16. Li L., Li L.H., Ramakrishnan S. et al. // J. Phys. Chem. C. 2012. V. 116. P. 18224. <https://doi.org/10.1021/jp306148e>
17. Ciofani G., Danti S., Genchi G.G. et al. // Small. 2013. V. 9. P. 1672. <https://doi.org/10.1002/smll.201201315>
18. Emanet M., Sen O., Culha M. // Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 797. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0322>
19. Türkez H., Arslan M.E., Sönmez E. et al. // Cytotechnology. 2019. V. 71. P. 351. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00292-8>
20. Wang N., Wang H., Tang C. et al. // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 5941. <https://doi.org/10.2147/ij.n.s130960>
21. Ferah I. The Effects of Boron Nitride and/or Hydroxyapatite Compounds on Experimentally Induced Osteomyelitis Following Open Femoral Fracture in Rats, Health Sciences Institute, Atatürk University, Erzurum, Turkey. 2015.

22. *Lahiri D., Rouzaud F., Richard T. et al.* // *Acta Biomater.* 2010. V. 6. P. 3524.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.044>
23. *Chen X., Wu P., Rousseas M. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 890.
<https://doi.org/10.1021/ja807334b>
24. *Ikram M., Jahan I., Haider A. et al.* // *Appl Nanosci.* 2020. V. 10 P. 2339.
<https://doi.org/10.1007/s13204-020-01412-z>
25. *Sardi J.C.O., Scorzoni L., Bernardi T. et al.* // *J. Med. Microbiol.* 2013. V. 62. P. 10.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
26. *Matveev A.T., Firestein K.L., Steinman A. E et al.* // *Nano Res.* 2015. V. 8. № 6. P. 2063.
<https://doi.org/10.1007/s12274-015-0717-y>
27. *Tiana B., Tang Sh., Wang Ch.-D. et al.* // *Colloids Surfaces B.* 2014. V. 123. P. 403.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.050>
28. *Sukhorukova I.V., Sheveyko A.N., Manakhov A. et al.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2018. V. 90. P. 289.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.068>
29. *Fursova O., Potapov V., Brouchkov A. et al.* // *Probiotics Antimicro. Prot.* 2012. V. 4. P. 145.
<https://doi.org/10.1007/s12602-012-9105-z>
30. *Permyakova E.S., Antipina L.Y., Kovalskii A.M. et al.* // *J. Phys. Chem. C.* 2018. V. 122. P. 26409.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07531>
31. *Permyakova E.S., Antipina L.Yu., Kiryukhantsev-Korneev P.V. et al.* // *Nanomaterials.* 2019. V. 9. P. 1658.
<https://doi.org/10.3390/nano9121658>
32. *Brouchkov A., Melnikov V., Kalenova L. et al.* // *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology.* 2017. P. 541.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_23