

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**“САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ,
МЕХАНИКИ И ОПТИКИ”**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ
ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИЕЙ В ЖИДКОСТИ**

Автор Шакирова Диана Тагировна _____
(Фамилия, Имя, Отчество) (Подпись)

Направление подготовки (специальность) 16.03.01. _____
(код, наименование)

Техническая физика _____

Квалификация бакалавр _____
(бакалавр, магистр)*

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

К защите допустить

Руководитель ОП Вейко В. П., профессор, д.т.н. _____
(Фамилия, И.О., ученое звание, степень) (Подпись)

“ _____ ” _____ 20 ____ г.

Санкт-Петербург, 2019 г.

Студент Шакирова Д. Т. _____ Группа L3420 _____ Факультет ЛФО _____
(Фамилия, И. О.)

Направленность (профиль), специализация Лазерные технологии _____

Консультант (ы):

а) _____ (Фамилия, И., О., ученое звание, степень) _____ (Подпись)

б) _____ (Фамилия, И., О., ученое звание, степень) _____ (Подпись)

ВКР принята “ _____ ” _____ 20 _____ г.

Оригинальность ВКР _____ %

ВКР выполнена с оценкой _____

Дата защиты “ _____ ” _____ 20 _____ г.

Секретарь ГЭК _____ (ФИО) _____ (подпись)

Листов хранения _____

Демонстрационных материалов/Чертежей хранения _____

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
“САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ,
МЕХАНИКИ И ОПТИКИ”

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель ОП

_____ Вейко В. П. _____

(Фамилия, И.О.)

(подпись)

« ____ » « _____ » 20 ____ г.

ЗАДАНИЕ
НА ВЫПУСКНУЮ КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ

Студенту Шакировой Д. Т. _____ Группа L3420 _____ Факультет ЛФО _____

Руководитель ВКР Самохвалов А. А., к.т.н., Университет ИТМО, ассистент _____

(ФИО, ученое звание, степень, место работы, должность)

1 Наименование темы: Антибактериальные свойства наночастиц, полученных лазерной абляцией в жидкости _____

Направление подготовки (специальность) 16.03.01 «Техническая физика» _____

Направленность (профиль) _____ «Лазерные технологии» _____

Квалификация _____ бакалавр _____

2 Срок сдачи студентом законченной работы «31» «мая» 2019г.

3 Техническое задание и исходные данные к работе Определение оптимальных режимов лазерного воздействия на материалы мишеней, обеспечивающих наиболее эффективный массовый выход неметаллических наночастиц и анализ их морфологических параметров, исследование антибактериальных свойств по отношению к таким штаммам бактерий, как *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*. Используемые установки: «Минимаркер - 2», волоконный импульсный иттербиевый лазер (длина волны 1064 нм, мощность 20 Вт, частота следования импульсов 1,6-100 кГц), и титан-сапфировый Ti:sapphire лазер (длина волны 800 нм, 100 фс, энергия в импульс 1 мДж, 10 Гц).

4 Содержание выпускной квалификационной работы (перечень подлежащих разработке вопросов)

1. Обзор литературы на тему антибактериального действия различных наночастиц, способов их синтеза и особенностей лазерной абляции под слоем жидкости как метода генерации наночастиц;

2. Синтез коллоидных растворов наночастиц кремния и селена с подбором режимов лазерного воздействия, обеспечивающих наибольшее микробицидное действие;

3. Анализ лабораторных тестов на данных штаммах бактерий, определение наиболее эффективных коллоидов;

4. Определение оптических свойств коллоидов и массового выхода наночастиц при абляции под слоем жидкости.

5 Перечень графического материала (с указанием обязательного материала)

1. Спектры пропускания полученных коллоидных растворов;

2. Зависимость массового выхода наночастиц за импульс от плотности мощности;

3. Фотографии результатов лабораторных тестов на антибактериальную эффективность синтезированных коллоидных растворов.

6 Исходные материалы и пособия

1. Химически чистые образцы селена и кремния

2. Fahim H. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives/ Fahim H., Oscar J., Sangchul H., Felix R. // Science of the Total Environment – 2014 - №466 – 1047-1059 с.

7 Дата выдачи задания «01» «сентября» 2018г.

Руководитель ВКР _____
(подпись)

Задание принял к исполнению _____ « _____ » « _____ » 20 _____ г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**“САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ,
МЕХАНИКИ И ОПТИКИ”**

АННОТАЦИЯ

ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Студент Шакирова Диана Тагировна
(ФИО)

Наименование темы ВКР: Антибактериальные свойства наночастиц,
полученных лазерной абляцией в жидкости

Наименование организации, где выполнена ВКР Университет ИТМО

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1 Цель исследования Создание и исследование антибактериальной эффективности наночастиц, полученных методом лазерной абляции под слоем жидкости

2 Задачи, решаемые в ВКР Выбор материалов, подбор режимов лазерного воздействия, создание биосовместимых нанокolloидов

3 Число источников, использованных при составлении обзора 30

4 Полное число источников, использованных в работе 31

5 В том числе источников по годам

Отечественных			Иностраных		
Последние 5 лет	От 5 до 10 лет	Более 10 лет	Последние 5 лет	От 5 до 10 лет	Более 10 лет
4	0	1	10	11	5

6 Использование информационных ресурсов Internet Да, 3
(Да, нет, число ссылок в списке литературы)

7 Использование современных пакетов компьютерных программ и технологий (Указать, какие именно, и в каком разделе работы)

Пакеты компьютерных программ и технологий	Параграф работы
Origin	2.4
ImageJ	2.4

8 Краткая характеристика полученных результатов Были исследованы антибактериальные свойства коллоидных растворов наночастиц селена и кремния, полученных на основе различных жидкостей с помощью двух установок: «Минимаркер - 2» (волоконный иттербиевый лазер) и титан-сапфировый Ti:sapphire лазер. Тесты проводились на *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*; к данным штаммам бактерий наиболее

эффективным оказался коллоид наночастиц кремния, полученный на основе дистиллированной воды.

9 Полученные гранты, при выполнении работы _____
(Название гранта)

10 Наличие публикаций и выступлений на конференциях по теме выпускной работы Да
(Да, нет)

а) 1 _____
(Библиографическое описание публикаций)

2 _____

3 _____

б) 1 VII Конгресс молодых ученых, Университет ИТМО, 2019
(Библиографическое описание выступлений на конференциях)

2 _____

3 _____

Студент Шакирова Диана Тагировна _____
(ФИО) (подпись)

Руководитель ВКР Самохвалов А. А. _____
(ФИО) (подпись)

“ _____ ” _____ 20 ____ г.

(подпись)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Активные формы кислорода (АФК), их генерация в естественных условиях и на наночастицах	10
1.2 Детектирование и методы генерации афк на наночастицах	16
1.3 Проведенные исследования	22
1.4 Выводы по обзору литературы	25
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	27
2.1 Методика исследования и экспериментальные установки	27
2.2 Исследование массового выхода наночастиц кремния. Связь с параметрами лазерной плазмы	28
2.3 Синтез коллоидных растворов наночастиц кремния, селена и гвоздики	29
2.4 Оптические свойства и морфология синтезированных коллоидных растворов наночастиц гвоздики, Se и Si	31
2.5 Исследование антибактериальных свойств коллоидных растворов наночастиц гвоздики, Se и Si	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
Список литературы	40

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия ведутся активные исследования антибактериальных свойств наночастиц. Были изучены различные наночастицы: Cu, Ag, Ti/TiO₂, Zn/ZnO, комбинированные (например, Ag-TiO₂) и др. [1-5] Большая часть образцов по результатам экспериментов показала высокую эффективность разрушения штаммов бактерий, однако металлические ионы являются токсичными для человеческого здоровья, в связи с чем неметаллические частицы, такие как Se и Si, являются более предпочтительными. [5]

Большой интерес представляют фрагментированные коллоидные растворы, обещающие быть более эффективными в разрушении клеточных мембран бактерий. [6]

Основным механизмом деструкции патогенных бактерий является окисление и разрушение клеточной мембраны синглетным кислородом, образующимся на наночастицах. [7]

В норме O₂ находится в стабильном состоянии, называемом триплетным и характеризующемся наименьшим уровнем молекулярной энергии, однако при определенных условиях молекула O₂ переходит в одно из двух возбужденных синглетных состояний (*O₂), различающихся степенью энергизованности и длительностью "жизни". [8]

Синглетный кислород используют в химическом синтезе, в медицине при фотодинамической терапии рака, для стерилизации донорской крови и для стимуляции биопроцессов в организме; в йод-кислородных химических лазерах, при очистке сточных вод от фенолов, серо- и фосфорсодержащих веществ. Одновременно с этим синглетный кислород является одним из основных компонентов фотохимического смога, способствует химической деструкции полимерных материалов.

Таким образом, изучение антибактериальных свойств коллоидных растворов наночастиц селена и кремния, а также влияния на их эффективность

различных режимов лазерного воздействия и жидкостей, на основе которых получают коллоиды, имеет непосредственную практическую значимость для физических, биологических и медицинских исследований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Активные формы кислорода (АФК), их генерация в естественных условиях и на наночастицах

Механизм разрушения бактерий коллоидными растворами наночастиц основывается на токсическом действии активных форм кислорода, генерирующихся на наночастицах.

В природе кислород чаще всего встречается в своем основном энергетическом состоянии – триплетном. Это состояние соответствует наименьшему уровню молекулярной энергии, при этом электроны располагаются на орбиталях согласно правилу Хунда.

Но при определенных условиях электроны могут располагаться и иным образом: например, остаться на разных орбиталях, но иметь разные спины, или же попасть на одну орбиталь, как показано на рисунке 1.

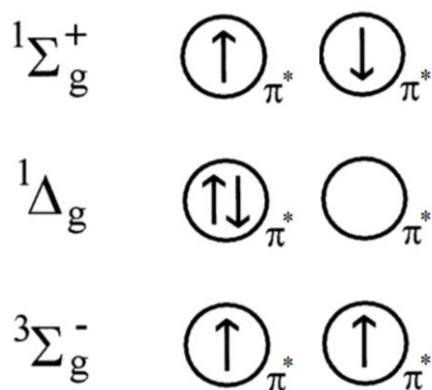


Рисунок 1 – Изображение электронных конфигураций трёх низколежащих состояний молекулярного кислорода (триплетное, первое и второе синглетные состояния снизу вверх соответственно) [9]

Такие положения соответствуют первому и второму синглетным состояниям. Они превышают энергию основного состояния на 95 (22.5 ккал/моль) и 158 кДж/моль (31.5 ккал/моль), соответственно (кривые потенциальных энергий представлены на рисунке 2). [9]

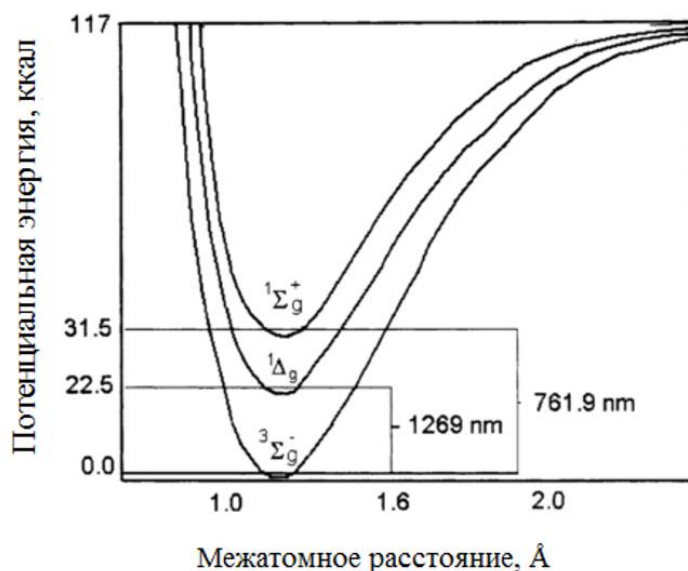


Рисунок 2 – Кривые потенциальной энергии для трёх низколежащих состояний молекулярного кислорода [9]

В первом синглетном состоянии время жизни молекулы составляет от 40 до 72 минут, а во втором – 7.1 секунду. Т.к. эти состояния являются неустойчивыми, кислород стремится вернуться в основное состояние, испуская при этом излучение с длиной волны 1269 нм (1-е состояние) и 760 нм (2-е состояние). При этом при столкновении 2 молекул кислорода во первом синглетном состоянии испускается излучение с длиной волны 634 нм, которое мы и видели на рисунках 1 и 2. [10]

Другими активными формами кислорода являются супероксидный анион (O_2^-), гидроксильный радикал (OH^\cdot) и пероксид водорода (H_2O_2).

Как отмечалось ранее, триплетный кислород может быть преобразован в его активные формы. Этот процесс осуществляется с помощью двух механизмов: либо переносом энергии, либо посредством реакций переноса электрона. В первом случае образуется синглетный кислород, а во втором происходит последовательное восстановление до супероксида, пероксида водорода и гидроксильного радикала (рис. 3). [11]

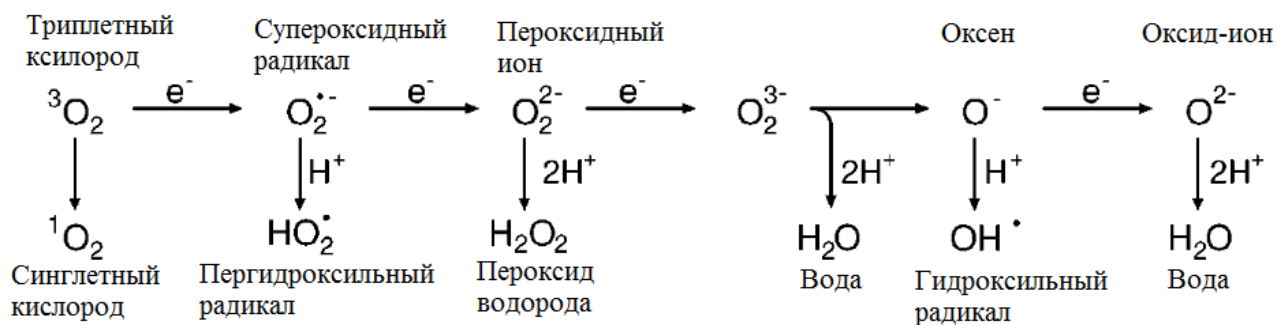


Рисунок 3 - Генерация различных АФК путем передачи энергии или последовательного одновалентного восстановления триплетного кислорода.

[11]

В природе АФК генерируются в живых клетках с помощью НАДФН-оксидазы – мультимолекулярного ферментного комплекса, содержащегося в плазматической мембране и некоторых органеллах. Именно она катализирует выработку супероксидного аниона путем одноэлектронного восстановления кислорода, используя НАДФН (Никотинамидадениндинуклеотидфосфат, кофермент) в качестве донора электронов.

Известно, что в естественных условиях при уничтожении фагоцитами (клетками иммунной системы) чужеродных бактерий происходит респираторный (окислительный, кислородный) взрыв. Он характеризуется резким повышением потребления кислорода и глюкозы клетками, а также образованием активных форм кислорода, в связи с чем и была впервые выдвинута гипотеза об их микробицидном действии. [12] В основном это было доказано тем, что фагоциты, которые не способны реализовывать респираторный взрыв вследствие генетических нарушений, не оказывают токсичного действия на большую часть штаммов бактерий. Более того, было показано, что АФК не участвуют в производстве энергии для жизнеобеспечения фагоцитарной клетки, откуда и следует вывод об их антибактериальной роли. [13] Результатом воздействия активных форм кислорода на стенки микроорганизмов является перекисное окисление липидов, приводящее к разрушению мембраны и гибели клетки. [14]

Наноматериалы, которые проявляют антибактериальные свойства сами по себе или же усиливают действие других антибиотиков, называются «наноантибиотики». Интересно, что в отличие от большинства препаратов, используемых в клиниках, они могут не вызывать прямых и острых побочных действий, хотя их способность оставаться токсичными для бактерий на протяжении долгого времени еще изучается. Главным их достоинством является то, что наноантибиотики разрушают клетку с помощью нескольких механизмов одновременно (рис. 4). Следовательно, чтобы проявить устойчивость к их микробицидной активности, должно произойти множество одновременных мутаций клетки. [15]

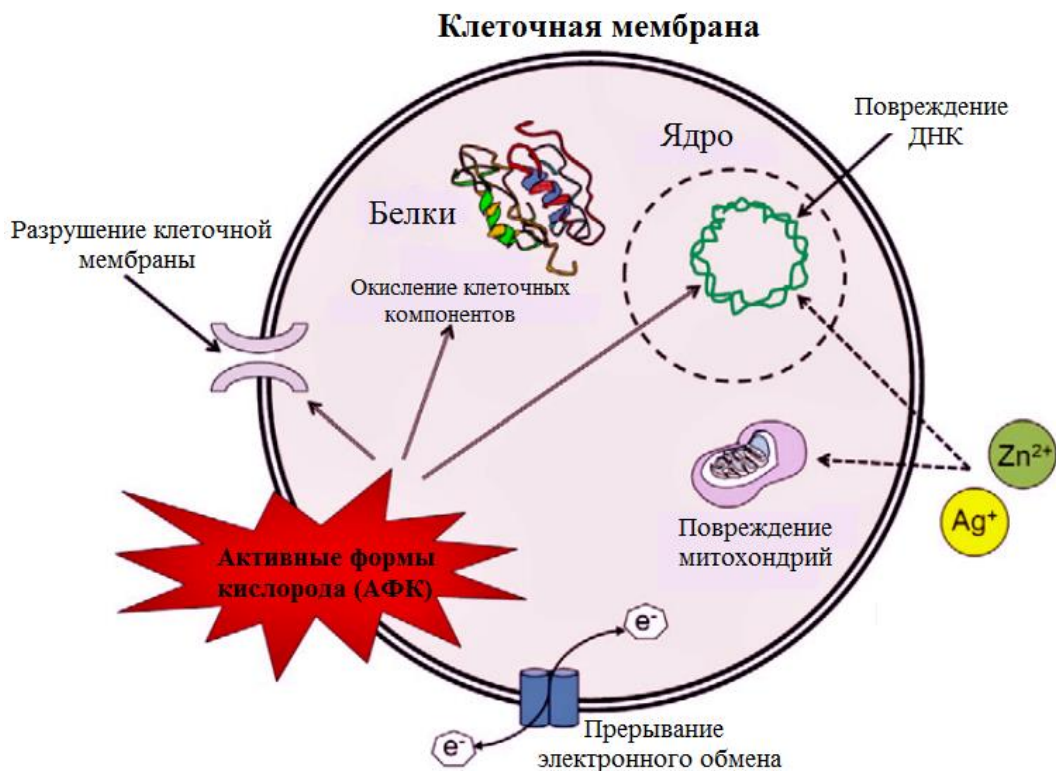


Рисунок 4 – Разрушение клетки активными формами кислорода (АФК)

[15]

Стоит отметить, что наночастицы металлов являются особенно токсичными для живых клеток: их ионы способны повреждать митохондрии, отвечающие за клеточное дыхание, и разрушать молекулы ДНК (см. рис. 4).

Существует еще несколько гипотез о причинах микробицидного действия наночастиц. Согласно одной из них клеточная мембрана разрушается из-за механического воздействия частицы на бактерию, однако здесь эффективность зависит от конкретных свойств поверхности наночастиц и дефектов, присутствующих на них. [16]

Также есть предположение, что клетка реагирует на наночастицу как на чужеродный объект, что влечет за собой естественное образование АФК в самой бактерии и ее последующее разрушение. Еще одной деструктивной реакцией клетки на появление чужеродного объекта является скопление лизосом (органелл, отвечающих за деградацию клеточных компонентов) у ее поверхности, что препятствует обмену веществ через клеточную мембрану. [17]

Механизм генерации активных форм кислорода на наночастицах не изучен в полной мере, однако объяснен для нескольких конкретных случаев. Например, известно, что наночастицы диоксида титана TiO_2 инактивируют микроорганизмы под действием ультрафиолетового/солнечного излучения. [18] В данном случае АФК образуются в результате реакции молекулы триплетного кислорода с положительными дырками, генерирующимися в кристаллической решетке TiO_2 . В момент, когда энергия фотона, передаваемая кристаллической решетке, равна ширине запрещенной зоны диоксида титана (или превышает ее), электрон переходит из валентной зоны в зону проводимости. Тогда триплетный кислород поглощает возбужденный электрон, предотвращая рекомбинацию электрон-дырочной пары, тем самым переходя в синглетное состояние.

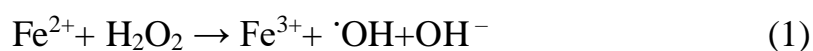
Другой подход, объясняющий генерацию АФК на наночастицах, основан на их фотосенсибилизационных свойствах и действии горячих электронов. Образование синглетного кислорода из его триплетного состояния с помощью фотовозбужденного сенсибилизатора требует изменения спина электрона, что может быть достигнуто с помощью электрон-обменного взаимодействия типа Декстера. [19] Этот обмен заключается в переносе электрона с одной из молекулярных орбиталей триплетного кислорода в фотогенерированную дырку

в сенсibilизаторе и одновременном переходе электрона с противоположным спином с высокоэнергетического уровня фотосенсibilизатора на ту же молекулярную орбиталь кислорода, что соответствует его синглетному состоянию.

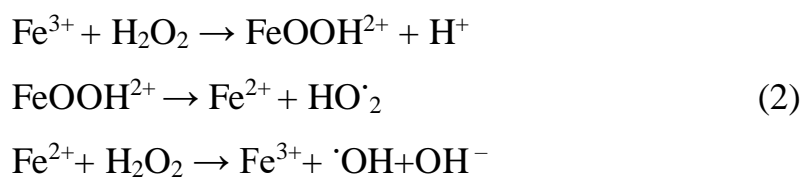
Этот механизм требует значительного перекрытия соответствующих электронных волновых функций и, следовательно, происходит только на коротких расстояниях не более 10 Å. Поскольку фотовозбужденные горячие электроны имеют короткое время жизни, эта реакция может происходить только в том случае, если молекула кислорода оказывается в непосредственной близости от наночастицы или временно адсорбируется на ее поверхности в момент возбуждения. [20]

Также было показано, что наночастицы железа Fe способны генерировать гидроксильные радикалы $\cdot\text{OH}$ вследствие реакции Фентона и фентоноподобных реакций. [21]

Реакция Фентона:



Фентоноподобные реакции:



В реакциях второго типа ионы железа Fe^{3+} сначала восстанавливаются до двухвалентного состояния Fe^{2+} , а уже затем следует реакция Фентона. Однако успешное протекание данных реакций и, следовательно, образование гидроксильного радикала зависит от свойств конкретной биологической среды (водородный показатель pH) и присутствия восстановителя.

1.2 Детектирование и методы генерации АФК на наночастицах

Как было замечено ранее, именно АФК обеспечивают антибактериальные свойства наночастиц. Несмотря на то, что непосредственный механизм генерации активных форм кислорода на наночастицах до конца не изучен, их присутствие в готовых препаратах было доказано множеством исследований. Одним из наиболее распространенных способов обнаружить синглетный кислород является метод химических ловушек. Как правило, для этих целей используют 1,3-дифенилизобензофуран (DPIBF). Например, для детектирования синглетного кислорода на золотых наночастицах были исследованы спектры поглощения DPIBF. [20] Известно, что DPIBF проявляет сильные абсорбционные свойства на длине волны 412 нм, однако обесцвечивается в присутствии синглетного кислорода, в связи с чем его поглощательная способность на данной длине волны резко падает. В рассматриваемом исследовании данный препарат непрерывно облучали светом с длиной волны 530 нм в отсутствии/присутствии золотых наночастиц в течение 60 минут. Полученные спектры поглощения представлены на рисунке 5. Очевидно, что во втором случае, в присутствии наночастиц, обесцвечивание DPIBF резко увеличивается, что говорит о наличии синглетного кислорода.

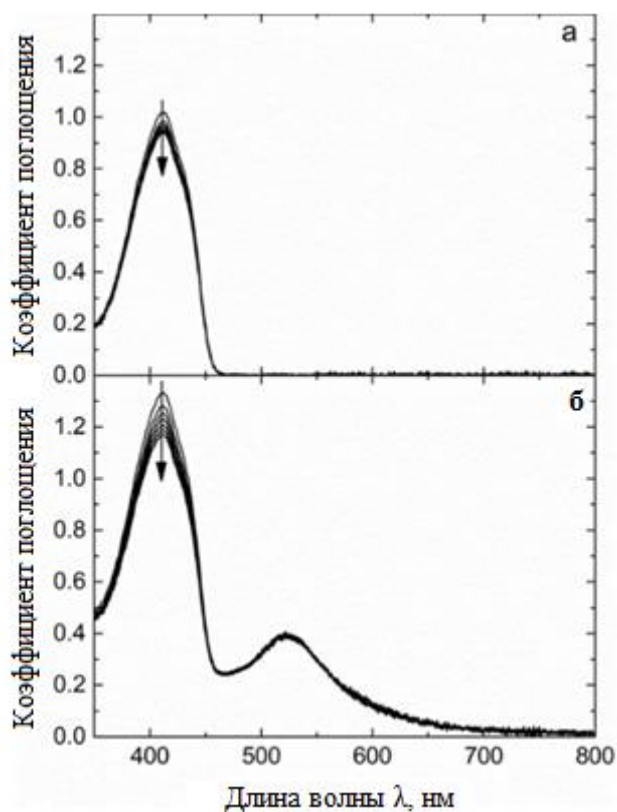


Рисунок 5 – Фотообесцвечивание оптической плотности DPIBF при непрерывном облучении светом с длиной волны 532 нм: (а) в отсутствие наночастиц и (б) в присутствии золотых наночастиц. Показаны спектры поглощения, снятые с интервалами от 10 до 60 минут облучения; стрелки указывают направление изменения коэффициента поглощения [20]

Интересно, что большую концентрацию АФК демонстрируют наночастицы больших размеров. В том же исследовании было проведено сравнение скорости обесцвечивания DPIBF в присутствии золотых наночастиц размером 15 и 46 нм. По результатам эксперимента, представленным на рисунке 6, видно, что наночастицы размером 46 нм содержат большее количество синглетного кислорода, так как фотообесцвечивание происходит быстрее. Можно предположить, что чем больше наночастицы, тем эффективнее будут проявляться их антибактериальные свойства.

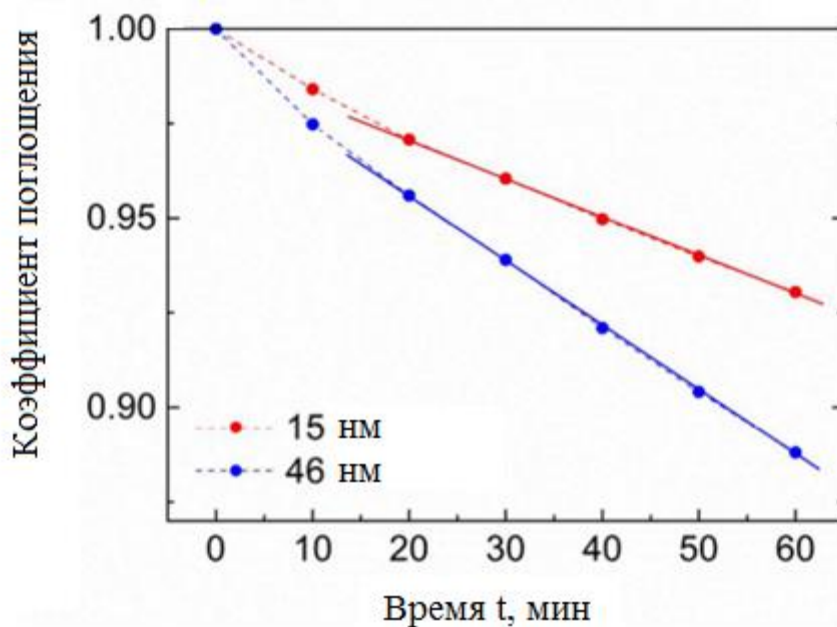


Рисунок 6 – Временная зависимость степени фотообесцвечивания DPBF, учитывающая влияние наночастиц размерами 15 нм и 46 нм [20]

Еще одним способом детектирования синглетного кислорода является изучение спектров фосфоресценции исследуемых наночастиц. В одном из исследований канадских ученых для этой цели использовались две системы, которые были оснащены лазерами накачки 523 нм и 266 нм.[22] Излучение из суспензии наночастиц кремния, помещенной в кварцевую кювету, собирали при 90 градусах к возбуждающему лучу с помощью фотоумножительной трубки РМТ, чтобы отслеживать сигнал излучения на разных длинах волн. Излучение от образца измерялось на пяти различных длинах волн с использованием фильтров с центрами при 1212 нм, 1240 нм, 1272 нм, 1304 нм и 1332 нм.

На рисунке 7 видно, что коллоидные растворы, содержащие наночастицы кремния, имеют пик фосфоресценции на длине волны 1270 нм, что соответствует первому синглетному состоянию кислорода.

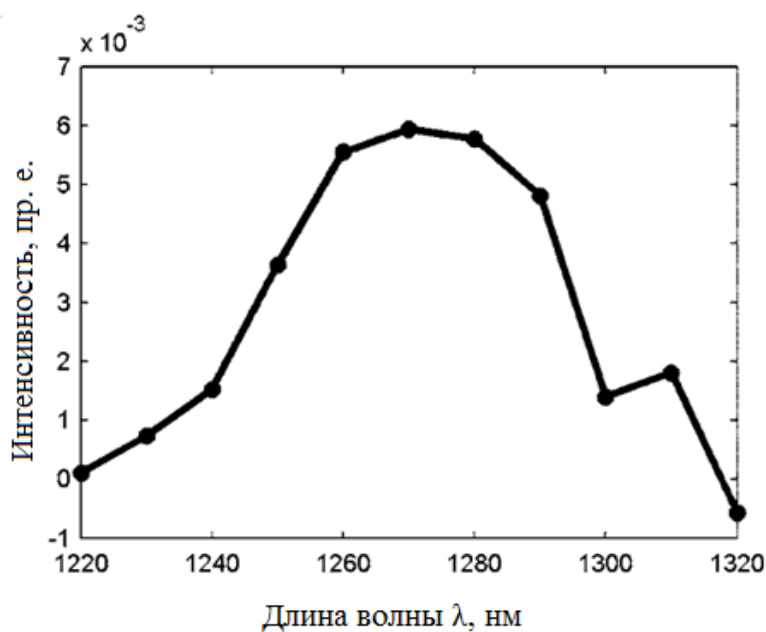


Рисунок 7 – Спектр флуоресценции коллоидного раствора наночастиц кремния, содержащих синглетный кислород [22]

Одним из самых первых способов генерации наночастиц является метод искрового разряда. Материал (металл), выполняющий роль электрода, помещается в инертный газ; сам процесс искрового разряда инициируется пробоем газа и образованием проводящего канала, а также диссоциацией и ионизацией молекул в течение короткого времени. Затем плазменный канал расширяется, образуется ударная волна, после чего носители заряда рекомбинируют и ударная волна ослабевает до звуковой. Появляющийся в течение этого процесса разряд состоит из тока, напрямую связанного с высокой температурой, вследствие чего материал электрода испаряется непосредственно вблизи искры. Далее следует быстрое охлаждение, которое происходит при температуре ниже точки кипения, и образование высокой концентрации наночастиц. [23] Схема генератора искрового разряда представлена на рисунке 8.

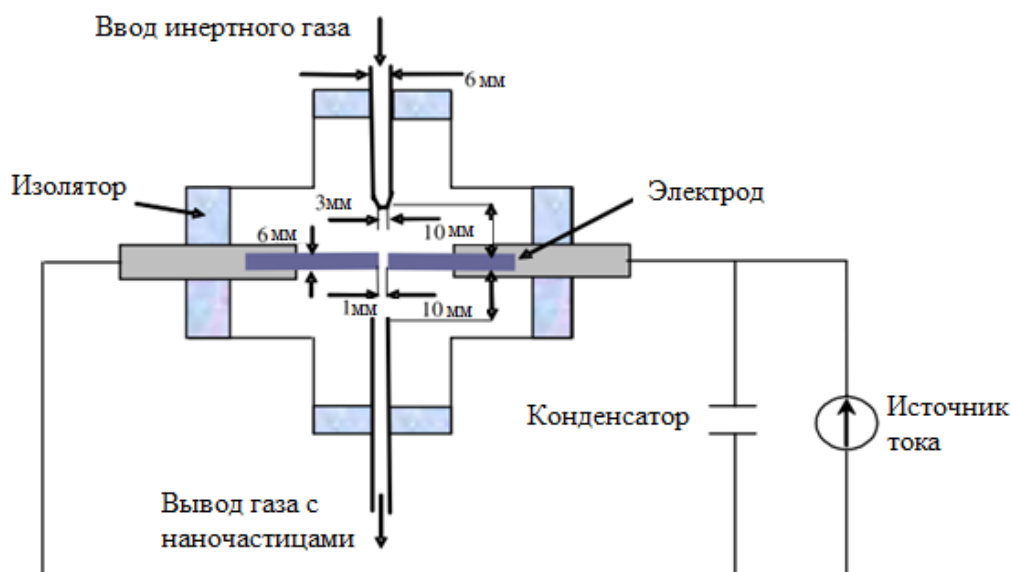


Рисунок 8 – Схема генератора искрового разряда [23]

Метод жидкой пропитки является другим способом генерации наночастиц. Для его реализации используют металлоорганические координационные полимеры (МОКП, пористые структуры, состоящие из ионов металлов, соединенных органическими молекулами). Например, для синтеза композитных наночастиц Au-Pd был выбран MIL-101 в качестве МОКП с привитым к нему этилендиамином ED (ED-MIL-101). [24] Активированный ED-MIL-101 (100 мг) пропитывали деионизированной водой (5 мл), содержащей HAuCl_4 (50 мг) и H_2PdCl_4 (50 мг), при 35°C в течение 24 часов, а затем синтезированный образец обрабатывают в потоке H_2/He (в пропорции 1:1) при 200°C в течение 3 часов для получения композита Au-Pd/ED-MIL-101. Исследование порошковой рентгеновской дифракции показало, что был образован однородный сплав Au-Pd, а из резкого уменьшения адсорбции азота N_2 и размеров пор в рассматриваемом композите следует, что полости каркаса-хозяина заняты наночастицами Au-Pd. [24]

Одним из наиболее распространенных способов генерации наночастиц является лазерная абляция материала под слоем жидкости. Когда мишень облучается лазерным пучком, плотность энергии которого превышает порог

абляции вещества, происходит непосредственно удаление материала с поверхности мишени в виде плазменного факела. Высокая температура приводит к ионизации и испарению воды на границе раздела факел-жидкость и образованию водяного пара, состоящего из атомарного и молекулярного водорода и кислорода (водяная плазма). Далее происходят реакции между этой водяной плазмой и плазмой аблируемого вещества. Особенностью метода лазерной абляции в жидкостях по сравнению с абляцией в вакууме или контролируемой газовой атмосфере является то, что факел расширяется адиабатически со сверхзвуковой скоростью внутри жидкости, в которую погружена мишень, он испытывает дополнительный эффект удержания в жидкости. Также возникает ударная волна на границе факел-жидкость, колеблющаяся внутри первого, что приводит к увеличению температуры, давления и плотности факела. Завершающим этапом является его затухание, после чего метастабильные фазы аблированного вещества «замерзают», тем самым синтезируя наночастицы. [25] На рисунке 9 рассматриваемый процесс изображен схематично на примере лазерной абляции титана Ti под слоем дистиллированной воды с образованием наночастиц оксида титана TiO.

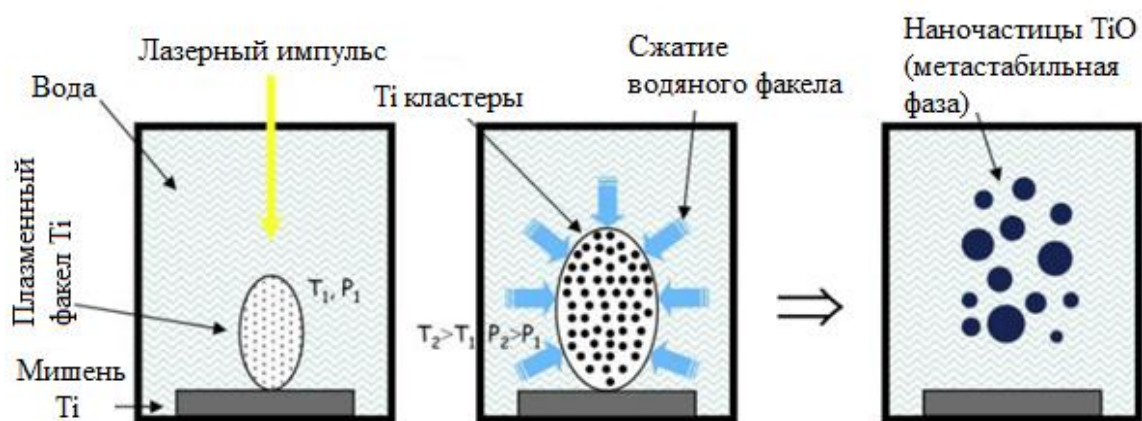


Рисунок 9 – Физические стадии генерации наночастиц TiO [25]

Преимуществами лазерной абляции под слоем жидкости как метода синтеза наночастиц являются следующие факторы:

- отсутствие загрязнения наночастиц химическими агентами;
- относительно недорогое оборудование;
- удобные сбор, хранение и транспортировка наночастиц в коллоидном растворе. [26]

Стоит обратить внимание на первый пункт, который говорит о том, что именно метод лазерной абляции является экологически дружелюбным (так называемый «Green synthesis»), что делает его особенно привлекательным для дальнейшего применения.

1.3 Проведенные исследования

Как отмечалось ранее, были проведены многочисленные исследования антибактериальных свойств наночастиц на различных штаммах бактерий. Чаще всего для этих целей использовались такие микроорганизмы, как *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие, вызывающие распространенные инфекции желудочно-кишечного тракта, кожные болезни, а также такие серьезные заболевания, как менингит, пневмония и т.д.

Металлические наночастицы изначально представляли большой интерес для исследования их антибактериальных свойств. Например, доказано микробицидное действие наночастиц оксида цинка ZnO, продемонстрированное на таких штаммах бактерий, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, и *Bacillus subtilis*. [4] В данном исследовании коллоиды были получены методом лазерной абляции под слоем жидкости, где в качестве последних были выбраны дистиллированная вода и этанол. Использовалось излучение основной гармоники Yb:YAG-лазера (длина волны 1064 нм, длительность импульса 7 нс, энергия импульса 200 мДж, частота следования импульсов 15 Гц, время воздействия 30 мин). Облучение фокусировалось короткофокусной линзой $F = 50$ мм на поверхности мишени через прозрачную боковую стенку стеклянного реактора. Концентрации дисперсий были

рассчитаны на основе целевой массы Zn и находились в диапазоне 0.5-0.6 г/л. Все образцы продемонстрировали высокую антибактериальную активность по отношению к трем выбранным штаммам бактерий.

В другом исследовании были изучены биметаллические наночастицы Ag-TiO₂, синтезированные также методом лазерной абляции в деионизированной воде с помощью пикосекундного лазера (длина волны 1064 нм, частота следования импульсов 200 КГц, энергия в импульсе 42-43.79 мДж, плотность энергии 0.342-0.357 Дж/см²). [3] Микробицидное действие полученных наночастиц проверялось на бактерии *Escherichia coli*, также известной как кишечная палочка. Исследование проводилось следующим образом: 200 мкл коллоидных наночастиц смешивали с 1.80 мл разбавленной кишечной палочки и инкубировали в течение 6 часов при 37°C при встряхивании со скоростью 225 об /мин. Наконец, 10 мкл каждого разведения распределяли по чашкам с лизогенным бульоном и оставляли при комнатной температуре при стандартном комнатном освещении в течение примерно двух дней (48 часов) с последующим подсчетом колоний на каждой чашке. Результаты подтвердили высокие антибактериальные свойства коллоидных растворов наночастиц Ag-TiO₂, причем их эффективность оказалась значительно выше, чем у полученных и исследованных в аналогичных условиях коллоидных растворов наночастиц TiO₂.

В целом, большая часть металлических наночастиц (ZnO, TiO₂, CuO, MgO, Al₂O₃, Ag и др) успешно демонстрировали свое микробицидное действие. [1-5]

Наночастицы селена Se успешно продемонстрировали свои антибактериальные свойства на таком штамме бактерий, как *Candida albicans*. [27] Синтез наночастиц проводился с использованием фемтосекундного лазера на Ti:сапфире (Mai-Tai HP от Spectra Physics) с длительностью импульса не более 100 фс и частотой повторения 80 ± 1 МГц. Длина волны составляла 800 нм при мощности 3 Вт. Лазерный пучок был направлен сверху в кювету, содержащую несколько объемных гранул селена, помещенных на дно кюветы в 2 мл деионизированной воды. На рисунке 10 представлены зависимости

степени ингибирующего действия наночастиц селена от их концентрации. Первый образец состоял из частиц, собранных сразу после непосредственного синтеза, второй – из наименьших наночастиц, отделенных путем центрифугирования, третий содержал кристаллические наночастицы (синтезированные были нагреты до 90°C в течение 2 часов, чтобы обеспечить фазовый переход от аморфного к тригональному). Видно, что наибольшей эффективностью обладает второй образец, состоявший из наименьших наночастиц.

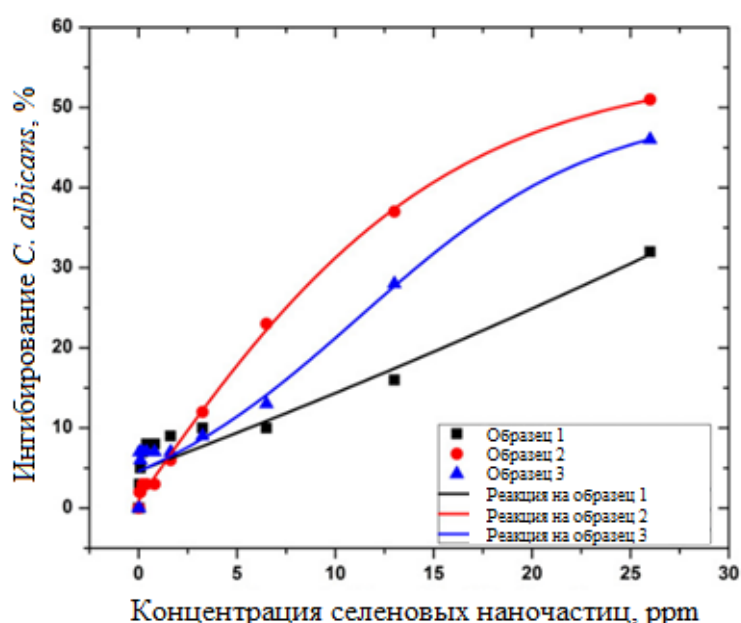


Рисунок 10 – Ингибирование сформированной биопленки *C. Albicans* селеновыми наночастицами. Образец 1 – синтезированные наночастицы; образец 2 – наименьшие наночастицы; образец 3 – кристаллизованные наночастицы [27]

Также селеновые нанокolloиды показали высокую степень ингибирования роста штаммов бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*. [28-30] В исследовании, проведенном на *E. coli*, коллоидные растворы были приготовлены следующим образом: чистый порошок селена был помещен на дно стеклянной кюветы и затем заполнен

жидкостью (деионизированная вода или этанол 99,5%) до верхней части кюветы (~4 мл). Была использована магнитная мешалка для обеспечения равномерного распределения порошка селена в растворе во время облучения. Лазер, использованный в этом эксперименте, представляет собой Yb:YAG-лазер с длиной волны 1064 нм с длительностью импульса 3.6 нс и частотой следования импульсов 10 Гц. Энергия в импульсе контролировалась в течение всего эксперимента и поддерживалась постоянной при импульсе $\sim 23 \pm 1$ мДж. При фокусировке эта энергия импульса соответствует плотности энергии ~ 2 Дж/см². Все образцы селеновых наночастиц показывают значительное ингибирование роста кишечной палочки через 8 и 24 ч. [28]

Коллоидные растворы наночастиц кремния Si, синтезированные методом лазерной абляции под слоем жидкости с использованием волоконного лазера (длина волны 1050 нм, длительность импульса 120 нс, частота следования импульсов 20 кГц), также демонстрируют свое микробицидное действие на таких штаммах бактерий, как *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. [30]

1.4 Выводы по обзору литературы

Все антибактериальные свойства наночастиц основаны на действии АФК, генерирующихся на них, причем самой распространенной формой является синглетный кислород. Именно АФК разрушают бактерию, воздействуя на нее несколькими путями одновременно: окисление клеточной мембраны и органелл, прерывание электронного обмена, повреждение молекул ДНК и т.д.

Высокую эффективность проявляют наночастицы металлов, однако присутствующие металлические ионы делают их биосовместимость минимальной. В то же время коллоидные растворы наночастиц селена Se и кремния Si также успешно демонстрируют свои антибактериальные свойства, высокую проникающую способность и биодоступность, что делает именно эти материалы привлекательными для дальнейших исследований.

Существует несколько способов генерации наночастиц, к которым относятся различные химические методы, метод искрового разряда и лазерная абляция под слоем жидкости. Именно последний способ относят к так называемому «Green synthesis», так как конечный коллоид не содержит каких-либо химических агентов. Более того, наночастицы, синтезированные в жидкости, уже готовы к транспортировке и удобны в своем хранении.

Целью данной работы является исследование возможности создания антибактериальных биосовместимых наночастиц методом лазерной абляции под слоем жидкости, что подразумевает выполнение следующих задач:

1. Анализ массового выхода наночастиц в зависимости от плотности мощности лазерного излучения;
2. Подбор режимов лазерного воздействия, обеспечивающих максимальную эффективность коллоидных растворов;
3. Выбор растворителей, на основе которых будут синтезированы наночастицы;
4. Проведение ряд тестов на различных штаммах бактерий, по результатам которых будет выявлено наличие/отсутствие антибактериальных свойств;
5. Определение наиболее эффективные коллоидные растворы.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Методика исследования и экспериментальные установки

Исследование было разделено на несколько этапов:

1. Анализ зависимости массового выхода наночастиц и соответствующий подбор режимов лазерного воздействия;
2. Синтез коллоидных растворов наночастиц Se, Si и гвоздики с помощью различных лазерных установок;
3. Синтез нанокolloидов на основе различных растворителей;
4. Проведение тестов на наличие антибактериальных свойств полученных коллоидов и определение наиболее эффективных из них.

Для проведения работы были использованы две лазерные установки: «Минимаркер - 2» (волоконный иттербиевый лазер, подробные характеристики приведены в таблице 1) и титан-сапфировый Ti:sapphire лазер.

Таблица 1 – Параметры лазерной установки «Минимаркер - 2»

Параметр	Значение
Длина волны λ , нм	1064
Длительность импульса τ , нс	8, 100, 200
Частота следования импульсов f , кГц	1.6 - 100
Максимальная мощность P , Вт	20
Максимальная энергия в импульсе E , мДж	1

Активным веществом второго лазера является кристалл сапфира, легированный ионами титана Ti^{3+} , длина волны излучения составляет 800 нм, длительность импульса 100 фс, частота следования импульсов 10 кГц, энергия в импульсе – 1 мДж.

В качестве мишеней использовались химически чистые образцы селена Se и кремния Si, а также высушенные нераскрывшиеся бутоны гвоздики, которые помещались на дно кюветы под слой жидкости. В качестве растворителей были выбраны дистиллированная вода, раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ), пероксид водорода и изопропанол. Толщина слоя жидкости над мишенью составляла 3 мм. Далее синтезировались коллоидные растворы методом лазерной абляции с использованием различных режимов облучения. Определенные коллоиды также фрагментировались для проверки гипотезы об их большей антибактериальной активности.

Готовые коллоиды исследовались совместно с Санкт-Петербургским НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Изучали действие на 4 штамма бактерий с различными биологическими свойствами и строением клеточной стенки (референтные штаммы): *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*. Рост бактерий или его отсутствие регистрировали двумя методами: по оптической плотности и путем посева на плотные питательные среды и подсчета выросших через 24 часа колоний.

2.2 Исследование массового выхода наночастиц кремния.

Для определения режима, обеспечивающего наиболее высокую эффективность генерации наночастиц, было проведено исследование зависимости массового выхода кремниевых наночастиц за импульс от плотности мощности используемого излучения.

Образец кремния, находившийся под слоем дистиллированной воды, облучался «Минимаркером – 2» с частотой следования импульсов 2 кГц, скоростью сканирования 400 мм/с, длительностью импульса 200 нс и энергиями в импульсе 0.15, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9 и 1 мДж. Сканирование проводилось по квадрату 5х5 мм с плотностью 10 лин/мм.

На рисунке 11 представлены результаты эксперимента, показавшие, что наибольший массовый выход приходится на 150-200 МВт/см², что соответствует энергии в импульсе 0.6-0.8 мДж. В связи с этим дальнейший синтез кремниевых наночастиц проводился при значении $E_{\text{имп}} = 0.6$ мДж.

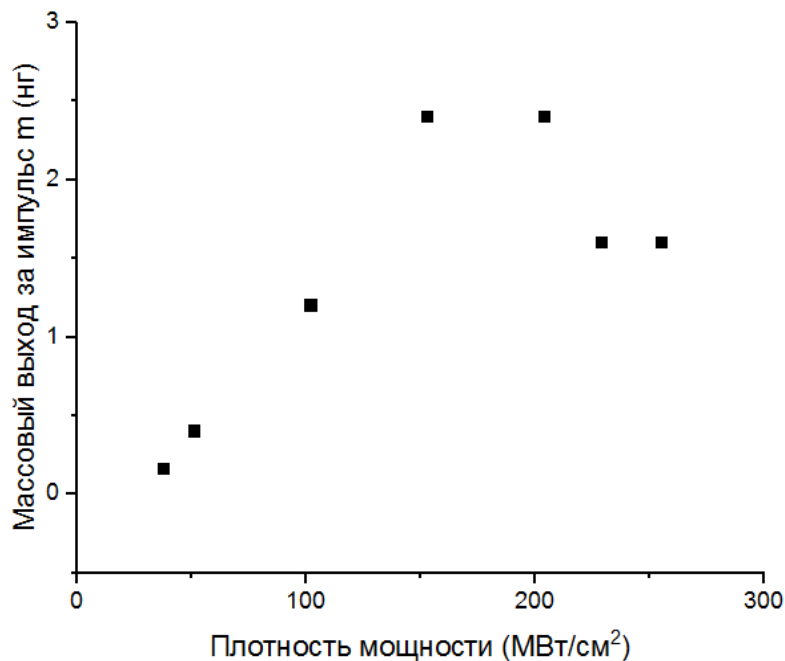


Рисунок 11 – Зависимость значений массового выхода наночастиц Si за импульс от плотности мощности

2.3 Синтез коллоидных растворов наночастиц кремния, селена и гвоздики

На первом этапе были синтезированы 6 коллоидных растворов (3 на основе Se и 3 на основе Si). Использовались ранее описанные лазерные установки, в качестве растворителя в данном случае была выбрана дистиллированная вода (объем 3 мл, что для данных кювет соответствовало 3 мм слоя жидкости над мишенью). Для каждого материала были приготовлены по два первичных коллоида на различных лазерах (800 нм и 1064 нм) и по одному фрагментированному коллоиду (1064 нм). Режимы приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Режимы лазерного воздействия для синтеза коллоидных растворов наночастиц Si и Se

Режимы		Si	Se
Первичный коллоид №1, $\lambda=800$ нм	Длительность импульса τ , фс	100	100
	Частота f , кГц	10	10
	Длительность воздействия, мин	40	40
	Энергия $E_{\text{имп}}$, мкДж	630	630
Первичный коллоид №2, $\lambda=1064$ нм	Длительность импульса τ , нс	200	200
	Частота f , кГц	4	4
	$E_{\text{имп}}$, мДж	1	0.2
	Скорость сканирования, мм/с	200	200
Фрагментация коллоида №2, $\lambda=1064$ нм	Длительность импульса τ , нс	200	200
	Частота f , кГц	10	10
	$E_{\text{имп}}$, мДж	1	0.2
	Скорость сканирования, мм/с	1000	1000

Далее были получены коллоиды наночастиц кремния, в которых в качестве растворителей были выбраны дистиллированная вода, раствор ПЭГ 3.7%, пероксид водорода 3%, изопропиловый спирт и раствор глюкозы 5%. Все коллоиды были получены с использованием установки «Минимаркер – 2». Режимы лазерного воздействия для получения первичных коллоидов приведены в таблице 3.

Определенные растворы кремниевых наночастиц (полученные на основе дистиллированной воды и раствора ПЭГ) прошли фрагментацию (режимы указаны в таблице 4). Сканирование проводилось по спирали размером 10x10 мм.

Таблица 3 – Режимы лазерного воздействия для получения первичных кремниевых коллоидов

Параметр	Значение
Длина волны λ , нм	1064
Частота f , кГц	10
Скорость сканирования v , мм/с	500
Энергия $E_{\text{имп}}$, мДж	0.6
Длительность импульса τ , нс	200

Таблица 4 – Режимы фрагментации кремниевых коллоидов

Жидкость	Дистиллированная вода	Раствор ПЭГ
Длительность импульса τ , нс	200	200
Мощность в импульсе $E_{\text{имп}}$, мДж	0.6	1
Частота следования импульсов f , кГц	20	30
Скорость сканирования v , мм/с	1000	1500
Количество проходов	2000	1500

Также были получены коллоидные растворы наночастиц селена и гвоздики на основе дистиллированной воды с использованием лазерной установки «Минимаркер – 2» (частота следования импульсов 10 кГц, скорость сканирования 200 мм/с, энергия в импульсе 1 мДж, длительность импульса 200 нс).

2.4 Оптические свойства и морфология синтезированных коллоидных растворов наночастиц гвоздики, Se и Si

Для изучения оптических свойств синтезированных коллоидов были получены их спектры пропускания. На рисунке 12 представлены соответствующие спектры растворов наночастиц гвоздики, Se и Si, приготовленных на основе дистиллированной воды при энергии в импульсе 1

мДж (гвоздика и селен) и 0.6 мДж (кремний). Видно, что наночастицы селена хорошо поглощают на всем видимом диапазоне излучения, в отличие от кремниевого коллоида, демонстрирующего высокое пропускание, и наночастиц гвоздики, обладающих высокой поглощательной способностью только в ультрафиолетовом диапазоне излучения.

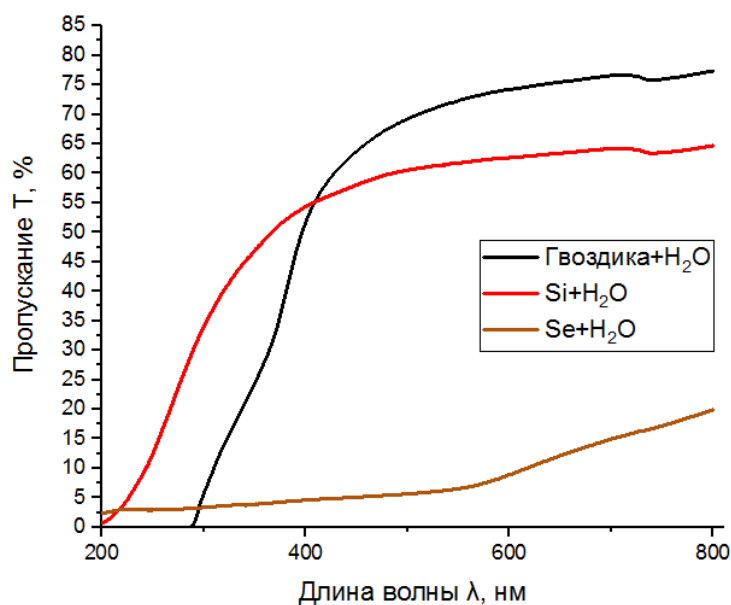


Рисунок 12 – Спектры пропускания коллоидных растворов наночастиц гвоздики, кремния и селена, полученных лазерной абляцией в дистиллированной воде

Также были получены спектры пропускания растворов наночастиц кремния, синтезированных на основе различных жидкостей (см. параграф 2.3) (рис. 13). Из данных спектров видно, что фрагментированные коллоиды (Si+H₂O) обладают большей пропускательной способностью по сравнению с первичными.

Рисунок 14 иллюстрирует спектры пропускания одного и того же коллоида наночастиц кремния на основе раствора ПЭГ на различных этапах фрагментации. Видно, что резкое увеличение пропускания наблюдается уже после 500 проходов, однако после 750 сканирований оптические свойства растворов практически не меняются.

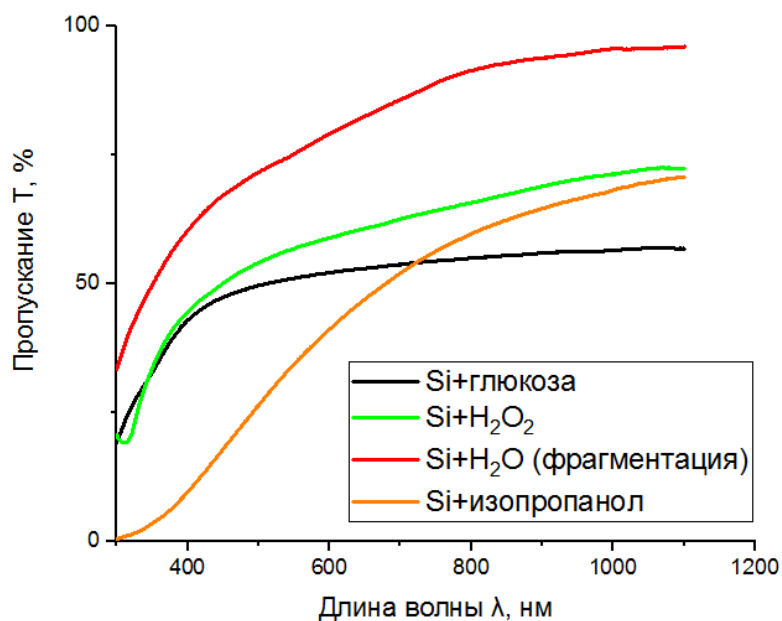


Рисунок 13 – Спектры пропускания коллоидных растворов Si на основе различных жидкостей; кремниевый коллоид на основе дистиллированной воды является фрагментированным

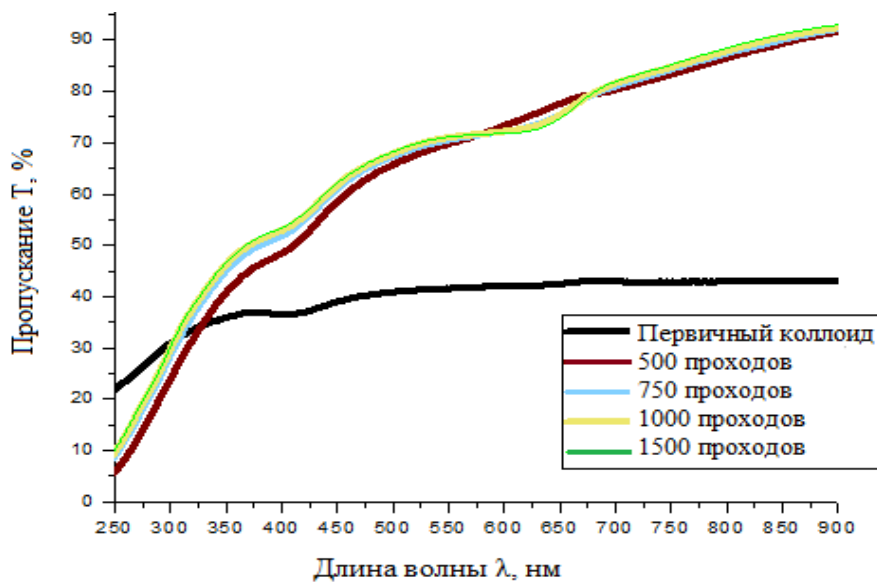


Рисунок 14 – Спектры пропускания коллоида наночастиц кремния, полученного путем лазерной абляции под слоем раствора ПЭГ на различных этапах фрагментации

Морфология наночастиц кремния представлена на рисунке 15 SEM-снимком (электронная микроскопия) и графиком их дисперсии по размерам (для измерений была использована программа ImageJ).

Видно, что пик дисперсии приходится на размер частиц в диапазоне 400-600 нм.

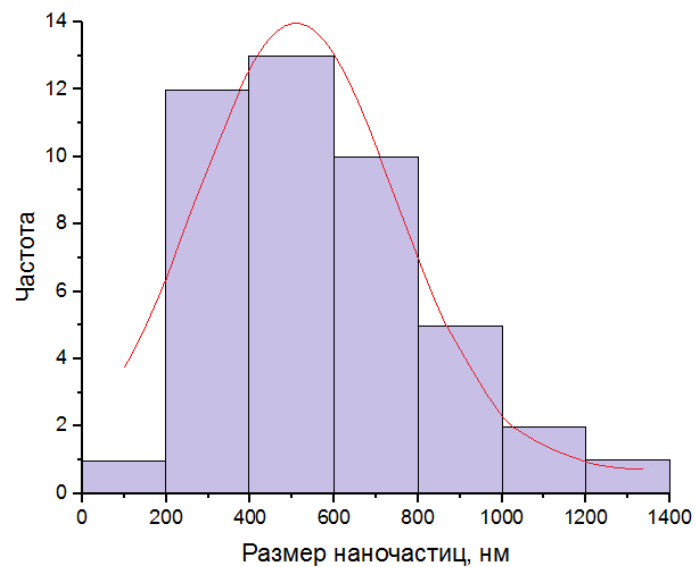
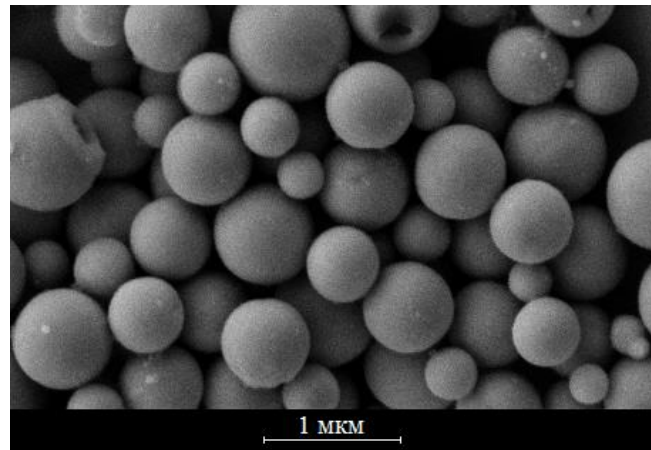


Рисунок 15 – Морфология кремниевых наночастиц (SEM-снимок) и график их распределения по размерам

2.5 Исследование антибактериальных свойств коллоидных растворов наночастиц гвоздики, Se и Si

Готовые растворы с наночастицами разводились с бактериальной взвесью ($1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, колониеобразующих единиц) в пропорции 1:10. Изучали действие на различных референтных штаммах бактерий, как грамположительных (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*), так и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, и *Enterobacter cloacae*), отличающихся друг от друга строением клеточной стенки (рис.16).

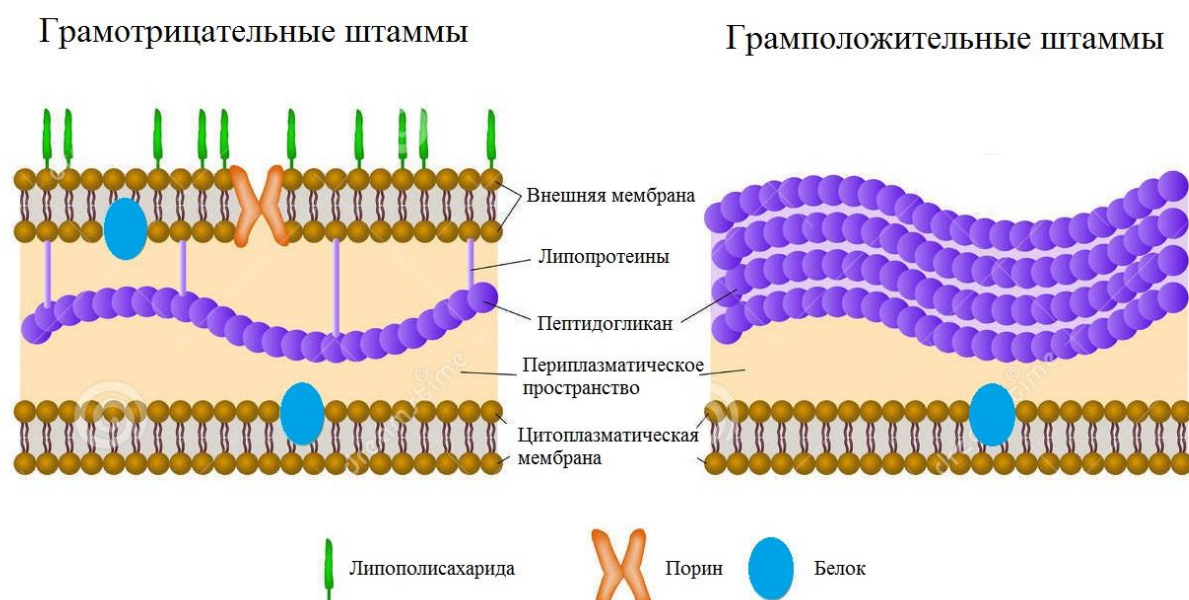


Рисунок 16 – Строение клеточных мембран грамотрицательных и грамположительных бактерий [31]

Микробицидное действие полученных коллоидов определяли по наличию или отсутствию роста бактерий. Разведенные с бактериальными взвесями растворы помещали в питательные среды, причем высевы делали через 5 и через 60 минут экспозиции бактерий с раствором частиц. Подсчет роста бактерий был совершен через 24 часа после проведения высевок.

Результаты первых тестов показали, что образцы кремниевых и селеновых коллоидов, полученных с помощью Ti:sapphire-лазера, являются менее активными по сравнению с другими, что связано с низкой производительностью наночастиц на этой установке. Для селена образцы №2 и его фрагментированный вариант продемонстрировали одинаково невысокую эффективность (см. табл. 1, рис. 17), а вот в случае с кремнием первичный коллоид №2, полученный на лазерной установке «Минимаркер – 2» с длиной волны 1064 нм, показал лучшие результаты, чем раствор с фрагментированными наночастицами (рис. 18).

В целом, все коллоиды на основе кремния продемонстрировали более высокие антибактериальные свойства к грамотрицательным штаммам бактерий.

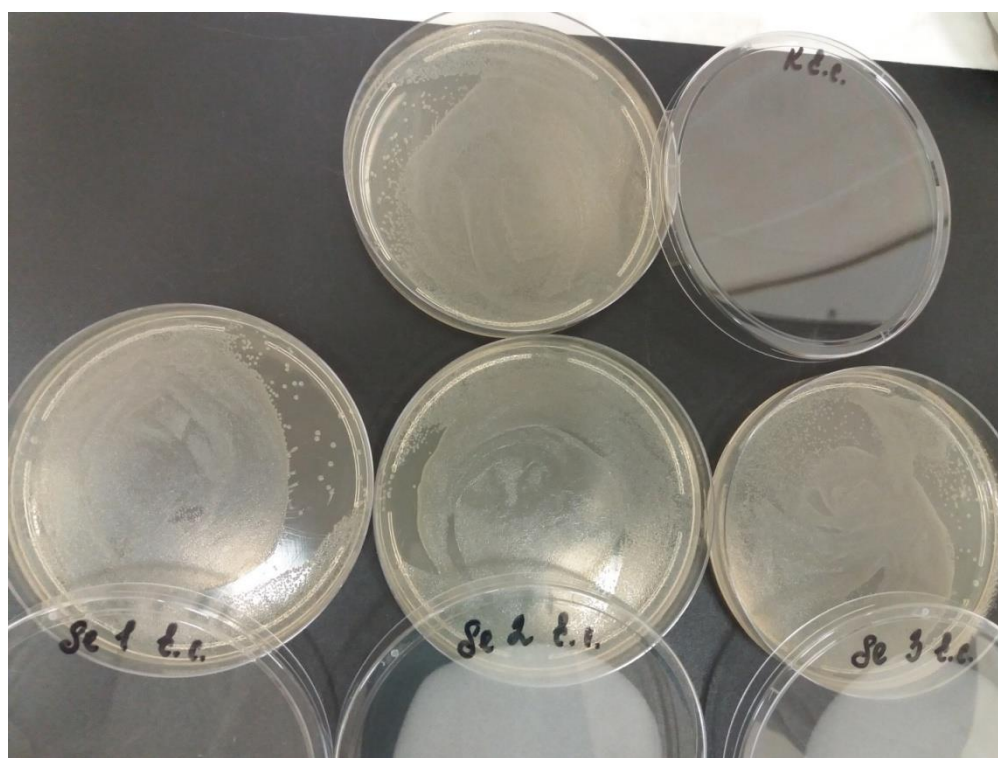


Рисунок 17 – Бактериальные колонии, выросшие через 24 часа после высева на питательные среды в присутствии коллоидных растворов наночастиц селена; слева направо: первичный коллоид №1, первичный коллоид №2, фрагментированный коллоид селеновых наночастиц (см. таблицу 2); верхний образец – выросшие колонии в отсутствие наночастиц

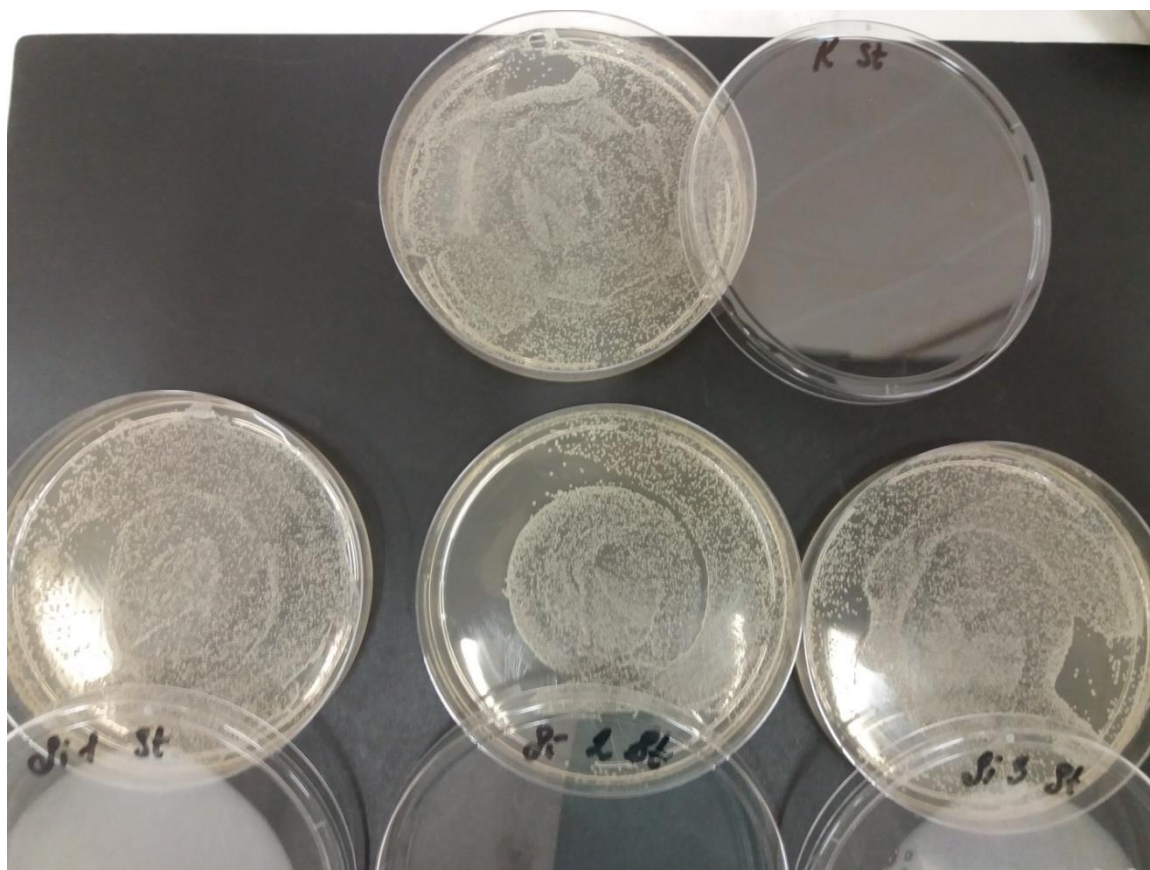


Рисунок 18 – Бактериальные колонии, выросшие через 24 часа после высева на питательные среды в присутствии коллоидного раствора наночастиц кремния; слева направо: первичный коллоид №1, первичный коллоид №2, фрагментированный коллоид (см. таблицу 2); верхний образец – выросшие колонии в отсутствие наночастиц

Микробицидное действие синтезированных на основе различных жидкостей кремниевых коллоидов проверялось тем же методом, что и на первом этапе (высев бактериальных взвесей, смешанных с полученными растворами, на питательные среды). Исследуемыми штаммами бактерий являлись *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, и *Enterobacter cloacae*. Результаты показали, что более эффективными оказались коллоиды, в которых растворителем являлась дистиллированная вода, причем первичный коллоид снова показал самую высокую активность по сравнению с другими. В таблице 5 приведены значения размеров зон задержки роста бактерий – чем она больше, тем эффективнее коллоид (основа – дистиллированная вода).

Таблица 5 – Размер зоны задержки роста бактерий, мм (коллоидный раствор наночастиц кремния на основе дистиллированной воды)

Штамм бактерий	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ac. baumannii</i>	<i>Ent. cloacae</i>
Первичный коллоид Si	10	9	5
Фрагментированный коллоид Si	0	9	0

Были проведены аналогичные тесты на грамположительных бактериях (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*), продемонстрировавшие высокую антибактериальную активность наночастиц селена и гвоздики. На рисунке 19 проиллюстрировано наличие областей, в которых бактерии не растут: область «С» соответствует гвоздике, а «Se» - селену.



Рисунок 19 – Антибактериальное действие наночастиц гвоздики (на фото «С») и селена Se на грамположительную бактерию *Staphylococcus aureus*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были исследованы антибактериальные свойства наночастиц селена, кремния и гвоздики, синтезированных методом лазерной абляции в жидкости, на таких штаммах бактерий, как *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*. Были использованы лазерные установки с длинами волн 800 нм и 1064 нм.

Результаты показали, что образцы, полученные на установке «Минимаркер – 2» (волоконный иттербиевый лазер с длиной волны 1064 нм), обладают большей эффективностью.

Наиболее высокие антибактериальные свойства по отношению к грамотрицательным бактериям проявили кремниевые наночастицы, а к грамположительным – наночастицы селена и гвоздики.

Предполагалось, что фрагментированные образцы будут обладать более высоким микробицидным действием, однако по результатам эксперимента было определено, что первичные коллоиды лучше обеспечивают задержку роста бактериальных штаммов.

Список литературы

1. Longano D. Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging/ Longano D., Ditaranto N., Cioffi N., Di Niso F., Sibillano T., Ancona A., Conte A., Del Nobile M., Sabbatini L., Torsi L.// Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2012. - № 403 - 1179-1186 с.
2. Fidel M. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles/ Fidel M., Peggy L., Banuelos A., Orrantia E., Nino N., Elpidio M.S., Ruiz F., Bach H., Av-Gay Y.// Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine – 2010. - №6 –681-688 с.
3. Hamad A. Picosecond Laser Generation and Modification of Ag-TiO₂ Nanoparticles for Antibacterial Application: A thesis submitted to The University of Manchester for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in the Faculty of Science and Engineering – 2016. – 91-107 с.
4. Svetlichnyi V. ZnO Nanoparticles Obtained by Pulsed Laser Ablation and Their Composite with Cotton Fabric: Preparation and Study of Antibacterial Activity/ Svetlichnyi V., Shabalina A., Lapin I., Goncharova D., Nemoykina A.// Applied Surface Science – 2016. – №32 – APSUSC
5. Fahim H. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives/ Fahim H., Oscar J., Sangchul H., Felix R. // Science of the Total Environment – 2014 - №466-467 – 1047-1059 с.
6. Linlin W. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future/ Linlin W., Chen Hu, Longquan S.// International Journal of Nanomedicine – 2017. - №12 – 1227–1249 с.
7. В.И. Донцов. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении/В.Н. Крутько, Б.М. Мрикаев, С.В. Уханов // Труды ИСА РАН – 2006. – №19 –50-69 с.
8. Синглетный кислород: токсические эффекты для клеток [Электронный ресурс].// Биология и медицина. – Режим доступа: <http://medbiol.ru/medbiol/microbiol/000f1f3a.htm>

9. Овечкин А.С. Определение синглетного кислорода с хемосорбционной конверсией в аскариндол: Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук: 02.00.02/ Овечкин Андрей Сергеевич. – 2015. – 142 с.
10. Синглетный кислород [Электронный ресурс].// Химия – Просто. – 2016. – <https://www.youtube.com/watch?v=nyXEDKb5KDY>
11. Apel K. Reactive oxygen species : Metabolism , Oxidative Stress , and Signal Transduction/ Apel K. Hirt H. // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – №55 – 373–399 с.
12. Iyer, G. Y. N. Biochemical Aspects of Phagocytosis / Iyer, G. Y. N. , Islam, M. F., Quaslel, J. H.// Nature. – 1961. – №192 – 535-541 с.
13. Sbarra A.J. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes/ Sbarra A.J., Karnovsky M. L. //J. Biol. Chem. – 1959. – №234 – 1355-1362 с.
14. LoVelle Beaman. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense/ LoVelle Beaman, Blaine L. Beaman// Ann. Rev. Microbiol. – 1984. – №38 – 27-48 с.
15. Ae Jung Huh. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era/ Ae Jung Huh, Young Jik Kwon// Journal of Controlled Release. – 2011. – №156 – 128–145 с.
16. Svetlichnyi V. ZnO nanoparticles obtained by pulsed laser ablation and their composite with cotton fabric: Preparation and study of antibacterial activity/ Svetlichnyi V., Shabalina A., Lapin I., Goncharova D., Nemoykina A.// Applied Surface Science. – 2016. - №372 – 20-29 с.
17. Soenen S. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles : Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity/ Soenen S., Rivera-gil P., Montenegro J., Parak W., Smedt S., Braeckmans K.// Nano Today. – 2011. - №6 – 446-465 с.
18. Hossain F. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives/ Hossain F., Perales-Perez O., Hwang S., Román F.// Science of the Total Environment. – 2014. – №466-467 – 1047-1059 с.
19. Kovalev D. Silicon Nanocrystals: Photosensitizers for Oxygen Molecules/ Kovalev D., Fujii M.//Advanced Materials. – 2005. - №17 – 2531-2544 с.

20. S. Chadwick. Singlet oxygen generation by laser irradiation of gold nanoparticles/ Chadwick, Samantha J., Salah, D.Livesey, Penelope M., Brust, Mathias V.// *Journal of Physical Chemistry C*. – 2016. - №120 – 10647-10657 c.
21. Feng W. Physicochemical Origin for Free Radical Generation of Iron Oxide Nanoparticles in Biomicroenvironment: Catalytic Activities Mediated by Surface Chemical States/ Feng W.// *The journal of physical chemistry*. – 2013. - № 117 – 383–392 c.
22. Rioux D. Silicon nanoparticles produced by femtosecond laser ablation in water as novel contamination-free photosensitizers/ Rioux D., Laferrière M., Douplik A., Shah D., Lilge L., Kabashin A., Meunier M.// *Journal of Biomedical Optics*. – 2009. - №14 – 021010-1 - 021010-5 c.
23. Tabrizi N. Generation of nanoparticles by spark discharge/ Tabrizi N., Ullmann M., Vons V., Lafont U., Schmidt-Ott A.// *Journal of Nanoparticle Research*. – 2009. - №11 – 315-332 c.
24. Gu X. Synergistic catalysis of metal-organic framework-immobilized au-pd nanoparticles in dehydrogenation of formic acid for chemical hydrogen storage/ Gu X., Lu Z., Jiang H., Akita T., Xu Q.// *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. - №133 – 11822-11825 c.
25. Semaltianos N. Laser ablation in water : A route to synthesize nanoparticles of titanium monoxide/ Semaltianos N., Logothetidis S., Frangis N., Tsiaoussis I., Perrie W., Dearden G., Watkins K.// *Chemical Physics Letters*. – 2010. – №496 –113-116 c.
26. O.V. Overschelde. Green synthesis of selenium nanoparticles by excimer pulsed laser ablation in water/ O.V. Overschelde, G. Guisbiers // *APL Materials*. – 2013. - №4. – 042114 c.
27. Guisbiers G. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by pure selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids/ Guisbiers G., Lara H., Mendoza-Cruz R., Naranjo G., Vincent, Brandy A., Peralta X., Nash K.// *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2017. - №13 - 1095-1103 c.

28. Guisbiers G. Anti-bacterial selenium nanoparticles produced by UV/VIS/NIR pulsed nanosecond laser ablation in liquids/ Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E., Arellano-Jimenez M., Webster T., Larese-Casanova P., Nash K.// *Laser Physics Letters*. – 2015. – №12 – 16003 с.
29. Shakibaie M. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*/ Shakibaie M., Forootanfar H., Golkari Y., Mohammadi-Khorsand T., Shakibaie M.// *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2015. - №29 - 235-241 с.
30. Nastulyavichus A. Antibacterial coatings of Se and Si nanoparticles/ Nastulyavichus A., Kudryashov S., Smirnov N., Saraeva I., Rudenko A., Tolordava E., Ionin A., Romanova Y., Zayarny D.// *Applied Surface Science*. – 2019. - №469 – 220-225 с.
31. Грамположительные и грамотрицательные бактерии [Электронный ресурс].// Dreamstime.com. – 2015. – <https://ru.dreamstime.com>