Письма в ЖЭТФ, том 121, вып. 4, с. 321 – 329 © 2025 г. 25 февраля

Влияние микрочастиц селена, меди и серебра, полученных в вязких жидкостях, на выживаемость грамположительных и грамотрицательных бактерий[1)]

И. Н. Сараева[+ 2)], Э. Р. Толордава[+], Р. А. Хмельницкий[+], С. Н. Шелыгина[+], Д. С. Позднякова[*], А. А. Настулявичус[+], Е. Н. Римская[+], А. Е. Рупасов[+]

[+]Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН, 119991 Москва, Россия

[*]Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", 115409 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10 декабря 2024 г.
После переработки 13 декабря 2024 г.
Принята к публикации 13 декабря 2024 г.

В работе проведен мультипараметрический анализ эффекта антибактериальных наногелей на основе нано- и (суб)микрочастиц серебра, меди и селена на примере одно- и многокомпонентных биопленок грамположительных бактерий Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, а также грамотрицательных бактерий Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae и Pseudomonas aeruginosa. Основу наногелей составляют глицерин, силиконовое масло и вазелин, которые являются биосовместимыми материалами с низкой себестоимостью, подходящими для использования в раневых повязках. Активными компонентами являются бактерицидные наночастицы Ag, Cu и Se. Наногели, а также их эффект на перечисленные биопленки, исследованы стандартными микробиологическими посевами, а также методами инфракрасной Фурье спектроскопии с последующим анализом главных компонент. В результате обработки биопленок наногелями наблюдалось снижение популяции бактерий до 99 %. Анализ главных компонент продемонстрировал возможность дифференциации жизнеспособных бактерий от нежизнеспособных.

DOI: 10.31857/S0370274X25020245, EDN: NDZSWF

1. Введение. При возникновении ран практически сразу происходит их обсеменение патогенными микроорганизмами, в связи с чем инфекционно-воспалительные осложнения являются серьезной проблемой в медицине. Возникающие осложнения затормаживают заживление ран, а также могут привести к необходимости применения интенсивной антибиотикотерапии, что ухудшает общее состояние пациента, и представляют риск мутации штамма с приобретением им резистентности к данному типу антибиотика. При длительных осложнениях может произойти образование биопленок в ранах. Биопленки представляют собой бактериальные сообщества, находящиеся в экзополимерной матрице [1, 2], которая обеспечивает оптимальные условия их существования и дополнительную защиту от используемых антибиотиков – даже если препарат обладает высокой эффективностью против планктонной культуры того или иного типа, он может не оказать влияния на тот же тип бактерий в виде биопленки. Так, образование биопленок может привести к снижению эффективности или полному нивелированию лечения, а также к появлению незаживающих ран.

В настоящее время бактерии приобретают резистентность к ряду антибиотиков, в связи с чем актуальным становится поиск бактерицидных агентов, исключающих подобную мутацию. Наночастицы (НЧ) являются хорошей альтернативой современным антибиотикам, и обладают доказанной эффективностью в борьбе как с планктонными формами бактерий, так и с одно- и многокомпонентными биопленками [3, 4]. Современные исследования проводятся с использованием следующих основных методов получения НЧ – химического синтеза, использования экстрактов растений и методом лазерной абляции (ЛА) в жидкости [5–8]. Популярность данных методов обоснована их простотой, хорошей стабильностью получаемых НЧ и экологичностью. Так, все больше работ появляется на тему генерации НЧ методом использования экстрактов растений и даже бактерий. К недостаткам данных методов можно отнести сложность подготовки экстрактов (сбор растений, помол, выделение экстракта), а также разделение бактериальных культур и полученных НЧ. К недостаткам химического синте-

[1)]См. дополнительный материал к данной статье на сайте нашего журнала www.jetpletters.ac.ru

[2)]e-mail: saraevain@lebedev.ru

за можно отнести токсичность некоторых реагентов и сложность очистки результирующего коллоидного раствора. В отличие от данных методов, ЛА в жидкости является универсальным способом одностадийного получения НЧ в ряде различных растворителей. Механизмы образования НЧ в процессе ЛА исследуются уже несколько десятилетий [9, 10]. НЧ широкого спектра материалов были получены в различных средах с использованием лазерных систем с фемто-, пико- и наносекундной длительностью импульсов [11, 12]. Тем не менее фемто- и пикосекундные лазеры отличаются высокой себестоимостью и зачастую – сложностями настройки и содержания, в связи с чем использование промышленных наносекундных маркеров, не требующих длительной подготовки специализированных кадров для работы с ними, является более выгодным и простым решением.

Механизм образования НЧ в процессе ЛА импульсами наносекундной длительности детально изучен. К основным стадиям можно отнести образование плазмы и пузыря над поверхностью аблируемой мишени, формирование НЧ в процессе расширения и схлопывания пузыря, образование коллоидного раствора и взаимодействие НЧ с последующими лазерными импульсами (фрагментация), и во многом динамика расширения и схлопывания пузыря обоснована вязкостью окружающей жидкости.

Существует большое количество работ, в которых описано образование НЧ в деионизированной воде и спиртах [13, 14], однако наработка НЧ в вязких жидкостях мало освещена в литературе [15]. Тем не менее одностадийная генерация НЧ, обладающих сильным бактерицидным эффектом (серебро, медь, селен), в вязких средах является многообещающим методом быстрого и эффективного получения наногелей, потенциально применимых в качестве аппликационного лечения хронических раневых инфекций.

В данной работе представлен мультипараметрический анализ эффекта антибактериальных наногелей на основе НЧ и (суб)микрочастиц серебра, меди и селена на примере одно- и многокомпонентных биопленок грамположительных бактерий Staphylococcus aureus (SA), Staphylococcus epidermidis (SE), а также грамотрицательных бактерий Escherichia coli (EC), Klebsiella pneumoniae (KP) и Pseudomonas aeruginosa (PA) на клеточную мембрану и вторичную структуру белков. Основу наногелей составляют глицерин, силиконовое масло и вазелин, которые являются широко распространенными, биосовместимыми и недорогими материалами, также подходящими для использования в раневых повязках. Активными компонентами являются токсичные НЧ Ag, Cu и Se. Наногели, а также их эффект на перечисленные биопленки исследованы стандартными микробиологическими посевами, а также методами инфракрасной (ИК) Фурье спектроскопии и анализа главных компонент (Principal component analysis, PCA).

2. Методика эксперимента. Выбранные основы для наногелей включали в себя глицерин (дистиллированный, пищевая добавка E442, "Glycerine Solutions"), вазелин (Megacos Co., Ltd, Gyeonggi-do), силиконовое масло (техническая силиконовая смазка ПМС-100, "Компрек"). В качестве дополнительных сред для сравнения антибактериального эффекта использовались деонизированная вода и изопропиловый спирт (IPA).

Одностадийная генерация наногелей была возможна в глицерине, силиконовом масле, воде и IPA. Перед абляцией вазелина производился его нагрев с помощью паяльного фена при температуре 226 °C, в результате чего происходило его расплавление и повышение прозрачности.

Массивные мишени Ag (чистота 99.999 %), Cu (чистота 99.99 %) или Se (чистота 99.999 %) располагались в стеклянной кювете под 2-мм слоем деонизированной воды, IPA, глицерина, силиконового масла или расплавленного вазелина, после чего лазерная система HTF MARK с длиной волны 1064 нм и длительностью импульса 120 нс использовалась для генерации НЧ. Лазерное излучение фокусировалось на поверхность мишени с помощью F-theta объектива (фокусное расстояние $F = 70$ мм) в пятно диаметром ≈ 50 мкм, после чего производилось сканирование луча со скоростью 500 мм/с, частотой повторения импульсов 20 кГц, энергией в импульсе 0.9 мДж, с областью сканирования 15×10 мм^2, заполнением 10 линий/мм, числом проходов 600. В случае генерации НЧ в вазелине повышение температуры, вызванное поглощением лазерного излучения, было достаточным для сохранения его прозрачности и жидкого состояния.

Полученные коллоидные растворы НЧ в воде, изопропиловом спирте, глицерине и силиконовом масле были охарактеризованы методом спектроскопии пропускания ультрафиолетового-видимого диапазонов. Характеризация растворов, полученных в вазелине, осуществлялась визуально. Анализ НЧ методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Tescan) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) производился после высушивания коллоидов НЧ на полированных пластинках кремния.

Биопленки SA, SE, EC, KP, PA были выращены с использованием ночной бульонной культуры бактерий каждого типа, разведенных в соотношении 1:100 в среде Лурия–Бертани (Miller, AppliChem). По 2 мл разведенной культуры распределялось в 24-луночных планшетах, после чего в каждую лунку помещались круглые подложки CaF_2 ($d = 1$ см) или Au пленки, напыленные на кремниевые подложки (0.8×0.8 см^2) методом магнетронного напыления в среде аргона. Для получения многокомпонентных биопленок в лунку добавлялось по 2 мл бактериальных культур различных типов. Планшет помещался в термостат, и культивирование биопленок производилось при температуре 37 °C в течение 48 ч. Для дальнейшего спектроскопического анализа питательный бульон удалялся с подложек с биопленками путем трехкратного смыва физиологическим раствором.

Фурье-ИК спектры регистрировались с использованием ИК спектрофотометра V-70 (Brucker) в диапазоне 800–3500 см$^{-1}$ с разрешением 4 см$^{-1}$ в вакуумной камере с диафрагмой 2 мм. Для измерения спектров ИК пропускания использовались подложки CaF_2, для измерения спектров отражения – золотые пленки, напыленные на кремниевые пластинки. До 5 спектров было записано для 5 образцов каждого типа, с итоговым количеством спектров для каждого типа образца до 25. После регистрации спектров производился пересчет спектров пропускания в оптическую плотность, спектров отражения – в спектры поглощения, и осуществлялась их нормировка на линию α-спиралей в амиде I 1654 см$^{-1}$ [16].

Усредненные обработанные ИК спектры для каждого образца аппроксимировались с помощью функции Лоренца,с использованием OriginPro:

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2}, \tag{1}$$

где $H = 2 \cdot A/(\pi \cdot w)$ – высота пика; A – площадь под кривой; w – ширина полосы (FWHM); x_c – положение максимума (центральная частота в см$^{-1}$); y_0 – фоновый сигнал.

Обнаружение полос (скрытых пиков) осуществлялось путем определения локальных максимумов второй производной со сглаживанием Савицкого–Голея. Найденные значения (положения максимумов второй производной x_c) фиксировались, после чего все пики аппроксимировались лоренцевым приближением (1), в результате чего были получены значения ширины полосы w и площади под кривой A. Разброс данных значений (стандартное отклонение) оценивался программой в соответствии с оценкой уровня шума и величиной остаточной ошибки. Анализ линии амида I, на интенсивность которой производилась нормировка спектров, оставался возможным в силу влияния ширины линии на общую площадь под кривой.

Анализ методом главных компонент (PCA-анализ) осуществлялся с использованием программного обеспечения OriginPro. Сглаженные и нормированные спектры ИК оптической плотности разделялись на два диапазона: 1150–1800 см$^{-1}$ (область спектральных "отпечатков пальцев") и 2750–3250 см$^{-1}$ (область молекулярных колебаний мембранных белков и липидов). Для каждого диапазона спектральных данных производился PCA-анализ с выделением 4 компонент, после чего строились зависимости нагрузок компонент PC1 (Principal component 1) от PC2 (Principal component 2). Нагрузки описывают связь переменных с компонентами, и вклад переменных в изменчивость вдоль компоненты тем сильнее, чем больше модуль их нагрузки. Знак нагрузки означает направление изменения исходной переменной вдоль главной компоненты, поэтому далее коэффициенты PC1 изображались в виде графика с абсциссой, соответствующей волновым числам, и выделялись положительные и отрицательные нагрузки PC1, коррелирующие со спектрами вторых производных и отвечающие за классификацию жизнеспособных и нежизнеспособных бактерий.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Характеризация НЧ. Спектры оптической плотности в УФ-видимом диапазоне чистого глицерина и силиконового масла не имели видимых особенностей. Спектры Ag, Cu и Se НЧ в воде, IPA, глицерине и силиконовом масле представлены на рис. 1.

НЧ серебра демонстрируют пик, соответствующий плазмонному резонансу в области 400 нм. В глицерине данный пик расположен на длине волны 414 нм, в силиконовом масле – на 412 нм, в IPA – 400 нм. Обычно сдвиг резонансного пика в области больших длин волн свидетельствует об увеличении среднего диаметра НЧ. НЧ меди демонстрируют пик 653 нм в воде, 580 нм – в глицерине, широкое крыло в области 550–650 нм в силиконовом масле, 580 нм – в IPA. Спектры оптической плотности НЧ селена во всех используемых средах демонстрируют широкие полосы поглощения в области 300–400 нм. Наличие пиков плазмонного резонанса во всех полученных коллоидах доказывает формирование НЧ в растворителях.

Согласно характеризации с помощью СЭМ, все полученные частицы обладают сферической формой

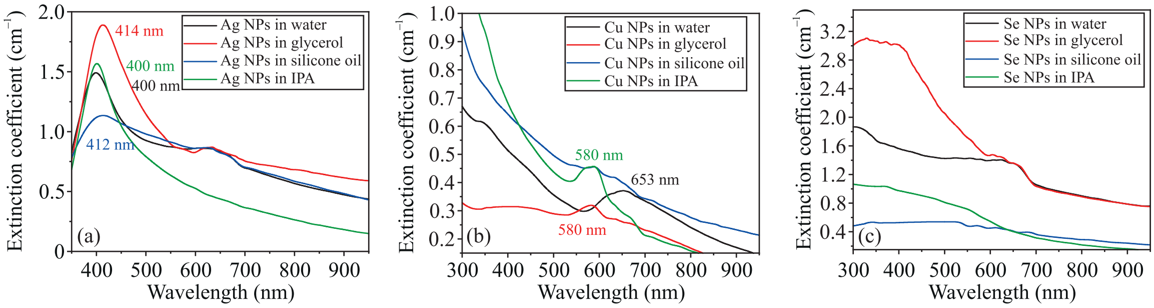

Рис. 1. (Цветной онлайн) Спектры коэффициента экстинкции в УФ-видимом диапазонах коллоидов НЧ Ag (a), Cu (b) и Se (c) в деионизированной воде (черные линии), глицерине (красные линии), силиконовом масле (синие линии), и IPA (зеленые линии)

(дополнительные материалы, рис. S1–S6), кроме НЧ селена, полученных в силиконовом масле (рис. 2), которые представляли собой конгломераты наноигл. В большинстве случаев НЧ, полученные в органических средах, демонстрируют высокое содержание углерода (дополнительные материалы, табл. S1–S6).

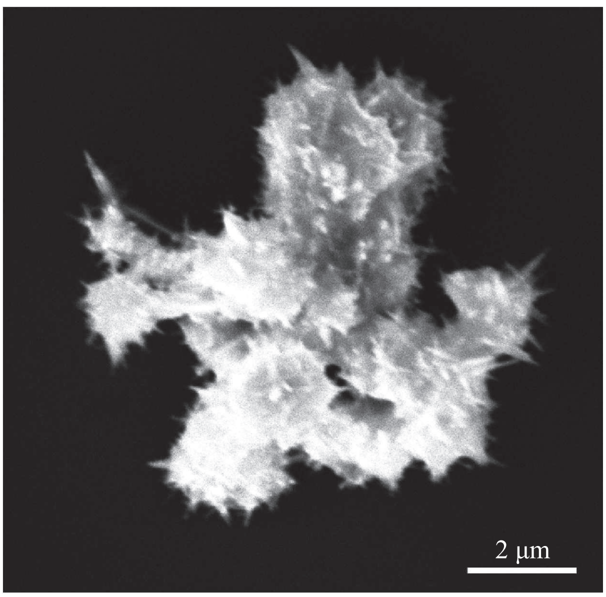

Рис. 2. СЭМ-изображение НЧ селена, полученных методом ЛА массивной мишени в среде силиконового масла

Размеры частиц варьировались от нано- до (суб)микромасштабных фракций (табл. 1).

Согласно полученным данным, лазерно-абляционное получение НЧ в силиконовом масле приводит к формированию (суб)микрочастиц. Также микроразмерные фракции наблюдаются после абляции в изопропиловом спирте, что связано с нестабильностью полученных растворов и быстрой агрегацией НЧ.

Коллоиды НЧ золота, серебра, меди и селена, полученные в среде вазелина, представлены на рис. S7 в дополнительных материалах. Видно, что цвет коллоидов соответствует плазмонным резонансам в серебре, золоте и меди, а также цвету НЧ селена, получаемых в других растворителях (рис. S7a). Визуализация НЧ с помощью оптического микроскопа подтверждает образование субмикрочастиц селена в среде вазелина (рис. S7b).

3.2. Микробиологические исследования антибактериального эффекта НЧ. Анализ эффективности на биопленках осуществлялся с использованием штаммов SA, PA, EC, SE, KP и их комбинаций SA + SE + PA, SE + EC и EC + KP. Первым этапом производилось выращивание биопленок на подложках CaF_2 и Au пленках, напыленных на пластинках кремния (раздел 2). Затем подложки помещались в стерильные 24-луночные планшеты, наполненные наногелями, и выдерживались в течение 1 ч, после чего производился смыв и высев бактерий с определением числа КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в миллилитре). Гели без НЧ не проявляли бактерицидного эффекта, тогда как снижение популяции бактерий после обработки гелями с НЧ серебра, меди и селена достигало 99 % (рис. 3).

Эффективность НЧ серебра, меди и селена в воде была показана ранее и подтвердилась в наших экспериментах. Ag НЧ, полученные в глицерине, также показали хороший антибактериальный эффект – популяция бактерий снизилась на четыре порядка в SE, на два – в PA и KP. В комбинированных биопленках эффект достигал трех порядков. Снижение КОЕ/мл после обработки Ag НЧ, полученными в силиконовом масле, в среднем составляло один порядок. НЧ Cu в глицерине подавляли рост бактерий от одного (EC, SE + EC) до двух порядков (SE, PA, EC + KP). Обработка биопленок наночастицами меди в силиконовом масле была менее эффективной и приводила

Таблица 1. Размеры частиц,определенные методом динамического рассеяния света

Тип коллоида	Размерная фракция 1, нм	Размерная фракция 2, нм	Размерная фракция 3, нм
Ag НЧ в воде	7.2	96	
Ag НЧ в изопропаноле	6.1	129	1853.5
Ag НЧ в глицерине	35		
Ag НЧ в силиконовом масле			1394.9
Cu НЧ в воде	18.5	469	
Cu НЧ в изопропаноле	2.97		
Cu НЧ в глицерине	2.39	84.7	
Cu НЧ в силиконовом масле		542.3	
Se НЧ в воде	38.2	315.3	
Se НЧ в изопропаноле	2.81		7579.1
Se НЧ в глицерине		62.7	
Se НЧ в силиконовом масле			3065.4

к снижению значений КОЕ/мл на один порядок в SE, PA, SE + EC, EC + KP. НЧ селена в глицерине снижали популяцию на один порядок в SA, PA, EC, SA + SE + PA, EC + KP. Наибольший эффект наблюдался в SE и KP – на три и четыре порядка соответственно. Обработка биопленок НЧ селена в силиконовом масле привела к снижению КОЕ/мл на три порядка в SA и SA + SE + PA, на два – в SE, EC, KP, EC + KP. Таким образом, эффективность НЧ при их генерации в вязких средах сохранялась и даже увеличивалась в случае селена.

3.3. Анализ антибактериального эффекта НЧ методом ИК спектроскопии. Данные бактериологических посевов иллюстрировались ИК спектроскопией пропускания и отражения (дополнительные материалы, табл. S7). После обработки ИК спектров оптической плотности и поглощения были получены значения положений пиков x_c, их ширины на 0.5 высоты FWHM и площади под кривой A. Значения FWHM и площади построены в виде контурного 2D графика (рис. 4), на абсциссе которого контрольные (необработанные) биопленки обозначены аббревиатурами соответствующих бактерий: S.aureus, S.epidermidis, P.aeruginosa, E.coli, K.pneumoniae, S.epidermidis + E.coli,S.aureus + S.epidermidis + P.aeruginosa, E.coli + K.pneumoniae. Биопленки, обработанные НЧ серебра, обозначены аббревиатурой названий соответствующих бактерий с добавлением названий НЧ: "Ag", "Cu", "Se". Ось ординат представляет собой обозначения молекулярных колебаний, которым соответствуют ИК полосы. Таким образом,отслеживается изменение площадей (рис. 4a, c) и ширин пиков (рис. 4b, d) бактерий до обработки (SA, SE, PA, EC, KP, SE + EC, SA + SE + PA, EC + KP), после обработки НЧ серебра (SA Ag, SE Ag, PA Ag, EC Ag, KP Ag, SE + EC Ag, SA + SE + PA Ag, EC + KP Ag), после обработки НЧ меди (SA Cu, SE Cu, PA Cu, EC Cu, KP Cu, SE + EC Cu, SA + SE + PA Cu, EC + KP Cu) и после обработки НЧ селена (SA Se, SE Se, PA Se, EC Se, KP Se, SE + EC Se, SA +SE + PA Se, EC + KP Se).

Методом ИК-Фурье спектроскопии можно обнаружить несколько возможных антимикробных механизмов: НЧ способны изменять "текучесть" клеточной мембраны путем связывания с группами –CH в липидах (область 3100–2800 $см^{-1}$); НЧ или ионы, высвобождаемые из НЧ, связываются с аминокислотами в белках, что изменяет их структуру и отражается в ИК спектрах в диапазоне 1500–1800 $см^{-1}$; НЧ влияют на фосфатные группы нуклеиновых кислот в ДНК или РНК, что приводит к разрушению их структуры, и изменения в спектрах наблюдаются в диапазоне волновых чисел 600–1200 $см^{-1}$; обработка НЧ приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), которые могут вызывать изменения в структурах полисахаридов в диапазоне волновых чисел 900–1200 $см^{-1}$ [17].

Согласно полученным данным, площадь пиков, соответствующих молекулярным колебаниям C–C и PO_2 в ДНК и РНК в спектрах поглощения увеличилась после обработки НЧ биопленок SA, SE, PA. В биопленках EC и KP площадь уменьшилась, также как во всех комбинированных биопленках. Пики, соответствующие колебаниям C–O, C–N, C–C, N–H в ДНК/РНК обладают изначально большими интенсивностями во всех образцах, и их площадь уменьшается после обработки НЧ серебра в биопленках SA, SE, PA, KP, SE + EC, SA + SE + PA. Уменьшение площади может свидетельствовать о разрушении молекулярной структуры нуклеиновых кислот [18]. Экзополимеры представлены пиками C–OH, C–O, и их площадь растет после обработ-

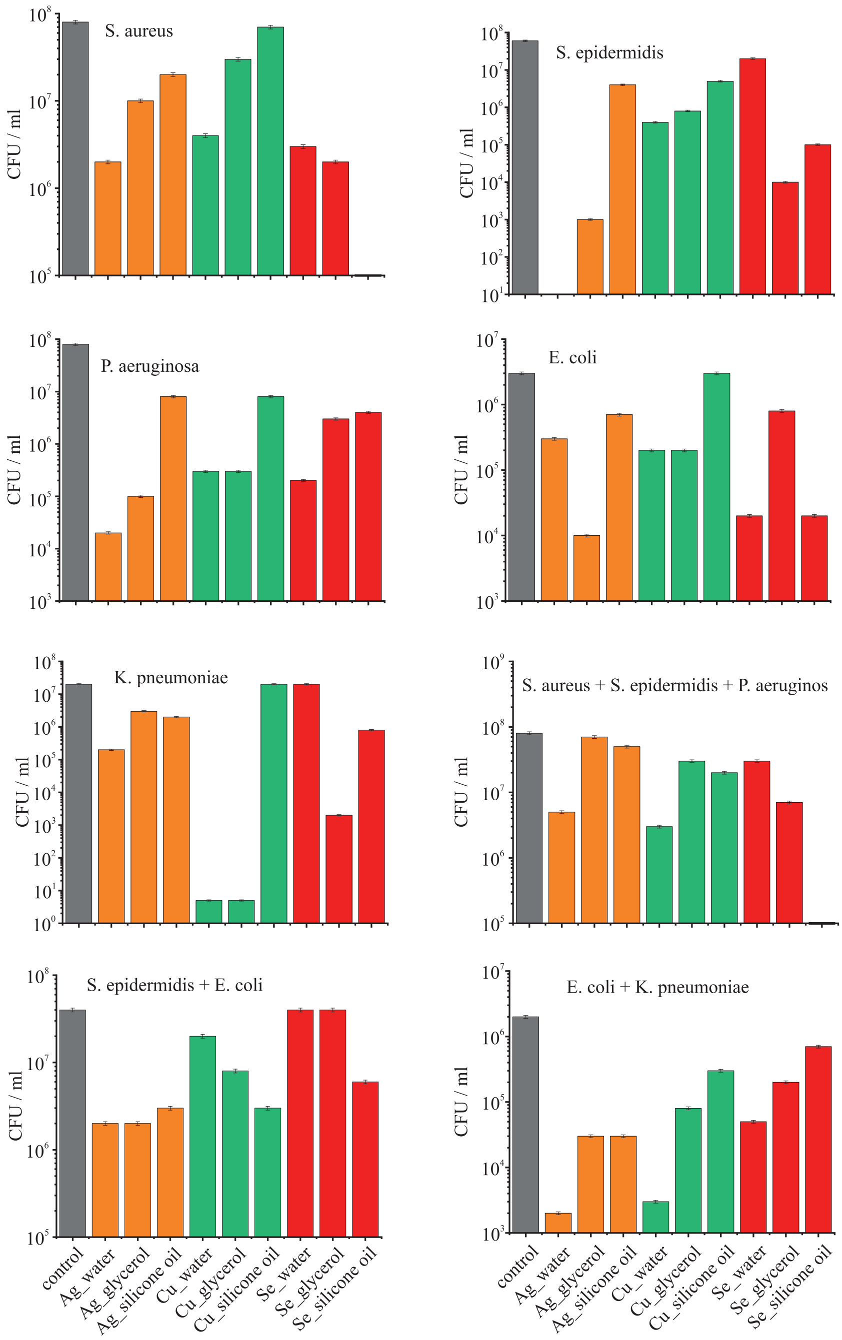

Рис. 3. (Цветной онлайн) Жизнеспособность бактериальных одно- и многокомпонентных биопленок в значениях КОЕ/мл: без обработки НЧ (серые столбики “control”) и после аппликации НЧ серебра (оранжевые столбики), меди (зеленые столбики) и селена (красные столбики) в воде, глицерине и силиконовом масле

ки, в большей степени – для НЧ серебра. В комбинированных биопленках SA + SE + PA изменений нет. Отношение площадей пиков A_{1150}/A_{1680} отражает вклад углеводородов C–O в экзополимерной матрице к белкам (амид I) [19]. Оно растет в SA, SE, EC, KP, SE + EC после обработки НЧ, что может свидетельствовать о более интенсивной выработке экзополимеров в качестве защитной реакции на враждебную окружающую среду, тогда как уменьшение пика в PA говорит об эффективном разрушении матрицы. В остальных комбинированных биопленках значительных изменений не наблюдается.

К основным пикам, соответствующим молекулярным колебаниям белков, можно отнести тирозин и амиды I и II. Наиболее значимые изменения претер-

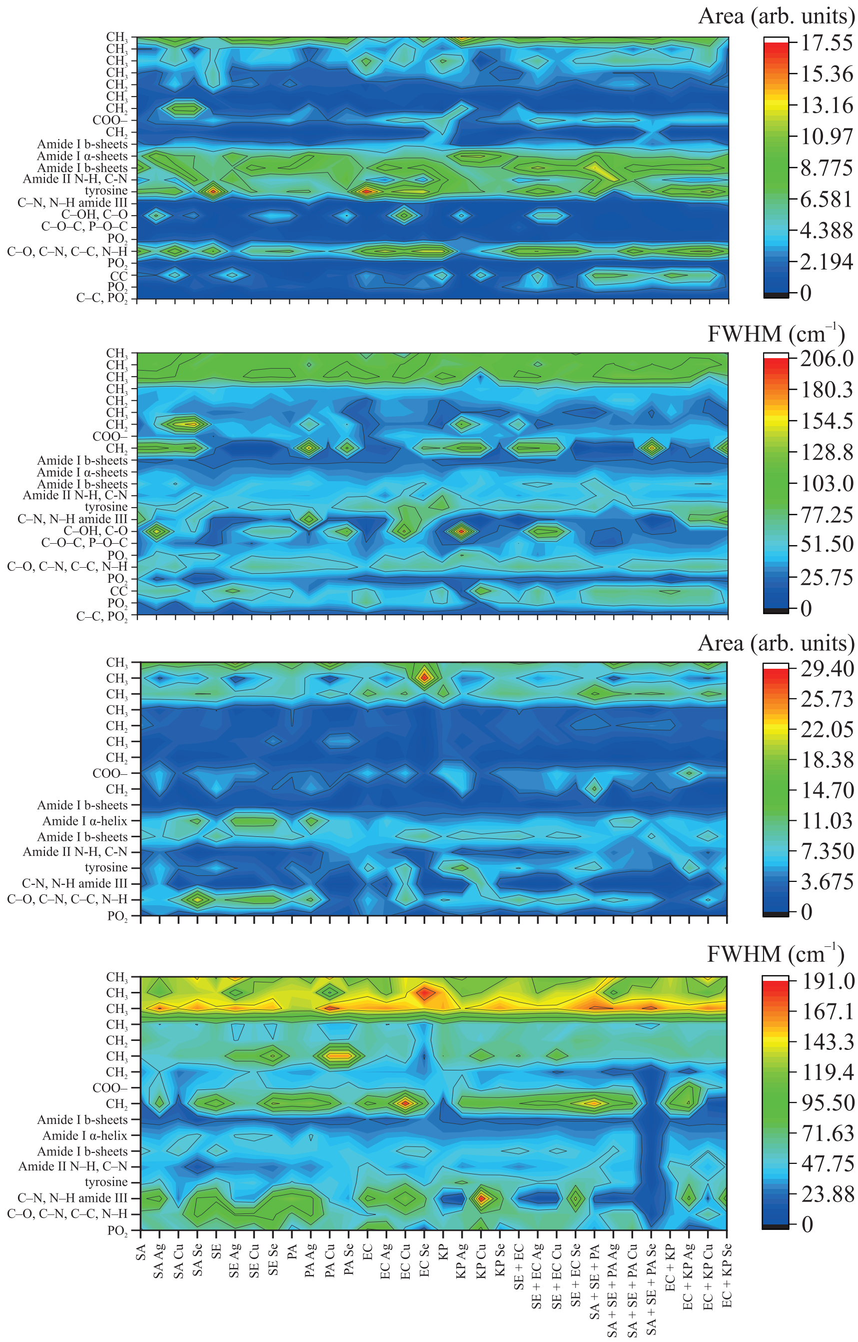

Рис. 4. (Цветной онлайн) 2D контурный график распределения площади (a), (c) и FWHM (b), (d) пиков ИК поглощения (a), (b) и оптической плотности (c), (d), соответствующих различным молекулярным колебаниям (ось ординат) для бактериальных биопленок до и после обработки НЧ серебра, меди и селена (ось абсцисс). Контрольные (необработанные) биопленки обозначены аббревиатурами соответствующих бактерий: SA – S.aureus, SE – S.epidermidis, PA – P.aeruginosa, EC – E.coli, KP – K.pneumoniae, SE + EC – S.epidermidis + E.coli, SA + SE +PA – S.aureus + S.epidermidis + P.aeruginosa, EC +K P – E.coli + K.pneumoniae. Биопленки, обработанные НЧ серебра, обозначены аббревиатурой соответствующих бактерий с добавлением "Ag", НЧ меди – "Cu", НЧ селена – "Se"

певают пики тирозина в SE и EC, площадь которых уменьшается после обработки НЧ, иллюстрируя нарушение вторичной структуры белков [20]. Пик амида II имеет малую площадь в EC, и данная особенность также отражается на комбинированных биопленках с присутствием EC.

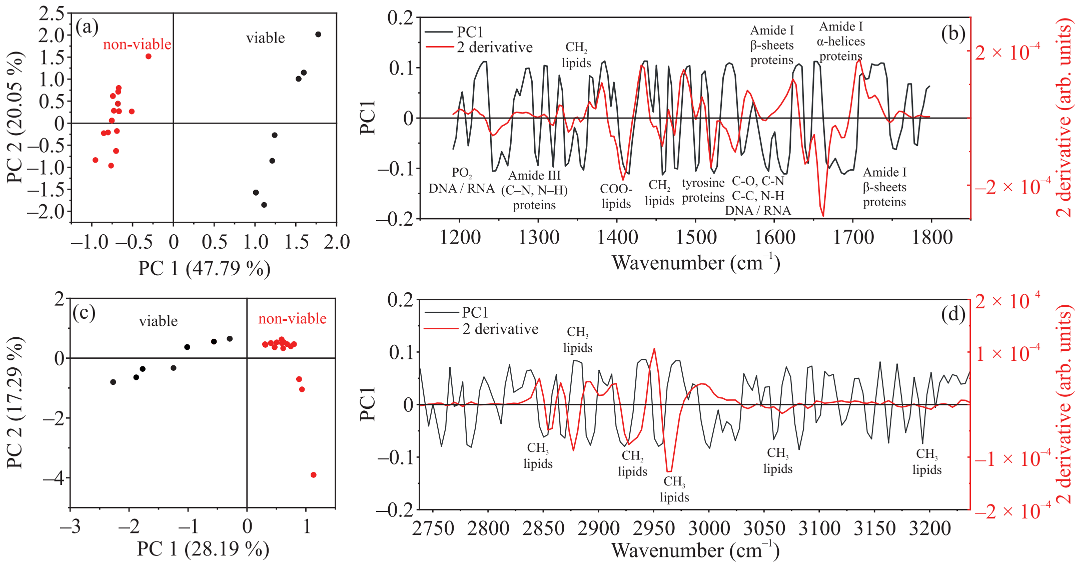

Рис. 5. (Цветной онлайн) Распределение компонент PC1 от PC2 (a), (c) и сопоставление PC1 с графиками вторых производных (b), (d), полученных для спектров ИК оптической плотности в диапазонах 1150–1800 см$^{-1}$ (a), (b) и 2750–3250 см$^{-1}$ (c), (d). Значения по оси ординат второй производной в относительных единицах, $\times 10^{-4}$

Ширина пиков также изменяется в зависимости от типа бактерий и их обработки. Так, уширение пиков C–C колебаний в ДНК/РНК после обработки НЧ в SE, KP, SE + EC свидетельствует о разрушении молекулярной структуры. Увеличение ширины пиков, соответствующих белкам, ярко проявляется в EC и EC + KP, что иллюстрирует возможное разрушение их вторичной структуры в кишечной палочке.

Пики, соответствующие липидам в мембране, во многом отражают ее целостность [21, 22]. Так, ригидификация (нарушение текучести, затвердевание) мембраны была зафиксирована в SE, SA + SE +P A.

В спектрах оптической плотности наблюдается увеличение площади пиков ДНК/РНК после обработки НЧ меди и селена в грамположительных бактериях, уменьшение – в грамотрицательных и комбинированных, что в целом соотносится с данными ИК спектроскопии пропускания. Пики, соответствующие β-листам в амиде I, растут после обработки грамотрицательных бактерий и комбинированных биопленок. Вклад липидов, которому соответствуют CH_3 колебания, уменьшается после обработки НЧ.

Ширина пиков, соответствующих молекулярным колебаниям в нуклеиновых кислотах, увеличивается после обработки НЧ в SA, SE. Пик, соответствующий колебаниям в амиде III, значительно сужается после обработки НЧ серебра в SA, SE, EC, SE + EC. В биопленке SA + SE + PA после обработки НЧ селена сильно сужаются пики молекулярных колебаний в белках. Возможная ригидификация мембраны наблюдалась после обработки НЧ в SA, SE, PA, SA + SE + PA, тогда как в остальных случаях происходило повышение ее текучести.

Видно, что в спектрах поглощения более ясно дифференцируются площади пиков, соответствующих амиду I и II, тогда как спектры оптической плотности лучше демонстрируют распределение ширин пиков, в связи с чем использование двух методик позволяет получить более полную информацию о происходящих молекулярных изменениях в бактериальных биопленках.

3.4. Анализ ИК спектров методом главных компонент. PCA-анализ был проведен для спектров ИК оптической плотности в диапазоне от 1191 см$^{-1}$ до 1800 см$^{-1}$, а также их вторых производных. Было показано, что анализ вторых производных более точно дифференцирует бактерии, поврежденные после обработки НЧ и жизнеспособные биопленки (рис. 5a, b). Положительные значения PC1 соответствуют жизнеспособным биопленкам, тогда как отрицательные – их полной или частичной гибели (рис. 5a, b). При сопоставлении PC1 со спектрами ИК оптической плотности выявляются основные молекулярные колебания, которые отвечают за дифференциацию жизнеспособных клеток от нежизнеспособных, а именно, PO_2, C–O, C–N, C–C, N–H в ДНК/РНК; амиды I и III; CH_2, CH_3, COO^- в липидах; тирозин. Уменьшение вклада α-спиралей в спектрах нежизнеспособных бактерий соотносится с данными лоренцевой аппроксимации пиков (рис. 5) и может свидетельствовать о нарушении вторичной структуры белка.

Аналогично был проведен PCA анализ спектров в диапазоне 2700–3400 $см^{-1}$, который также позволил дифференцировать жизнеспособные клетки от нежизнеспособных.

Таким образом, обработка бактериальных биопленок НЧ серебра, меди и селена может приводить к одновременному разрушению клеточной мембраны, вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот.

4. Заключение. В данной работе было проведено мультипараметрическое исследование эффекта взаимодействия антибактериальных наногелей на основе НЧ и (суб)микрочастиц серебра, меди и селена с одно- и многокомпонентными биопленками грамположительных бактерий Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, а также грамотрицательных бактерий Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae и Pseudomonas aeruginosa. Основу наногелей составляли глицерин, силиконовое масло и вазелин, которые являются широко распространенными, биосовместимыми и недорогими материалами, также подходящими для использования в раневых повязках. Методами стандартных биологических посевов, инфракрасной Фурье спектроскопии пропускания и отражения, а также с помощью Лоренцевой аппроксимации пиков и PCA-анализа впервые была доказана эффективность наногелей на основе глицерина и силиконового масла, полученных путем одностадийной ЛА в вязких средах. Впервые была произведена одностадийная генерация НЧ золота, серебра, меди и селена в вазелине. Снижение популяции бактерий составляло от одного до четырех порядков (99 % эффективность). Основной причиной гибели бактерий было предположено повреждение клеточной мембраны, а также нарушение структуры белков и нуклеиновых кислот.

Финансирование работы. Работа поддержана Российским научным фондом (грант # 24-25-00403, https://rscf.ru/project/24-25-00403/).

Соблюдение этических стандартов. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

1. M. H. Muhammad, A. L. Idris, X. Fan, Y. Guo, Y. Yu, X. Jin, J. Qiu, X. Guan, and T. Huang, Frontiers in Microbiology **11**, 928 (2020).
2. X. Bai, C. H. Nakatsu, and A. K. Bhunia, Foods **10**(9), 2117 (2021).
3. L. Shkodenko, I. Kassirov, and E. Koshel, Microorganisms **8**(10), 1545 (2020).
4. A. S. Joshi, P. Singh, and I. Mijakovic, Int. J. Mol. Sci. **21**(20), 7658 (2020).
5. S. Ying, Z. Guan, P. C. Ofoegbu, P. Clubb, C. Rico, F. He, and J. Hong, Environmental Technology and Innovation **26**, 102336 (2022).
6. E. Fazio, B. Gokce, A. De Giacomo, M. Meneghetti et al. (Collaboration), Nanomaterials **10**(11), 2317 (2020).
7. K. A. Altammar, Frontiers in Microbiology **14**, 1155622 (2023).
8. M. Namakka, M. R. Rahman, K. A. M. B. Said, M. A. Mannan, and A. M. Patwary, Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management **20**, 100900 (2023).
9. Н. А. Иногамов, В. В. Жаховский, В. А. Хохлов, Письма в ЖЭТФ **115**(1), 20 (2022).
10. Т. В. Малинский, С. И. Миколуцкий, В. Е. Рогалин, Ю. В. Хомич, В. А. Ямщиков, И. А. Каплунов, А. И. Иванова, Письма в ЖТФ **46**(16), 51 (2020).
11. А. В. Скобёлкина, Ф. В. Кашаев, А. В. Колчин, Д. В. Шулейко, Т. П. Каминская, Д. Е. Преснов, П. К. Кашкаров, Письма в ЖТФ **46**(14), 13 (2020).
12. A. Nyabadza, M. Vazquez, and D. Brabazon, Crystals **13**(2), 253 (2023).
13. A. V. Kabashin and M. Meunier, J. Appl. Phys. **94**(12), 7941 (2003).
14. С. В. Заботнов, А. В. Колчин, Ф. В. Кашаев, А. В. Скобёлкина, В. Ю. Нестеров, Д. Е. Преснов, Л. А. Головань, П. К. Кашкаров, Письма в ЖТФ **45**(21), 22 (2019).
15. П. А. Перминов, И. О. Джунь, А. А. Ежов, С. В. Заботнов, Л. А. Головань, В. И. Панов, П. К. Кашкаров, Известия Российской академии наук. Серия физическая **74**(1), 103 (2010).
16. M. Kansiz, H. Billman-Jacobe, and D. McNaughton, Appl. Environ. Microbiol. **66**, 3415 (2000).
17. F. Faghihzadeh, N. M. Anaya, L. A. Schifman, and V. Oyanedel-Craver, Nanotechnology for Environmental Engineering **1**, 1 (2016).
18. S. Eckhardt, P. S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, and K. M. Fromm, Chem. Rev. **113**(7), 4708 (2013).
19. P. D. Nichols, J. M. Henson, J. B. Guckert, D. E. Nivens, and D. C. White, Journal of Microbiological Methods **4**(2), 79 (1985).
20. W. Jiang, K. Yang, R. W. Vachet, and B. Xing, Langmuir **26**(23), 18071 (2010).
21. K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, and G. J. Puppels, J. Microbiol. Methods **51**, 255 (2002).
22. A. A. Kamnev, L. P. Antonyuk, A. V. Tugarova, P. A. Tarantilis, M. G. Polissiou, and P. H. E. Gardiner, J. Mol. Struct. **610**, 127 (2002).