

На правах рукописи

Каминский Валерий Васильевич

**Микробиологические и биотехнологические аспекты создания
ESKAPE-элиминирующей бионаноструктурированной композиции**

1.5.6 – биотехнология

1.5.11 – микробиология

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

доктор биологических наук,

профессор РАН, член-корреспондент РАН

доктор физико-математических наук

Андрей Владимирович Алёшкин

Александр Михайлович Емельяненко

Официальные оппоненты:

Соловьева Ирина Владленовна – доктор биологических наук, доцент, Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория микробиома человека и средств его коррекции, ведущий научный сотрудник-заведующий

Лукьянова Анна Александровна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», лаборатория инструментов для диагностики и терапии инфекционных заболеваний, научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «___» _____ в ___ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние годы инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, справедливо признаются одной из самых серьезных проблем современной медицины, приводящей к увеличению продолжительности лечения, инвалидизации и экономическому бремени системы здравоохранения (Al-Tawfiq J.A. et al., 2014; Khan H.A. et al., 2017). Основными возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, являются представители группы ESKAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*) (Santajit S., 2016). В результате передачи генов устойчивости к антимикробным препаратам, реализации множественных механизмов лекарственной устойчивости, терапия инфекций, вызванных ESKAPE-патогенами, имеющимися сейчас антимикробными препаратами усложняется (Lewis K. et al., 2017; Филиппова А.А. и др., 2020; Huemer M. et al., 2020; De Oliveira D. M. P. et al., 2020; Karakonstantis S. et al., 2021; Giamarellou H., Karaiskos I., 2022), что отражено Всемирной организацией здравоохранения в отчётах последних лет (World Health Organization, 2021, 2022). Всемирная организация здравоохранения внесла ESKAPE-патогены в список бактерий, в борьбе с которыми остро необходимы новые антимикробные препараты (Taccconelli E. et al., 2018), на разработку и внедрение которых уходят многие годы (Mohr K.I. et al., 2017). Одним из лучших способов борьбы с распространением бактерий в лечебно-профилактических организациях является применение дезинфицирующих средств (Bragg R.R. et al., 2018). Однако чрезмерное и неправильное использование дезинфектантов, отсутствие понимания принципов биобезопасности приводит к формированию резистентности, которая развивается устрашающе быстрыми темпами и осложняется перекрестной резистентностью к антибиотикам (Wassenaar T.M. et al., 2015; Khan S. et al., 2016; Kim M. et al., 2018). Проблема распространения бактерий в больничной среде усугубляется тем, что большинство из них находятся в составе биоплёнки, что значительно осложняет их эрадикацию (Roy R. et al., 2018; Verderosa A.D. et al., 2019; Миронов А. Ю., Шепелин И. А., 2021). В связи с этим учёными всего мира разрабатываются альтернативные методы борьбы с бактериальными инфекциями (Palliyil S. et al., 2014; Secher T. et al., 2014; Yang H. et al., 2014). Однако эти подходы на фоне преимуществ имеют ряд ограничений и недостатков, требуют дополнительных исследований для подтверждения безопасности и эффективности.

В контексте борьбы с глобальной устойчивостью к антимикробным препаратам разработка комбинированного средства борьбы, эффективно снижающего риск распространения бактериальных агентов в больничной среде за счет сочетания выраженного антибактериального эффекта и препятствия первичной адгезии микроорганизмов, является актуальной темой исследования.

Степень разработанности темы исследования

В виду недостаточной эффективности современных средств дезинфекции и роста антибиотикорезистентности вместо химического уничтожения бактерий в последнее время все активнее рассматриваются альтернативные физические методы контактного уничтожения бактерий и методы препятствия первичной адгезии. Данные механизмы воздействия на бактериальную клетку наблюдаются у некоторых видов животных и растений (Su Y. et al., 2018), и обусловлены наличием поверхностных наноструктур, которые проникают в клеточную стенку микроорганизма при контакте, что приводит к её разрыву, а затем гибели бактериальной клетки. Это стало привлекательным методом для потенциальной борьбы с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (Lam S.J. et al., 2016). Разработки в этой области сосредоточены на различных типах антимикробных покрытий для предотвращения возникновения инфекций, использовании наночастиц в качестве антимикробных агентов, антимикробных поверхностей на основе полимеров и других материалов (Hajipour M.J. et al., 2012; Muller M.P. et al., 2016; Nikiforov A. et al., 2016; Tripathy A. et al., 2017). Дисперсии наночастиц и наноструктурированные поверхности всё чаще встречаются в современных составах и технологических приложениях для уменьшения адгезии микроорганизмов, улучшения характеристик и получения дополнительных функциональных возможностей (Pilkington G.A. et al., 2012; Briscoe W. H. et al., 2015; Hasan J. et al., 2015; Tripathy A. et al., 2017). Однако эффективная антибактериальная активность поверхностей зачастую не сочетается с препятствием первичной адгезии, которая способствует формированию биоплёнки. А понимание механизмов взаимодействия живых бактериальных клеток с бактерицидными поверхностями, способы оценки их антибактериальной активности и эксплуатационных показателей, необходимых для изготовления эффективных и экономически жизнеспособных бактерицидных поверхностей, остаются ограниченными. Одним из способов усиления специфического бактерицидного эффекта могут являться бактериофаги, которые давно и успешно используются в борьбе с инфекциями (Алешкин А.В. и др., 2016; Górski A. et al., 2016).

Цель исследования

Разработка ESKAPE-элиминирующей бионаноструктурированной композиции, снижающей риск распространения ESKAPE-патогенов.

Задачи исследования

1. Разработать технологию нанесения культур бактерий и бактериофагов на металлические пластины.

2. Исследовать биологические, физико-химические особенности взаимодействия клеток бактерий, бактериофагов и текстурированных поверхностей.
3. Оценить антибактериальные свойства супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностей металлов.
4. Провести анализ антибактериальной активности органо-неорганических гибридных покрытий металлов с сорбированными бактериофагами.
5. Оценить влияние коррозионной стойкости поверхностей металлов с экстремальной смачиваемостью на их антибактериальную активность.

Научная новизна исследования

Впервые в РФ разработаны микробиологические и биотехнологические принципы создания ESKAPE-элиминирующей бионаноструктурированной композиции, представляющей собой комплекс бактериофагов с супергидрофильными и супергидрофобными поверхностями из алюминия, меди, магния и нержавеющей стали.

На основе физико-химических методов исследовано взаимодействие клеток бактерий, бактериофагов и текстурированных поверхностей, раскрывающее механизм влияния поверхностей с экстремальной смачиваемостью на патогенные микроорганизмы.

Проведена оценка эффективности антибактериальной активности разработанной бионаноструктурированной композиции в отношении ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи - *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе исследования механизмов взаимодействия бактериофагов, бактерий и нанотекстурированных поверхностей разработаны теоретические основы моделирования бактериального загрязнения и предотвращение микробной контаминации неорганических поверхностей.

Получены новые знания о природе взаимодействия бактерий и бактериофагов с супергидрофильными и супергидрофобными поверхностями металлов на основе физико-химических свойств, в том числе значений дзета-потенциалов перечисленных выше объектов исследования.

Разработана пилотная технология нанесения бактериофагов на супергидрофобные и супергидрофильные покрытия металлов, ориентированная на получение бактерицидных поверхностей, применение которых в лечебно-профилактических организациях будет способствовать снижению риска распространения ESKAPE-патогенов.

Разработаны биотехнологические подходы к созданию композиций

бактериофагов, сорбированных на супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностях из алюминия, меди, магния и нержавеющей стали, которые могут применяться также и для поверхностей из других материалов.

Созданные модели контаминации бактериальными штаммами нанотекстурированных поверхностей с экстремальной смачиваемостью, имитирующие различные условия распространения ESKAPE-патогенов, вместе с разработанной методикой оценки антибактериальной активности могут быть использованы для определения бактерицидного эффекта поверхностей, обладающих антибактериальными свойствами.

Результаты диссертационной работы внедрены в педагогический процесс кафедры клинической микробиологии и фаготерапии факультета дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации при изучении дисциплин «Фаготерапия, фагопрофилактика, клиническая и лабораторная диагностика инфекционных заболеваний с применением бактериофагов», «Вопросы бактериологии» читаемых слушателям кафедры по специальности «Бактериология» (акт внедрения от 14.04.22 г.). Аналитическая методика контроля показателя «Антибактериальная активность» бактерицидных поверхностей внедрена в практическую деятельность лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (акт внедрения от 18.05.22 г.).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Объектами исследования стали супергидрофильные и супергидрофобные нанотекстурированные пластины металлов, штаммы УПМ, бактериофаги, изолированные из клинического материала от пациентов и из объектов окружающей среды. Предметом исследования явилась разработка комплекса бактериофагов с супергидрофильными и супергидрофобными нанотекстурированными поверхностями металлов, снижающего риск возникновения ИСМП. Научные публикации, посвящённые исследованиям бактериофагов, супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностей металлов проанализированы формально-логическими методами. Для решения поставленных задач планирование и проведение исследований осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. В работе использованы микробиологические, микроскопические, физическо-химические,

статистические методы исследования.

Работа выполнена в рамках НИОКТР ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Разработка комплекса бактериофагов с супергидрофильными и супергидрофобными нанотекстурированными поверхностями металлов для снижения риска возникновения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (№ АААА-А20-120011690050-1 от 16.01.2020).

Материалы исследования

Супергидрофильные, супергидрофобные нанотекстурированные и контрольные образцы. Исследовано 2033 образцов супергидрофильных, супергидрофобных и контрольных пластин из алюминиевого сплава АМГ, медного сплава М1М, нержавеющей стали марки 12Х18Н10Т, магниевого сплава М8.

Штаммы бактерий и бактериофагов. Использованы культуры бактерий *A. baumannii* В-05, *A. baumannii* 1053, *K. pneumoniae* В-811, *P. aeruginosa* В-3086, *S. aureus* 2004, *E. coli* К12 С600 и бактериофаги *Acinetobacter phage* АМ24, *Klebsiella phage* КрV811, *Pseudomonas phage* РА10, *Staphylococcus phage* SCH111 и *Escherichia phage* ECD7, полученные из рабочей коллекции лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора.

Питательные среды. В работе использованы агар Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия), сердечно-мозговой бульон (HiMedia, Индия), сердечно-мозговой агар (HiMedia, Индия), мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, Луриа-Бертани бульон (HiMedia, Индия).

Дисперсионные среды и реактивы. В работе использованы фосфатно-солевой буфер (Sigma-Aldrich, Германия), 0,9% водный раствор хлорида натрия (рН 7,4), Н-гексан для высокоэффективной жидкостной хроматографии 97,0% (Sigma-Aldrich, Германия), метокси- {3- [(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-пентадекафтороктил) -окси] пропил} силан, синтезированный в лаборатории синтеза элементоорганических полимеров ИСПМ РАН.

Методы исследования

Получение суточной культуры бактериальных штаммов. Лиофильно высушенную культуру бактерий разводили физиологическим раствором, выполняли пассаж на плотную питательную среду для получения чистой культуры и последующего пересева в жидкую питательную среду.

Получение бактериальной суспензии нужного титра. Суточную бульонную культуру бактерии разбавляли дисперсионной средой по отраслевому стандарту мутности 10 МЕ, титровали методом десятикратных разведений, пассировали из соответствующего разведения 100 мкл взвеси на плотные питательные среды, инкубировали при 37° С и последующим подсчетом колоний через 24 часа.

Определение литической активности бактериофагов. Титра бактериофагов определяли методом агаровых слоев Грациа.

Сканирующая электронная микроскопия. Морфологию образцов пластин до и после контаминации штаммами бактерий анализировали с помощью системы автоэмиссионной сканирующей электронной микроскопии, с помощью сканирующего электронного микроскопа SUPRA 40 VP (Carl Zeiss, Германия).

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия. Элементный состав образцов изучали методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии энергодисперсионным детектором X-MAX (Oxford Instruments, Великобритания).

Получение супергидрофильного и супергидрофобного покрытия исследуемых образцов. Текстурирование, являющееся необходимым этапом для получения как супергидрофобного, так и супергидрофильного состояния металлической поверхности, проводилось лазерной установкой «Аргент-М» (Россия) с волоконным иттербиевым лазером ИК (длина волны 1,064 мкм), оснащённой устройством двухосного отклонения луча (Рисунок 1).

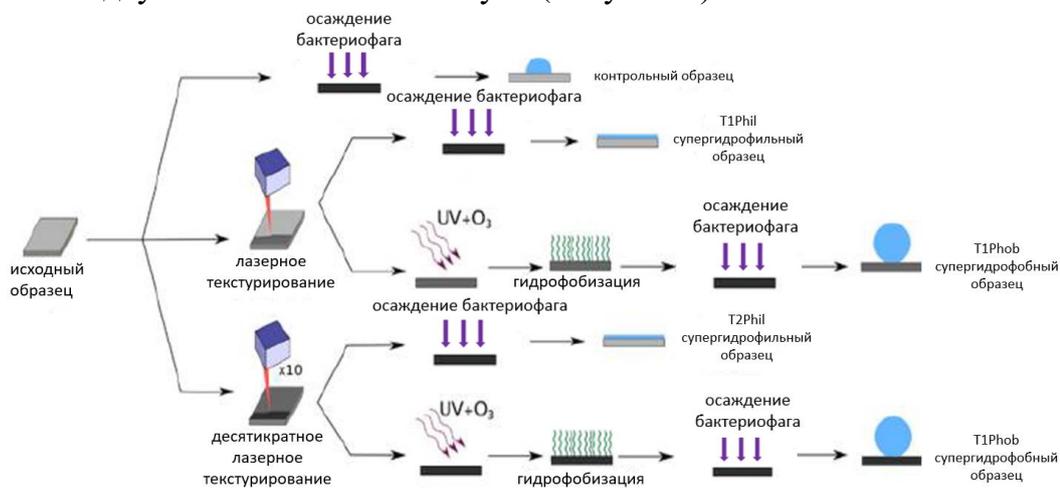


Рисунок 1 - Схема изготовления исследуемых образцов из алюминия, меди, нержавеющей стали, магния

Метод исследования динамики смачиваемости поверхности исследуемых образцов.

Для анализа смачиваемости исследуемых образцов проведены измерения краевых углов с использованием самодельной экспериментальной установки для записи оптических изображений лежащих капель и программного обеспечения для цифровой обработки видеоизображений капель и последующего определения параметров капли.

Исследования электрокинетических характеристик бактерий и бактериофагов.

Измерение дзета-потенциалов бактерий и бактериофагов проводили с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) согласно инструкции производителя.

Определение концентрации ионов меди и магния в дисперсионной среде.

Для определения концентрации ионов использовали масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500CE (Agilent Technologies, США) с программой «ICP-MS-Top».

Определение pH дисперсионной среды. Измерение pH в суспензиях бактерий

проводили с помощью микроэлектрода ЭСК-10614 (ООО «Измерительные технологии», Россия).

Статистические методы. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 8.0. Критерий Колмогорова-Смирнова, коэффициенты асимметрии и эксцесса использовали для проверки нормальности распределения количественных показателей, оценку различий между выборками проводили с использованием U- критерия Манна-Уитни.

Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен аналитический обзор научной литературы и составлен план исследования, изучены биологические и физико-химические аспекты взаимодействия клеток бактерий, бактериофагов и текстурированных поверхностей. Отработана оригинальная методика сорбции бактерий и бактериофагов на нанотекстурированные поверхности металлов.

Разработана ESKAPE-элиминирующая бионаноструктурированная композиция. Оценена антибактериальная активность супергидрофильных и супергидрофобных поверхностей из алюминия, меди, магния и нержавеющей стали. Оценена антибактериальная активность супергидрофильных и супергидрофобных образцов из алюминия и меди импрегнированных бактериофагами. Изготовление супергидрофильных, супергидрофобных и контрольных образцов пластин из алюминия, меди, нержавеющей стали, магния, определение концентрации Cu^{2+} и Mg^{2+} , анализ динамики смачиваемости поверхностей исследуемых образцов и исследования электрокинетических характеристик бактерий и бактериофагов проводились на базе ИФХЭ РАН под руководством акад. РАН, д.ф.-м.н. Бойнович Л.Б. совместно с к.ф.-м.н. Емельяненко К.А., д.ф.-м.н. Соболевым В.Д., Цыпленковой А.В. к.х.н. Пыцким И.С., Чулковой Е.В. Электронная микроскопия исследуемых образцов была выполнена на базе ИОНХ им. Н. С. Курнакова РАН при участии к.т.н. Домантовского А.Г.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Истинным бактерицидным эффектом обладают супергидрофильные поверхности, в то время как супергидрофобные поверхности металлов препятствуют первичной адгезии бактерий.

2. Комплекс бактериофагов и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностей обладает более высокой антибактериальной активностью, чем каждый из компонентов в отдельности.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов основана на достаточном объеме выборки исследуемых образцов (2033 супергидрофильных, супергидрофобных и контрольных пластин из алюминия, меди, нержавеющей стали, магния),

применении современных научных методов. Проведенное системное микробиологическое и физико-химическое исследование взаимодействия штаммов основных представителей группы ESKAPE-патогенов и нанотекстурированных поверхностей металлов с экстремальной смачиваемостью позволило получить данные, сопоставимые с данными других исследователей в сфере микробиологии и биотехнологии.

Диссертация апробирована на заседании секции "Медицинская биотехнология" Ученого совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол №4 от 05.12.2022 г.).

Материалы и результаты исследований были представлены на Российских и международных конгрессах и конференциях: XVI Международная конференция "Поверхностные силы" (Россия, г. Казань), IV научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Россия, г. Нижний Новгород), X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», (Россия, Московская обл., д. Лужки), XI Всероссийский семинар "Физикохимия поверхностей и наноразмерных систем" (Россия, г. Москва), 33rd Conference of The European Colloid and Interface Society (Бельгия, г. Лёвен), XI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» и ежегодное заседание Совета молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Россия, г. Уфа), XXIII Всероссийская конференция с международным участием по неорганическим и органосиликатным покрытиям (г. Санкт-Петербург), XI Всероссийский семинар «Физикохимия поверхностей и наноразмерных систем» (Россия, г. Москва), 35th conference of European Colloid and Interface Society (ECIS 2021) (Греция, г. Афины).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 8 статей в рецензируемых изданиях и 3 тезисы в материалах конференции.

Объем и структура диссертации

Текст работы изложен на 159 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, четырех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки, списка сокращений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами и 23 рисунками. Список литературы содержит 296 источников, из которых 25 – отечественные и 271 – зарубежные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Отработка технологии нанесения культур бактерий и бактериофагов на металлические пластины

Для отработки нанесения биологических агентов на испытываемые пластины при

приготовлении бактериальной и фаговой суспензии использовался органический растворитель н-гексан, который, во-первых, создавал имитацию влияния органических веществ, источником которых могут быть атмосферные загрязнители, жиры, находящиеся на поверхности кожи человека, биологические жидкости, влияющие на смачиваемость и бактерицидный эффект поверхностей; во-вторых, нивелировал свойства отталкивания супергидрофобной поверхности и позволял сорбировать на неё бактериофаги перед их (поверхностей) контаминацией бактериальной суспензией. Объективизации оценки АА бактериальной суспензии добивались отмывкой клеточного компонента от питательной среды с помощью PBS.

Для моделирования возможных путей распространения ESKAPE-патогенов в условиях ЛПО были разработаны 3 протокола нанесения бактериальной суспензии на исследуемые образцы (Рисунок 2).

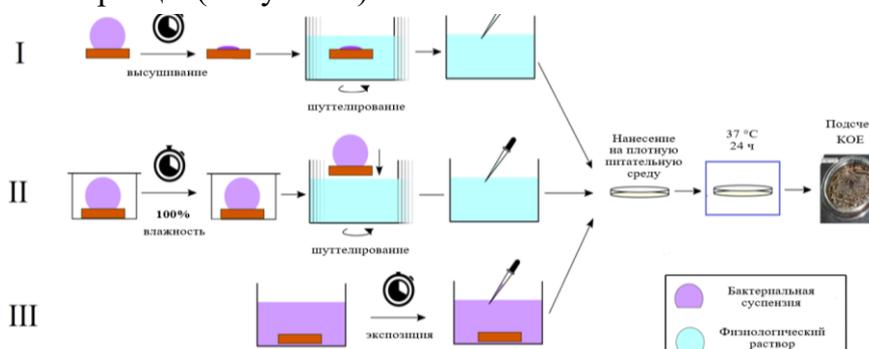


Рисунок 2 - Протоколы, используемые для исследования антибактериальной активности текстурированных поверхностей

В результате были разработаны модели контаминации штаммами ESKAPE-патогенов поверхностей с экстремальной смачиваемостью имитирующие различные условия их распространения: «сухого» контакта в экспериментах с высыханием бактериальной суспензии на поверхности образцов, «влажного» контакта с созданными условиями 100% влажности и «мокрого» контакта в экспериментах с погружением исследуемых образцов в бактериальную суспензию. Титр бактерий на контрольных образцах из металлов, не обладающих собственной антибактериальной активностью, и в суспензиях без исследуемых образцов сохранялся стабильным на протяжении всего эксперимента, что позволяло определять минимальные проявления АА. Низкая растворимость в воде и высокая летучесть н-гексана приводила к быстрому самопроизвольному удалению растворителя из водной фазы, таким образом влияние органической добавки на свойства рассматриваемой системы ограничивалось стадией смачивания.

Исследование биологических, физико-химических особенностей взаимодействия клеток бактерий, бактериофагов и текстурированных поверхностей

Используя модель контакта бактериальных суспензий *E. coli* K12 C600 и *K. pneumoniae* B-811 с супергидрофильными, супергидрофобными и контрольными

образцами согласно 1 протоколу исследования было показано уже при первом измерении титра бактерий через 30 минут от начала эксперимента отсутствие живых бактериальных клеток обоих штаммов на всех типах поверхностей. Отсутствие жидкой фазы через 30 минут обеспечивает полный контакт бактериальной суспензии с текстурами наноструктурированных образцов и ионами металлов, повреждающих бактерии, что обуславливает их гибель.

Согласно 2 протоколу в условиях влажного контакта бактериальной суспензии с супергидрофильными, супергидрофобными и контрольными образцами определяли титр штаммов *E. coli* K12 C600 и *K. pneumoniae* B-811. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Изменение титра бактерий *E. coli* K12 C600 и *K. pneumoniae* B-811 на исследуемых образцах из меди в условиях влажного контакта с бактериальной суспензией

Время, час	<i>E. coli</i> C600			<i>K. pneumoniae</i> B-811		
	Lg ₁₀ КОЕ на контрольном образце	Lg ₁₀ КОЕ на супергидрофильном образце	Lg ₁₀ КОЕ на супергидрофобном образце	Lg ₁₀ КОЕ на контрольном образце	Lg ₁₀ КОЕ на супергидрофильном образце	Lg ₁₀ КОЕ на супергидрофобном образце
0	8,11±0,26	8,11±0,26	8,11±0,26	7±0	7±0	7±0
0,5	0	0	6,39±0,39	4,45±0,54	0	4,19±0,58
1	0	0	6,14±0,74	0	0	4,12±0,81
2	0	0	5,77±0,30	0	0	5,90±0
5	0	0	7,14±0,29	0	0	8,77±0,22
24	0	0	8,75±0,27	0	0	9,28±0,32
48	0	0	8,58±0,55	0	0	9,00±0
96	0	0	9,35±0,20	0	0	9,87±0,02
144	0	0	9,12±0,16	0	0	9,48±0

Согласно приведенным в таблице данным, выживаемость бактерий на супергидрофобных пластинах значительно отличалась от супергидрофильных и контрольных. Полученные различия подтверждались электронной микрофотографией (Рисунок 3).

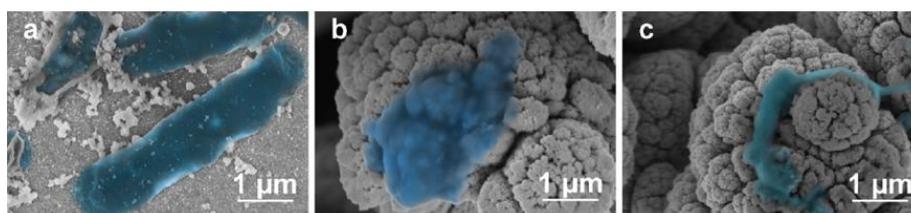


Рисунок 3 - Клетки *E. coli* K12 C600, осадённые на контрольные (а), супергидрофильные (b), супергидрофобные (с) медные пластины после 24 часов контакта между каплей суспензии и пластины СЭМ (Сканирующий электронный микроскоп Zeiss Supra 40VP (Carl Zeiss, Германия), увеличение ×25000)

Примечание: Бактерии выделены цветом

СЭМ-изображения показывали равномерное распределение бактерий по поверхности контрольного образца и супергидрофильной медной пластины. Тёмный фон под прилипшими к поверхности контрольной пластины клетками указывал на частичное высвобождение цитозоля с последующим уплощением

клеток *E. coli* (Рисунок 3 а). Бактерии, прикреплённые к супергидрофильной поверхности подвергались прокалыванию мембран, деформации, потере внутриклеточной жидкости и бактериолизу (Рисунок 3 б). Хотя частичное разрушение структур клеток обнаружено и на супергидрофобных поверхностях, но деградация формы клеток бактерий, отложившихся на них, меньше (Рисунок 3 с). Обзорные изображения (Рисунок 4 а, б) свидетельствовали о том, что бактерии оседали в основном на вершинах гребней (отмечены красным цветом), что объясняется гетерогенным режимом смачивания, когда канавки захватывают воздух и не контактируют с жидкой средой, а изображения на рисунке 4 с, d иллюстрируют повреждение клеток на элементах нанотекстуры.

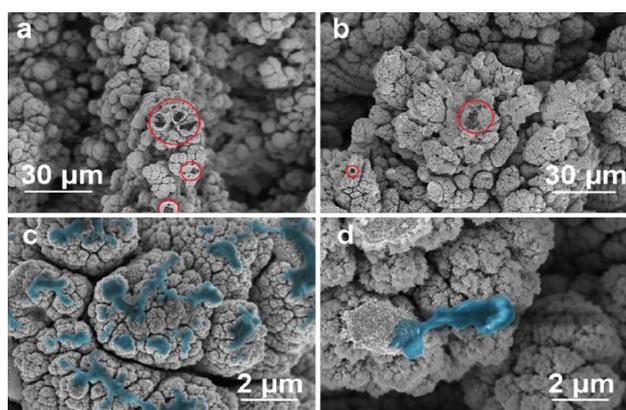


Рисунок 4 - СЭМ изображение клеток *E. coli* K12 C600 (а, с) и *K. pneumoniae* B-811 (b, d), осаждённых на текстурированные супергидрофобные медные пластины через 24 часов (а, б) и 48 часов (с, d) контакта капли суспензии с подложкой (Сканирующий электронный микроскоп Zeiss Supra 40VP (Carl Zeiss, Германия), увеличение $\times 25000$)

Примечание: Бактерии выделены цветом

Механизм первичной адгезии бактерий на поверхности образца - один из важных процессов взаимодействия микробной клетки и исследуемой поверхности. Бактерия отделена от поверхности слоем водной фазы, их взаимодействие определяется различными типами поверхностных сил. Чтобы оценить знак эффективного взаимодействия (притяжение или отталкивание), необходимо учитывать детали состава границы раздела и заряда поверхности. В ходе исследований были измерены ξ -потенциалы (дзета-потенциалы) бактерий и бактериофагов, используемых в работе, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Дзета-потенциалы микроорганизмов, использованных в работе

Микроорганизм	Дзета-потенциал, мВ
<i>K. pneumoniae</i> B-811	-27,0
<i>A. baumannii</i> 1053	-43,1
<i>S. aureus</i> 2004	-42,7
<i>P. aeruginosa</i> B-3086	-17,0
<i>Acinetobacter</i> phage AM24	-23,0
<i>Klebsiella</i> phage KpV811	-32,8
<i>Pseudomonas</i> phage PA10	-33,7
<i>Staphylococcus</i> phage SCH111	-24,4

Поверхностный заряд супергидрофильной поверхности оксида алюминия и меди в нейтральных растворах положительный, тогда как заряд бактерий отрицательный, что приводило к возможному электростатическому притяжению бактерий и текстурированной поверхности. Поверхностный заряд супергидрофобной поверхности оксида алюминия и меди является отрицательным, что приводило к электростатическому отталкиванию отрицательно заряженных бактерий от отрицательно заряженной супергидрофобной поверхности. Стерическое взаимодействие между хорошо упорядоченным слоем фтороксисилана, хемосорбированным на супергидрофобной поверхности, и липополисахаридом бактерий способствовало отталкиванию.

Таким образом, одинаковые знаки и достаточно высокие абсолютные значения дзета-потенциалов бактерий и бактериофагов позволяли ожидать, что электростатическое отталкивание в водных средах доминирует над ван-дер-ваальсовым притяжением, что может исключить электрокинетический сценарий «стыковки» бактерий и бактериофагов в водных растворах. Взаимодействие по механизму контактного уничтожения между нанотекстурами и бактериями за счет пенетрации, деформации и повреждения клеточной мембраны клеток происходило на всей поверхности супергидрофильных образцов, а в случае с супергидрофобными – контактного уничтожения лишь на вершинах гребней текстур, препятствия первичной адгезии и предупреждения колонизации бактерий, что связано с отрицательными значениями дзета-потенциалов бактериальных штаммов и отрицательным зарядом супергидрофобной поверхности.

Оценка антибактериальных свойств супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностей металлов

Антибактериальная активность супергидрофильных и супергидрофобных пластин из алюминиевого сплава AMG в отношении *A. baumannii* B-05, *K. pneumoniae* B-811, *P. aeruginosa* B-3086, *S. aureus* 2004

Значение антибактериальной активности и процент редуции жизнеспособных бактерий в суспензии рассчитывали, опираясь на модифицированный международный стандарт ISO 22196:2011*, где эффективной считается АА больше 2. Результаты анализа титра бактерий в эксперименте согласно 2 протоколу представлены на рисунке 5.

* Значение антибактериальной активности рассчитывали по формуле, приведённой ниже, и записывали как логарифм снижения:

$R=U_t-A_t$, где R – антибактериальная активность, U_t - среднее логарифмическое число жизнеспособных бактерий на контрольном образце во временной точке, заданной условиями эксперимента, A_t - среднее логарифмическое число жизнеспособных бактерий на опытном образце во временной точке, заданной условиями эксперимента

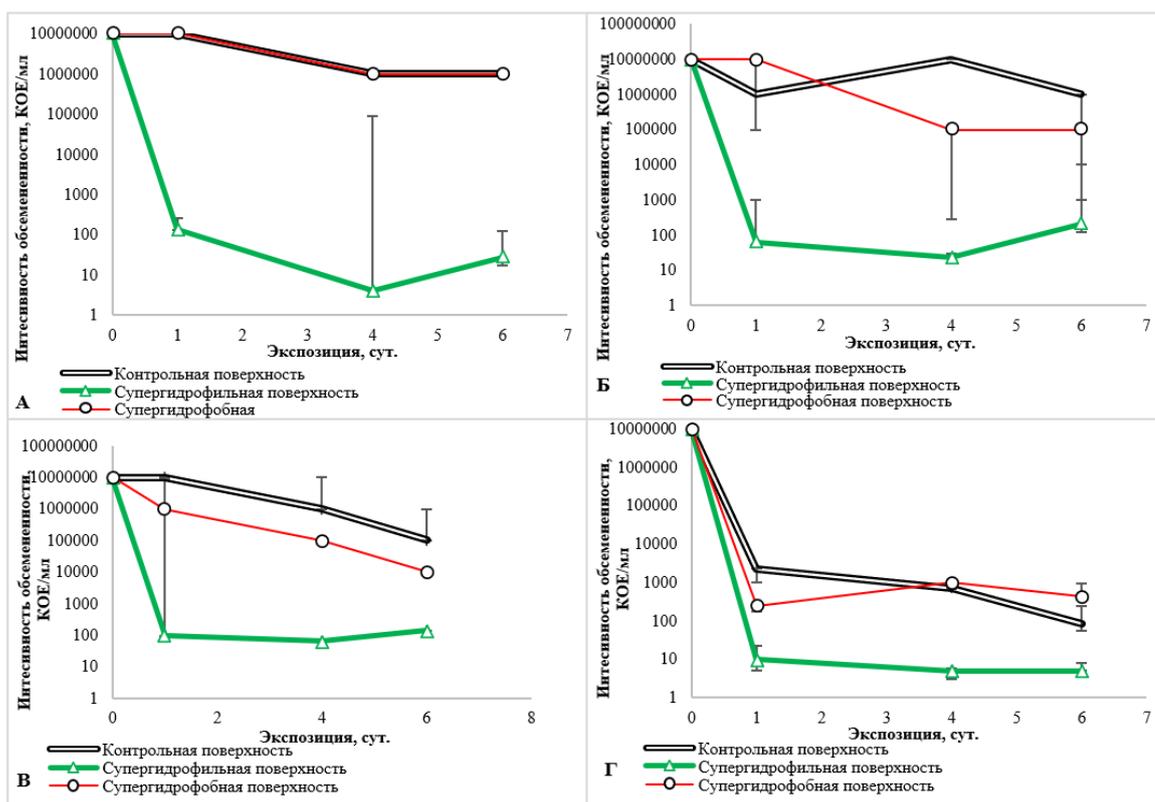


Рисунок 5 - Динамика интенсивности обсеменённости супергидрофильных и супергидрофобных пластин в условиях влажного контакта бактериальными штаммами *A. baumannii* B-05 (А), *K. pneumoniae* B-811 (Б), *P. aeruginosa* B-3086 (В), *S. aureus* 2004 (Г)

Снижение микробной обсеменённости супергидрофильных подложек на 5 логарифмических порядков и эффективная АА, выражающаяся в 99,99% сокращении жизнеспособных клеток бактерий ($p=0,0495$), наблюдалась в опыте с *A. baumannii* B-05 уже к 1-м суткам эксперимента. При этом до 6 суток исследования количество бактерий на контрольных образцах оставалось эквивалентно количеству на супергидрофобных. В экспериментах с *P. aeruginosa* B-3086 и *K. pneumoniae* B-811 АА супергидрофильных образцов была значительно выше АА супергидрофобных. В эксперименте с *S. aureus* 2004 на 1-е сутки на всех типах пластин отмечалось падение титра бактерий, однако, также наблюдался более выраженный антибактериальный эффект супергидрофильных пластин по сравнению с супергидрофобными.

Таким образом, выраженным антибактериальным эффектом обладали супергидрофильные нанотекстурированные поверхности из алюминиевого сплава AMG, так в экспериментах по контаминации образцов *A. baumannii* B-05, *K. pneumoniae* B-811, *P. aeruginosa* B-3086, *S. aureus* 2004 он превышал АА супергидрофобных образцов в 2600 раз.

Антибактериальная активность супергидрофильных и супергидрофобных пластин из магниевого сплава М8 в отношении *K. pneumoniae* B-811 и *P. aeruginosa* B-3086

Анализ динамики титра бактерий в эксперименте согласно 3 протоколу с *K.*

pneumoniae B-811 и *P. aeruginosa* B-3086 в бюксах с исследуемыми образцами убедительно продемонстрировал более выраженную АА супергидрофильных образцов в сравнении с супергидрофобными (Рисунок 6).

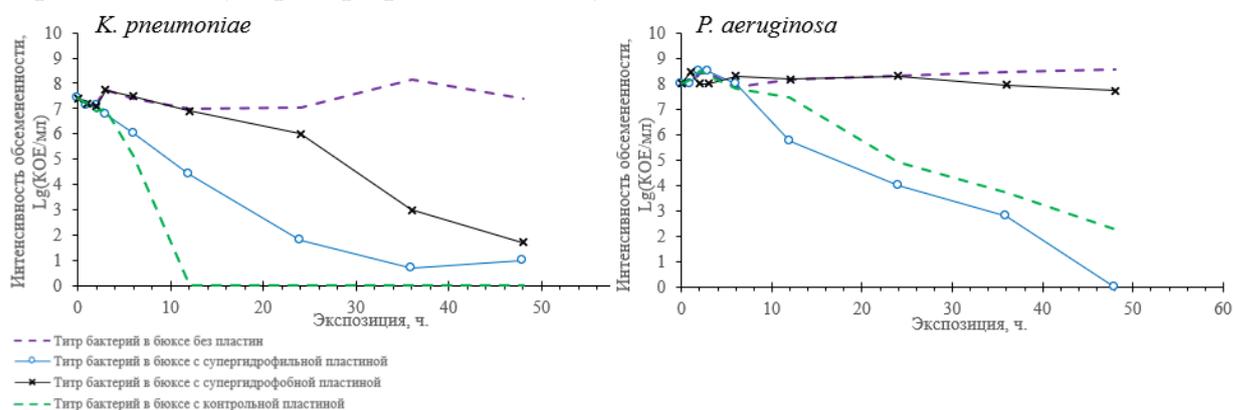


Рисунок 6 - Динамика изменения титра бактерий в бюксах с супергидрофильной, супергидрофобной, контрольной поверхностью из магниевого сплава МА8 в эксперименте с погружением в суспензию *K. pneumoniae* B-811 и *P. aeruginosa* B-3086

Стоит отметить выявленную в ходе исследования согласно 3 протоколу АА самого магниевого сплава, которая отмечалась в бюксах с контрольной пластиной и бактериями с начала эксперимента и приведшей к сокращению 99,99% бактерий *P. aeruginosa* B-3086 к 48 часу и полной элиминации бактерий *K. pneumoniae* B-811 к 12 часу, что обуславливалось процессами коррозии и сопровождалось повышением рН до значений выше 10,5 и высвобождением Mg^{2+} в дисперсионную среду, что будет подробнее рассмотрено далее. АА супергидрофобных поверхностей за счет их более высокой коррозионной стойкости проявлялась позже, с 6 часа эксперимента, и достигала эффективного показателя 5,13 и 99,99% сокращения количества бактерий *K. pneumoniae* B-811 к 36 часу, а в опыте *P. aeruginosa* B-3086 незначительная АА супергидрофобной поверхности появлялась на 2 час эксперимента и не достигала эффективных показателей, составляя 0,82 и 85,00% сокращения количества бактерий к 48 часам от начала эксперимента. В то время как АА супергидрофильных поверхностей в отношении *K. pneumoniae* B-811 и *P. aeruginosa* B-3086 достигала эффективных показателей 2,60 и 2,43 и снижение бактериальной обсемененности на 99,75% и 99,63% соответственно к 12 часу эксперимента.

Анализ полученных данных показал выраженный бактерицидный эффект супергидрофильных поверхностей, в то время как у супергидрофобных поверхностей он проявлялся лишь при контакте бактерий с вершинами текстур образцов и мало влиял на АА образцов в целом.

Анализ антибактериальной активности органо-неорганических гибридных покрытий металлов с сорбированными бактериофагами

Бактериофаги, сорбированные на поверхность супергидрофобных пластин из алюминия в титре не ниже 10^6 БОЕ/мл, согласно 2 протоколу, не предотвращали их

бактериальную контаминацию, однако, значительно увеличивали показатель их антибактериальной активности (Рисунок 7).

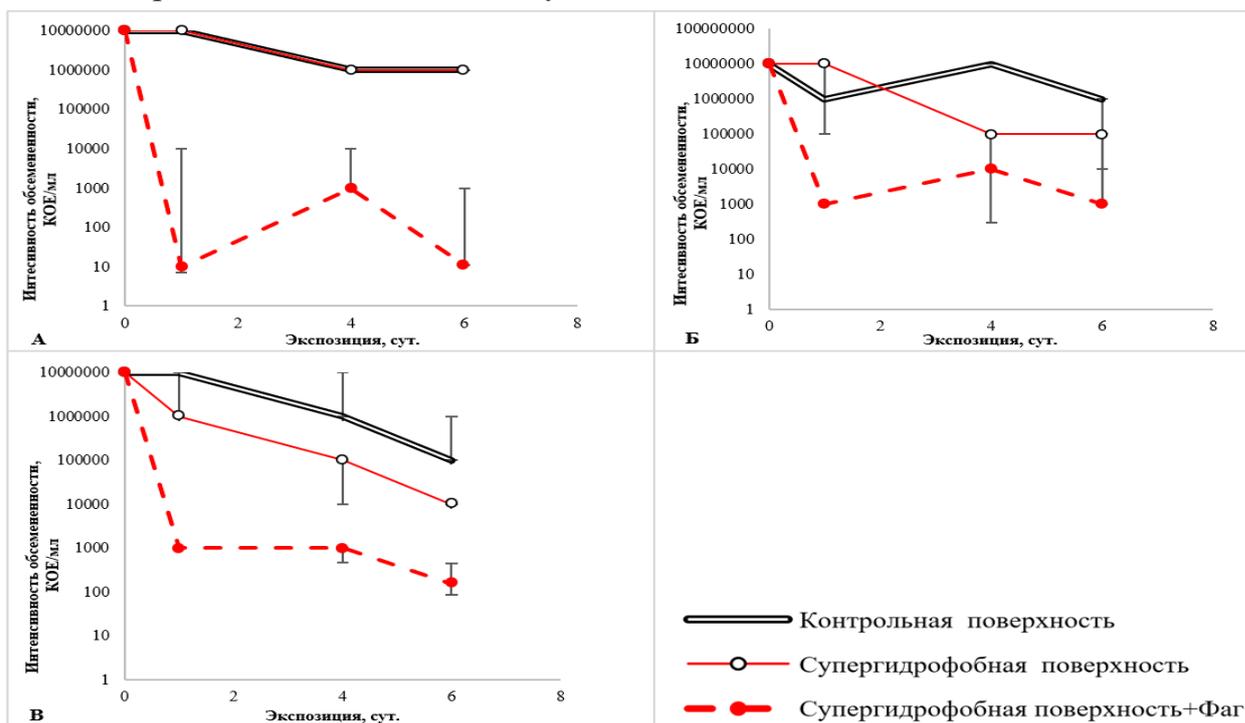


Рисунок 7 - Сравнение интенсивности обсеменённости микроорганизмами супергидрофобных пластин с сорбированными на их поверхности бактериофагами и без них в условиях влажного контакта с бактериальными штаммами *A. baumannii* B-05 (А), *K. pneumoniae* B-811 (Б), *P. aeruginosa* B-3086 (В)

Уже на 1-е сутки эксперимента проявлялась эффективная АА супергидрофобных образцов с бактериофагами и составляла 6,00 при уничтожении 99,99% бактерий *A. baumannii* B-05 ($p=0,0495$), в то время как количество колониеобразующих единиц бактерий на супергидрофобных пластинах без бактериофагов равнялось количеству на контрольных до окончания эксперимента. В экспериментах с *K. pneumoniae* B-811 и *P. aeruginosa* B-3086 супергидрофобные пластины с сорбированными бактериофагами проявляли эффективную АА на 1 сутки эксперимента, что выражалось в уничтожении 99,90% и 99,99% бактерий соответственно, АА супергидрофобных пластин без бактериофагов проявлялась с 1 суток, однако не превышала 90,00% на 6 сутки эксперимента.

Данные об изменении титра *E. coli* K12 C600 и *K. pneumoniae* B-811 в бюксе в зависимости от времени контакта с супергидрофильными, супергидрофобными и контрольными медными подложками, а также с супергидрофобными поверхностями с предварительно сорбированными бактериофагами *Escherichia phage* ECD7 и *Klebsiella phage* KpV811 согласно 3 протоколу исследования представлены на рисунке 8.

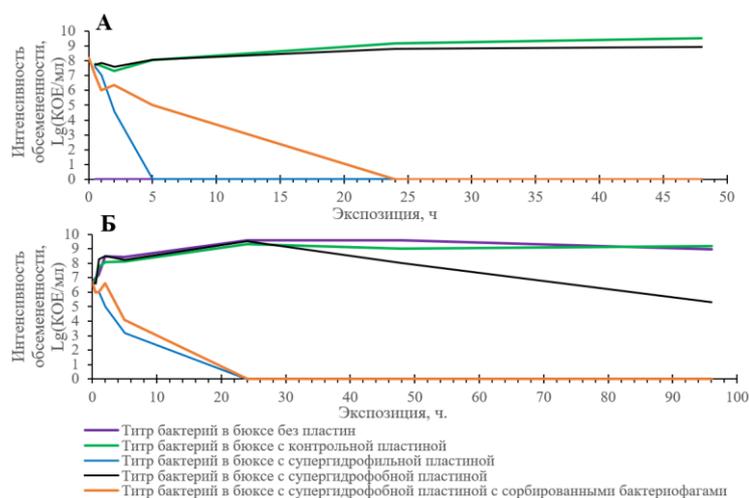


Рисунок 8 - Динамика изменения титра бактерий на супергидрофильных, супергидрофобных, супергидрофобных с сорбированными бактериофагами и контрольных поверхностях из медного сплава М1М в эксперименте с погружением в суспензию *E. coli K12 C600* (А) и *K. pneumoniae B-811* (Б)

В бюксах с супергидрофобными пластинами с сорбированными на их поверхности бактериофагами и бактериальными штаммами *E. coli K12 C600* и *K. pneumoniae B-811* эффективные показатели АА этих поверхностей 3,3 и 4,3 соответственно достигались к 5 часу от начала эксперимента, полная эрадикация бактерий происходила через 24 часа в обоих случаях. В бюксах с супергидрофобными медными пластинами без сорбированных бактериофагов АА достигала эффективного показателя в случае с *E. coli K12 C600*, где титр бактерий снижался на 99,97% на 4 сутки эксперимента, в экспериментах с *K. pneumoniae B-811* АА на 2 сутки составляла 0,44 и гибель 63,80% бактерий.

Таким образом, разработанные ESKAPE-элиминирующие бионаноструктурированные композиции, представляющие собой устойчивые соединения супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностей из алюминиевого сплава AMG и медного сплава М1М с сорбированными бактериофагами снижают риск контаминации образцов бактериальными штаммами ESKAPE-патогенов, при чем АА супергидрофобных нанотекстурированных подложек из алюминиевого сплава за счет бактериофагов, сорбированных на их поверхностях, становится выше в 200 раз.

Оценка влияния коррозионной стойкости поверхностей металлов с экстремальной смачиваемостью на их антибактериальную активность
Влияние коррозионной стойкости на АА исследуемых образцов из магния

В основе процесса коррозии сплава лежат химические и электрохимические реакции, в результате которых образуются продукты коррозии, что сопровождалось, в случае с магниевым сплавом, выделением газообразного водорода, диффузным помутнением и изменением рН среды в резко щелочную сторону. Последнее обуславливало в большей степени снижение титра бактерий в суспензии, контактировавшей с магниевыми пластинами в экспериментах,

проведенных согласно 3 протоколу. Изменение рН в рассматриваемых системах можно принимать как индикатор растворения магниевого сплава как в PBS с суспензиями *P. aeruginosa* B-3086 и *K. pneumoniae* B-811, так и в PBS, свободном от бактерий (Рисунок 9).

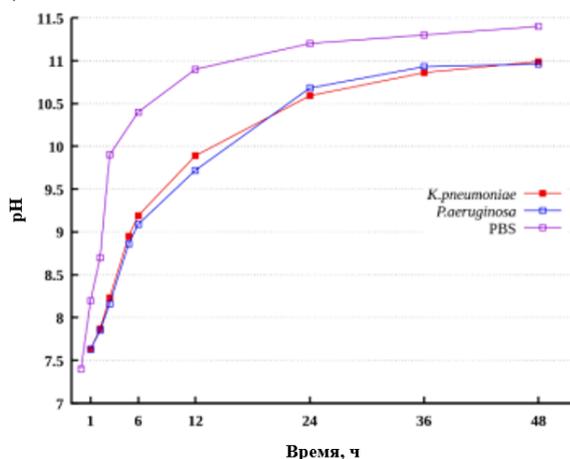


Рисунок 9 - Изменение рН среды в зависимости от продолжительности взаимодействия между PBS с бактериями или без них и образцом с супергидрофобным покрытием из сплава МА8

Супергидрофобное состояние поверхности обеспечивало существенную защиту от коррозии в хлоридсодержащих средах с нейтральным значением рН. Однако, значительное повышение рН вызывало разрушение химических связей в молекулах фтороксисилана, сорбированного на поверхность пластин в качестве гидрофобного агента, что приводило к образованию дефектов смачивания и десорбции гидрофобных молекул с поверхности, вызывая деградацию магниевого сплава и высвобождением Mg^{2+} в дисперсионную среду. В результате реакции замещения гидроксид магния превращался в растворимый хлорид, что повышало рН до значений выше 10,5 (Рисунок 10).

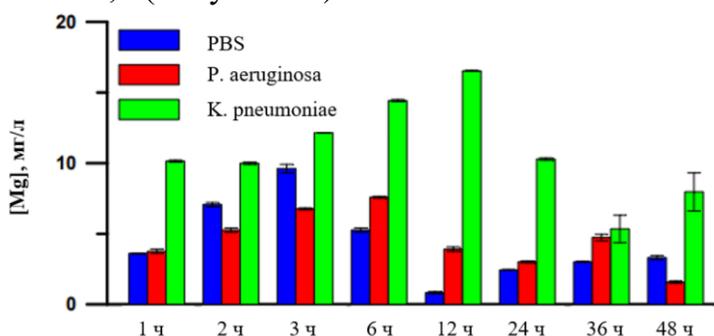


Рисунок 10 - Изменение концентрации магния в жидкой фазе в зависимости от продолжительности взаимодействия между образцом сплава МА8 с супергидрофобным покрытием и PBS с клетками *P. aeruginosa* B-3086 и *K. pneumoniae* B-811 или без них

Поскольку полученные концентрации Mg^{2+} имеют тот же порядок, что и типичные концентрации в клеточных жидкостях и заметно ниже, обсуждаемых в литературе как токсичные (V. Luque-Agudo et al., 2020; Z. Lin et al., 2021), механизм уничтожения бактерий, связанный с осмотическим действием сверхвысоких концентраций магния в рассматриваемых системах, можно было

исключить.

Влияние коррозионной стойкости на АА исследуемых образцов из меди

Для оценки влияния коррозионной стойкости на АА исследуемых образцов из меди, согласно 3 протоколу, был проведен анализ концентрации катионов меди в дисперсионной среде и накопления меди бактериями в течение шестидневного контакта супергидрофобных пластин с суспензией живых и мёртвых клеток (Рисунок 11).

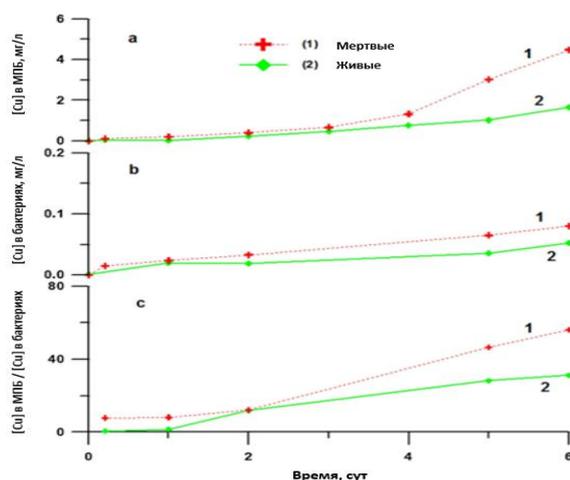


Рисунок 11 - Динамика изменения концентрации меди в МПБ (а), накопления меди клетками бактерий (b) и отношения содержания меди в МПБ к содержанию меди, захваченной бактериями (с), в зависимости от времени контакта между супергидрофобной поверхностью меди и бактериальной суспензией убитых (1) и живых (2) клеток *E. coli*

Параллельно измеряли титр живых клеток в ёмкости с супергидрофобным образцом и бактериальной суспензией (Рисунок 12).

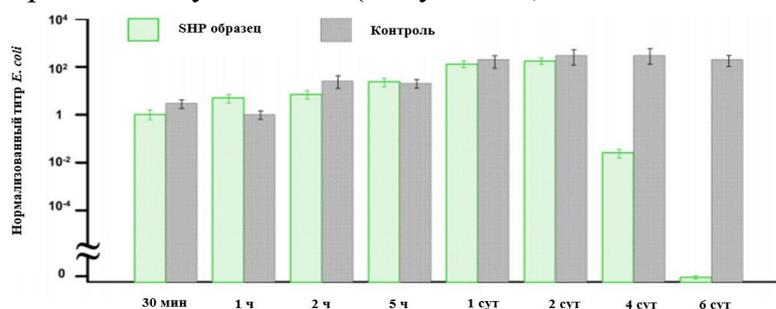


Рисунок 12 – Изменение титра *E. coli* K12 C600 в бюксе с бактериальной суспензией в зависимости от времени взаимодействия с супергидрофобной (зеленые столбики) и контрольной поверхностью (серые столбики) из медного сплава М1М

С усилением коррозионных процессов и увеличением концентрации Cu^{2+} в суспензии с живыми клетками с 3×10^{-3} до 0,37 мг/л в течение двух суток контакта также постепенно увеличивался и титр жизнеспособных бактерий, что обуславливается адаптацией и способностью сохранять жизнеспособность при воздействии субтоксичных концентраций меди. Механизмы ферментативной инактивации, эффлюксных насосов, изменения проницаемости наружной и внутренней бактериальных мембран для ионов меди, снижения восприимчивости клеточных мишеней к ионам металлов, внутри- и внеклеточной секвестрации ионов не позволяют защитить клетки от образования

активных форм кислорода и токсического действия меди при концентрациях выше некоторого критического значения. В наших экспериментах критической концентрацией Cu^{2+} можно считать 0,4 мг/л.

Таким образом, супергидрофобное покрытие образцов из меди и магния характеризовалось более высокой коррозионной стойкостью, препятствуя взаимодействию металлической подложки с компонентами суспензии, что приводило к подавлению перехода металлов из подложки в ионную форму в дисперсионной среде, тем самым сводя к минимуму выброс ионов в жидкую среду, снижая антибактериальную активность покрытия, как было отмечено выше.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модели контаминации бактериальными штаммами *A. baumannii* B-05, *K. pneumoniae* B-811, *P. aeruginosa* B-3086 и *S. aureus* 2004 нанотекстурированных поверхностей с экстремальной смачиваемостью из алюминиевого сплава AMG, медного сплава M1M, магниевое сплава M8 и нержавеющей стали марки 12X18H10T, имитирующие различные условия распространения ESKAPE-патогенов: в условиях «сухого» контакта в экспериментах с высыханием бактериальной суспензии на поверхности образцов, «мокрого» контакта с созданными условиями 100% влажности и «влажного» контакта в экспериментах с погружением исследуемых образцов в бактериальную суспензию.

2. Взаимодействие бактериальных штаммов с супергидрофильными поверхностями из алюминиевого сплава AMG и медного сплава M1M реализуется по механизму контактного уничтожения бактерий за счет пенетрации, деформации и повреждения клеточной мембраны текстурами на всей поверхности образцов, а в случае с супергидрофобными поверхностями – контактного уничтожения на вершинах гребней текстур, препятствия первичной адгезии и предупреждения колонизации бактерий, что связано с отрицательными значениями дзета-потенциалов бактериальных штаммов (*K. pneumoniae* B-811 - -27 мВ, *A. baumannii* 1053 - -43,1 мВ, *S. aureus* 2004 - -42,7 мВ, *P. aeruginosa* 3086 - -17 мВ), положительным зарядом у супергидрофильных металлических поверхностей в водных растворах и отрицательным - у супергидрофобных образцов.

3. Отрицательные значения дзета-потенциалов бактериофагов (*Klebsiella phage* KpV811 - -32,8 мВ, *Acinetobacter phage* AM24 - -24 мВ, *Pseudomonas phage* PA10 - -32,5 мВ, *Staphylococcus phage* SCH111 - -24,4 мВ) и штаммов бактерий позволяют исключить электростатический сценарий «стыковки» фага с бактериальной клеткой. Положительный заряд супергидрофильных образцов способствует адгезии отрицательно заряженных бактериофагов на их поверхности. При взаимодействии бактериофагов с супергидрофобными образцами свойства последних – водоотталкивание и отрицательный заряд на границе с водными

растворами, нивелируются за счёт применения в модельных экспериментах гексана, позволяющего осуществить сорбцию фаговых частиц на данном типе поверхностей.

4. Выраженным антибактериальным эффектом обладают супергидрофильные нанотекстурированные поверхности из алюминиевого сплава AMG, так в экспериментах по контаминации образцов *A. baumannii* B-05, *K. pneumoniae* B-811, *P. aeruginosa* B-3086, *S. aureus* 2004 он превышал антибактериальную активность супергидрофобных образцов в 2600 раз.

5. Разработанные ESKAPE-элиминирующие бионаноструктурированные композиции, представляющие собой устойчивые соединения супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностей из алюминиевого сплава AMG и медного сплава M1M с бактериофагами *Acinetobacter phage AM24*, *Klebsiella phage KpV811*, *Pseudomonas phage PA10*, *Staphylococcus phage SCH111* в титре не менее 10^6 БОЕ/мл, снижают риск контаминации образцов бактериальными штаммами *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, при чем антибактериальная активность супергидрофобных нанотекстурированных подложек из алюминиевого сплава за счет бактериофагов, сорбированных на их поверхностях, становится выше в 200 раз.

6. Коррозионные процессы, в результате которых происходит высвобождение наночастиц металлов, усиливают антибактериальную активность нанотекстурированных поверхностей из медного сплава M1M, что проявляется при увеличении концентрации Cu^{2+} выше 0,4 мг/л дисперсионной среды.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанные биотехнологические подходы к созданию композиций бактериофагов, сорбированных на супергидрофильных и супергидрофобных нанотекстурированных поверхностях из алюминия, меди, магния и нержавеющей стали могут применяться для других металлов и полимерных материалов, применяемых в практике здравоохранения.

2. Разработанная ESKAPE-элиминирующая бионаноструктурированная композиция рекомендуется к использованию на предприятиях медицинской промышленности при производстве хирургических инструментов, имплантируемых устройств, деталей эндоскопической техники, элементов операционных столов, ручек дверей и другого применяемого в лечебно-профилактических учреждениях оборудования с целью снижения риска распространения возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

3. При моделировании бактериальной контаминации металлических поверхностей с экстремальной смачиваемостью следует учитывать ростовые и ингибирующие свойства загрязняемых ESKAPE-патогенами объектов, соответствующие реальным условиям лечебно-профилактических учреждений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В дальнейшем предполагается продолжить исследования антибактериальной активности ESKAPE-элиминирующих бионаноструктурированных композиций, изготовленных из разнородных полимеров и металлических сплавов с использованием различных режимов текстурирования и сорбированных на них штаммов бактериофагов, а также видов бактерий, используемых для контаминации поверхностей.

Дополнительно запланированы исследования антибактериальных свойств ESKAPE-элиминирующих бионаноструктурированных композиций, входящих в состав поверхностей медицинских инструментов и инвентаря, непосредственно в лечебно-профилактических организациях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Каминский, В.В. Разработка органо-неорганических гибридных покрытий с сорбированными бактериофагами для снижения риска развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / В.В. Каминский, А.В. Алешкин, Э.Р. Зулкарнеев, И.А. Киселева, О.Г. Ефимова, К.А. Емельяненко, А.М. Емельяненко, Л.Б. Бойнович / Материалы IV научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 24-26 сентября 2018 г., г. Нижний Новгород. – Нижний Новгород, 2018. – С. 46.

2. Emelyanenko, A.M. Antibacterial properties of superhydrophobic and superhydrophilic copper in contact with bacterial dispersions / A.M. Emelyanenko, A.G. Domantovsky, V.V. Kaminsky, K.A. Emelyanenko, L.B. Boinovich // 33rd Conference of The European Colloid and Interface Society, Book of Abstracts, 8–13 September 2019, Leuven, Belgium. – Leuven, 2019. – P. 71.

3. Boinovich, L.B. Bactericidal activity of superhydrophobic and superhydrophilic copper in bacterial dispersions / L.B. Boinovich, V.V. Kaminsky, A.G. Domantovsky, K.A. Emelyanenko, A.V. Aleshkin, E.R. Zulkarneev, I.A. Kiseleva, A.M. Emelyanenko // Langmuir. – 2019. – V. 35, № 7. – P. 2832-2841.

4. Емельяненко, А.М. Антибактериальные свойства супергидрофильной текстурированной меди при контакте с бактериальными суспензиями / А.М. Емельяненко, В.В. Каминский, И.С. Пыцкий, А.Г. Домантовский, К.А. Емельяненко, А.В. Алешкин, Л.Б. Бойнович // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 10. – С. 474-478.

5. Каминский, В.В. Разработка комплекса бактериофагов с супергидрофильными и супергидрофобными нанотекстурированными поверхностями металлов, способствующего профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) / В.В. Каминский, А.В. Алешкин, Э.Р. Зулкарнеев, А.М. Затевалов, И.А. Киселева, О.Г. Ефимова, К.А. Емельяненко, А.М. Емельяненко, Л.Б. Бойнович // Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167, № 4. – С. 488-492.

6. Emelyanenko, A.M. Superhydrophobic copper in biological liquids: Antibacterial activity and microbiologically induced or inhibited corrosion / A.M. Emelyanenko, I.S. Pytskii, V.V. Kaminsky, E.V. Chulkova, A.G. Domantovsky, K.A. Emelyanenko, V.D. Sobolev, A.V. Aleshkin, L.B. Boinovich // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2020. – V. 185. – P. 110622.

7. Emelyanenko, A. Physico-Chemical and Biological Interactions between the Bacterial Cells and the Surface with Hierarchical Roughness / A. Emelyanenko, V. Kaminsky, K. Emelyanenko, A. Domantovsky, L. Boinovich // 35rd Conference of The European Colloid and Interface Society, Book of Abstracts, 5-10 September 2021, Athens, Greece. – Athens, 2021. – P. 266.

8. Emelyanenko, A.M. Antimicrobial activity and degradation of superhydrophobic magnesium substrates in bacterial media / A.M. Emelyanenko, V.V. Kaminsky, I.S. Pytskii, K.A. Emelyanenko, A.G. Domantovsky, E.V. Chulkova, A.A. Shiryaev, A.V. Aleshkin, L.B. Boinovich // *Metals*. – 2021. – V. 11, № 7. – P. 1100.

9. Emelyanenko, A.M. The mechanisms of antibacterial activity of magnesium alloys with extreme wettability / A.M. Emelyanenko, V.V. Kaminsky, I.S. Pytskii, K.A. Emelyanenko, A.G. Domantovsky, E.V. Chulkova, A.A. Shiryaev, A.V. Aleshkin, L.B. Boinovich // *Materials*. – 2021. – V. 14, № 18. – P. 5454.

10. Каминский, В. В. Эффективность и механизмы бактерицидного действия на *Escherichia coli* супергидрофильной поверхности магниевого сплава / В.В. Каминский, А.М. Емельяненко, А.В. Алешкин, К.А. Емельяненко, Л.Б. Бойнович // *Микробиология*. – 2021. – Т. 90, № 5. – С. 613-617.

11. Омран, Ф.Ш. Влияние биологической загрязненности медных поверхностей с экстремальным смачиванием на их антибактериальные свойства / Ф.Ш. Омран, В.В. Каминский, К. А. Емельяненко, А. М. Емельяненко, Л. Б. Бойнович // *Коллоидный журнал*. – 2023. – Т. 85, № 5. – С. 641–654.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА - антибактериальная активность

ИСМП - инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

ЛПО - лечебно-профилактические организации

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

МПБ - мясо-пептонный бульон

Cu^{2+} - катионы меди

Mg^{2+} - катионы магния

pH – водородный показатель

PBS - фосфатно-солевой буфер