

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физический институт им. П.Н. Лебедева
Российской академии наук

На правах рукописи

Настулявичус Алена Александровна

**ГЕНЕРАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ ПОДГРУППЫ МЕДИ
ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ И ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ**

Специальность 1.3.19 – лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физическом институте им. П.Н. Лебедева Российской академии наук (ФИАН).

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, доцент

Кудряшов Сергей Иванович (ФИАН)

Научный консультант: доктор физико-математических наук, профессор

Ионин Андрей Алексеевич (ФИАН)

Официальные оппоненты:

Петров Юрий Васильевич, доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник сектора плазмы и лазеров ФГБУН Института теоретической физики им. Л.Д. Ландау РАН

Леднев Василий Николаевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Центра биофотоники ФГБУН Федерального исследовательского центра «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (ИОФ РАН)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Защита состоится «10» октября 2022 года в 10:00 на заседании диссертационного совета 24.1.262.01 на базе Физического института им. П. Н. Лебедева РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 53.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИАН и на сайте института <http://www.lebedev.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.262.01
доктор физико-математических наук

А. С. Золотко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Наночастицы являются основным строительным блоком современных нанотехнологий. Благодаря квантовым и поверхностным эффектам они обладают различными уникальными свойствами, и поэтому используются во многих областях науки и техники [1]. Они нашли применение в качестве функциональных компонентов субволновых оптических устройств [2], сенсорных подложек для поверхностно-усиленной спектроскопии [3], систем биологической маркировки и зондирования [4], терагностики [5], а также для антибактериальных применений [6].

Метод генерации коллоидных наночастиц путем лазерной абляции в жидкости является одним из наиболее перспективных методов получения наночастиц. Актуальность и перспективность данного метода обусловлена простотой процесса, возможностью использования разных мишеней и жидкостей, чистотой продуктов абляции; жидкость является удобной буферной средой для сбора продуктов абляции [7]. Абляция металлических мишеней в жидких средах рассматривается как надежная альтернатива традиционным методам химического восстановления для получения коллоидов благородных металлов, так как такая стратегия считается экологически чистой («зеленая» технология»). Как метод, был предложен в начале 1990-х годов Фойтиком и др. [8], с тех пор активно развивается в различных аспектах [9-11]. Большой вклад в развитие метода внесли работы в области теоретического моделирования явления [12-14].

Большие количества и высокие концентрации наночастиц важны для разноплановых лабораторных исследований и их возможных применений в электротехнике, энергетике, в косметологии, биологии и медицине, в том числе для эффективной инактивации бактериальных биопленок. Нарботка граммовых количеств предполагает часы или даже дни работы лазерных установок [15], поэтому для высокопроизводительной, эффективной лазерной генерации коллоидных наночастиц надо понимать физическую природу процесса для

различных условий лазерной абляции (длины волны, длительности, плотности энергии, параметров фокусировки и частоты следования лазерных импульсов), что позволит выбрать эффективные режимы его реализации. Существенно, что в отличие от абляции на воздухе в жидкости на абляцию влияет дополнительный ряд факторов – таких, как нелинейные поглощение и фокусировка в самой жидкости, поглощение излучения на наночастицах, появление кавитационного пузыря, ударные волны в жидкостях, экранировка плазмой в случае наносекундной абляции и многое другое. При этом, несмотря на значительное количество работ по теоретическому моделированию процессов лазерной абляции и генерации наночастиц в жидкостях, данные явления рассматриваются пока в самой простой форме, и поэтому основные физические механизмы остаются малоисследованными.

Цели и задачи диссертационной работы

Цель работы: Экспериментально оценить эффективность генерации модельных наночастиц золота для разных лазерных систем ближнего ИК-диапазона (субпико-, пико- и наносекундной длительности) при сопоставимых условиях в водной среде при варьировании длительности излучения, энергии, скорости сканирования, и установить определяющие ее физические процессы, а также разработать лазерные методы инактивации бактериальных биопленок пищевых патогенов с помощью наночастиц металлов подгруппы меди. В связи с этим были поставлены и решены следующие задачи:

1. Предложить критерий сравнения эффективности генерации наночастиц для разных лазерных систем и способы его подтверждения;
2. Получить коллоидные растворы золотых наночастиц при сопоставимых условиях (количество жидкости, параметры фокусировки) для субпико-, пико-, наносекундной длительности лазерного излучения для длины волны в ближнем ИК-диапазоне в дистиллированной воде;

3. Охарактеризовать коллоидные растворы путем измерения коэффициента экстинкции коллоидов и количества удаленной массы
4. Установить физические процессы, определяющие эффективности генерации наночастиц для разных лазерных систем;
5. Разработать эффективные методы инактивации бактериальных биопленок на основе наночастиц металлов подгруппы меди.

Научная новизна работы

1. Для анализа эффективности лазерной генерации золотых наночастиц был предложен новый оптический критерий (эффективность генерации наночастиц = произведение объема коллоидного раствора на коэффициент экстинкции в области межзонных переходов) в пересчете на импульс и на единицу энергии излучения. Справедливость критерия подтверждена согласием с данными измерений потери массы золотой мишени при лазерной наработке наночастиц.
2. С помощью предложенных критериев исследована эффективность генерации золотых наночастиц при сопоставимых параметрах лазерных систем с субпико-, пико-, наносекундной длительностью импульса ближнего ИК-диапазона и частотой следования 20 кГц при сопоставимых параметрах сканирования и установлены оптимальные режимы в пересчете на импульс и на единицу энергии излучения.
3. Установлено влияние филаментации субпикосекундных лазерных импульсов на эффективность генерации коллоидных золотых наночастиц и потерю массы мишени в зависимости от положения геометрического фокуса в воде относительно поверхности мишени.
4. Впервые экспериментально установлена возможность описания массы генерируемых наносекундным лазерным излучением коллоидных наночастиц золота в дистиллированной воде с помощью известного универсального размерного соотношения для абляционного потока массы в

газах, контролируемого субкритической эрозионной плазмой, с учетом площади области абляции.

5. Показано, что наночастицы серебра и меди, осажденные на биопленки Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий пищевых патогенов при помощи метода прямого лазерного переноса при воздействии излучения наносекундной длительности, обладают высокой антибактериальной активностью.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенные экспериментальные исследования представляют практический интерес в области генерации коллоидных наночастиц в жидкости. Введенный параметр сравнения эффективности генерации наночастиц позволяет сравнивать разные системы наработки коллоидных наночастиц в растворах.

Показано, что при сравнении субпико-, пико-, наносекундной лазерной генерации золотых наночастиц для длины волны в ближнем ИК-диапазоне и частоты следования импульсов 20 кГц при сопоставимых параметрах сканирования в воде наибольшая эффективность наблюдается для наносекундной абляции. Эффективность на единицу энергии для пикосекундной генерации наночастиц оказывается выше на 1-2 порядка, чем для наносекундной.

Разработан и запатентован эффективный способ инактивации биопленок Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий пищевых патогенов с помощью прямого лазерного нанесения наночастиц.

Отдельные этапы диссертационной работы выполнены в рамках: - гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2020-775 «Фундаментальные исследования перемещений патогенных микроорганизмов и вирусов в пищевых системах и создание инновационных средств их предотвращения с использованием антимикробных материалов и физических методов воздействий на биологические объекты» (2020-2022 гг.).

Положения, выносимые на защиту

1. При сопоставимых параметрах фокусировки и сканирования излучения субпико-, пико- и наносекундных лазерных систем ближнего ИК-диапазона (длина волны — 1 мкм) эффективность лазерной наработки золотых наночастиц в дистиллированной воде и потеря массы в расчете на единицу энергии воздействующего лазерного импульса является максимальной для субпикосекундных и пикосекундных импульсов и лимитируется филаментацией в жидкости, тогда как для наносекундных импульсов она на порядок ниже и ограничивается формированием субкритической эрозионной плазмы.

2. При фокусировке ультракоротких лазерных импульсов (длительность — 0.3-10 пс) ближнего ИК-диапазона (длина волны — 1 мкм) в дистиллированной воде в режиме абляционной наработки наночастиц золота при достижении критической мощности самофокусировки для данной длины волны максимальная эффективность процесса достигается в области центра плазменного канала, сдвинутого относительно геометрического фокуса в области нелинейной фокусировки воздействующего лазерного импульса.

3. Предложен и апробирован применительно к инактивации бактериальных биопленок патогенных микроорганизмов метод лазерного переноса наночастиц металлов подгруппы меди под действием излучения ближнего ИК-диапазона (длина волны — 1 мкм) наносекундной длительности. Наночастицы серебра и меди с высокой концентрацией (до 30 мкг/см²), осажденные на биопленки Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий, имеют высокую антибактериальную активность по сравнению с золотыми наночастицами.

Степень достоверности

Достоверность результатов была подтверждена воспроизводимостью экспериментальных данных, полученных на сертифицированном оборудовании, успешным представлением на международных конференциях и публикациями в ведущих мировых научных журналах.

Апробация работы и публикации

Результаты работы представлены на следующих международных конференциях: «Современные проблемы физики и технологий», Москва, Россия, 2018 г; 5 International Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Lasers in Liquids, (ANGEL2018), Лион, Франция, 2018 г; «11th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications», (ICPEPA 11), Вильнюс, Литва, 2018 г; «International Conference on Ultrafast Optical Science – UltrafastLight» Москва, Россия, 2020 г; 6 th International Conference on Advanced Nanoparticle Generation & Excitation by Lasers in Liquids (ANGEL2021), Хефэй, Китай, 2021 г.; «International Conference on Ultrafast Optical Science – UltrafastLight» Москва, Россия, 2021 г.

Основные результаты работы опубликованы в семи статьях в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science, одном патенте РФ и семи материалах научных конференций. Список публикаций приведен на стр. 22-24.

Личный вклад автора

Цели диссертационной работы были сформулированы руководителем д. ф.-м. н. Кудряшовым Сергеем Ивановичем и обсуждались с автором работы. Все результаты, представленные в диссертационной работе, были получены автором лично или при его непосредственном участии.

В публикации [Nastulyavichus A., Smirnov N., Kudryashov S. Quantitative evaluation of LAL productivity of colloidal nanomaterials: which laser pulse width is more productive, ergonomic and economic? //Chinese Physics B. – Vol. 31.№.7.-P. 077832022. – 2022. (published online 17 February 2022)] автору принадлежат результаты, относящиеся только к генерации золотых наночастиц в жидкости в диапазоне длительностей от субпико до наносекунд.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав и заключения. Работа содержит 128 страниц печатного текста, 58 рисунков и 3 таблицы. Библиография включает 190 наименований.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении приведено обоснование актуальности выбранной темы, определены цели и задачи диссертационной работы, показана научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования, сформулированы выносимые на защиту положения, представлены публикации по теме диссертации и конференции, на которых производилась апробация работы.

В первой главе произведен обзор современного состояния в области диссертационного исследования. В первой части рассматриваются основные стадии взаимодействия лазерного излучения с металлами для разных длительностей. Рассмотрены основные механизмы генерации наночастиц в жидкости для разных длительностей лазерного излучения и влияние параметров лазерного сканирования на эффективность генерации наночастиц.

Во второй главе описаны используемые в исследованиях лазерные установки. Экспериментальная схема представлена на рис.1.

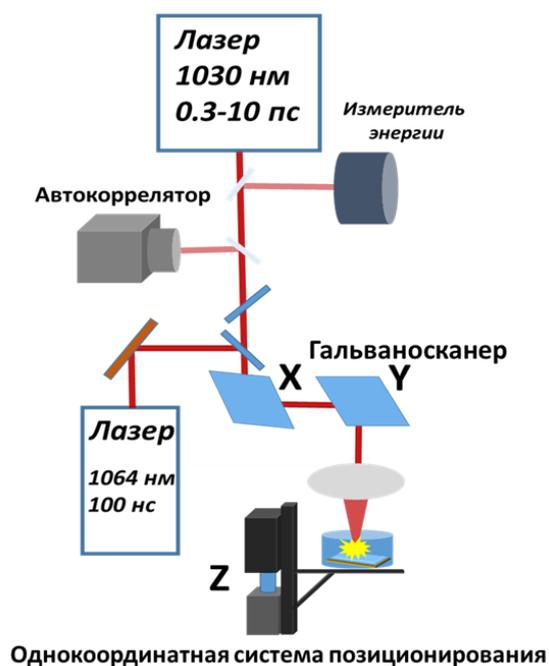


Рис.1. Экспериментальная схема.

Представлены методы исследования эффективности генерации наночастиц и их характеристики: оптическая спектроскопия, измерение потери массы на микровесах, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС), метод динамического рассеяния света. Предложен удобный критерий сравнения эффективности генерации наночастиц, основанный на измерении коэффициента экстинкции в области межзонных переходов, который умножается на объем раствора и пересчитывается на один импульс ($K_{МЗП} \times v/N$). Данный критерий косвенно характеризует общее количество наработанных наночастиц. Для подтверждения данного критерия используется потеря массы за импульс (M/N). Вторым критерием, используемым в данной работе и показывающим энергоэффективность генерации коллоидных наночастиц является эффективность (произведение коэффициента экстинкции в области межзонных переходов на объем раствора за импульс), деленная на единицу энергии, затраченной на генерацию коллоидного раствора ($K_{МЗП \times v} / E \times N$). Для подтверждения также исследовалась потеря массы на единицу энергии

($M/E \times N$). Приведена методика вычисления порогов абляции материала с использованием радиусов кратеров в зависимости от энергии в лазерном импульсе.

В третьей главе представлены результаты по исследованию эффективности и энергоэффективности лазерной генерации коллоидных золотых наночастиц в диапазоне длительностей от субпико- до наносекунд. Генерация наночастиц производилась на фемтосекундном (варьируемая длительность импульса от 0.3 до 10 пс) и наносекундном (длительность импульса: 100 нс) лазерах. На рис.2 (а, б) представлены зависимости эффективности генерации коллоидных наночастиц золота и потери массы от длительности лазерного излучения для разных энергий.

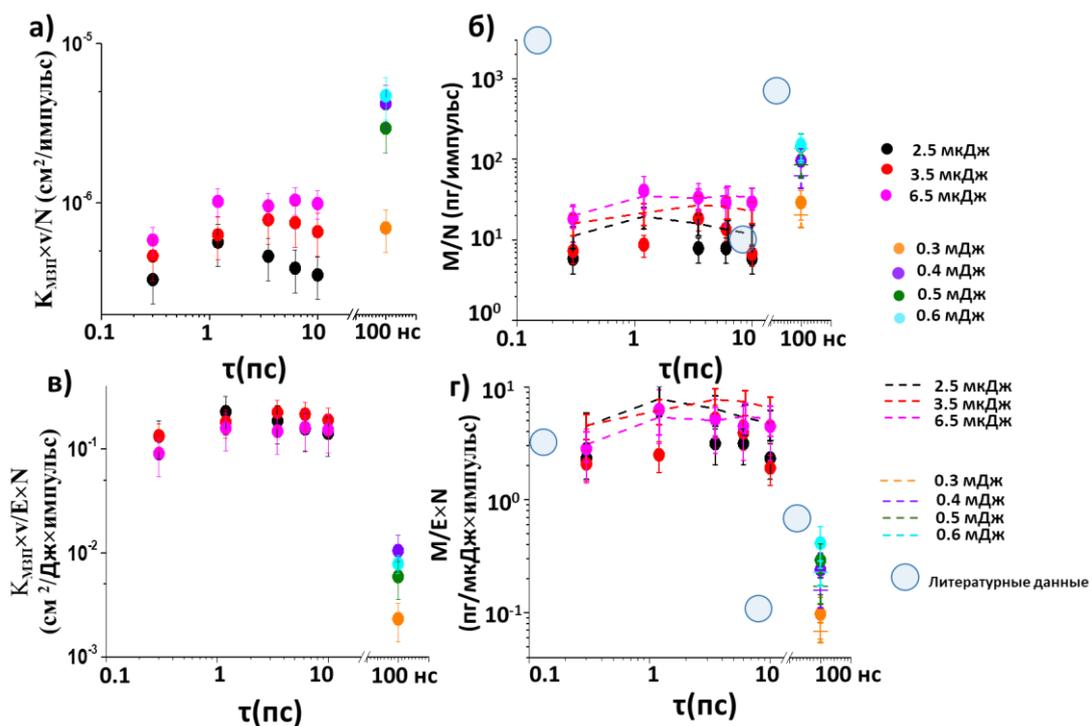


Рис.2. Зависимость эффективности (а), энергоэффективности (в) генерации наночастиц золота и потери массы (б), потери массы на единицу энергии (г) от длительности лазерного излучения; пунктирной линией представлены расчетные данные из коэффициента экстинкции для массы доли твердого вещества в растворе (1).

С ростом энергии наблюдается монотонный рост эффективности генерации наночастиц, которая больше в случае наносекундных длительностей. С увеличением длительности наблюдается спад эффективности в области субпикосекундных длительностей, который связан с возникновением нелинейных эффектов-самофокусировки и филаментации. Спад эффективности в области нескольких пикосекунд связан с акустической разгрузкой нагретого слоя в течение нагрева импульсом за счет волн разрежения, в которых осуществляется тепловое расширение нагретого вещества. Режим абляции для наносекундной абляции связан с механизмом фазового взрыва (гомогенное вскипание перегретой жидкости в околоскритической области) и субкритической эрозивной плазмой, для субпико-пикосекундной абляции основной вклад дает механизм фазового взрыва (разлет закритического флюида). Подобная тенденция наблюдается и для потери массы (Рис. 2б). Кроме того, есть согласие между потерей массы и расчетным значением доли массы вещества в растворе из коэффициента экстинкции (указаны на графике пунктирными линиями). Для расчета использовалась следующая формула:

$$M_{coll} = \{\rho_{Au} \times \nu\} \times \left\{ \frac{K_{МЗП}}{K_{МЗП,0}} \right\} / N, \quad (1)$$

где ρ_{Au} - плотность золота, ν -объем раствора, $K_{МЗП}$ - коэффициент экстинкции в области межзонных переходов для коллоидных растворов золотых наночастиц, $K_{МЗП,0}(400 \text{ нм}) \approx 6 \times 10^5 \text{ см}^{-1}$ - коэффициент поглощения объемного золота, N -число импульсов. Для сравнения на графике представлены литературные данные из работы Namad [20] по генерации золотых наночастиц для разных лазерных систем. Фемтосекундная и наносекундная генерация наночастиц в данной работе эффективнее, а результаты по пикосекундной абляции сопоставимы с нашими. Но стоит отметить, что в данной работе использовались более мощные установки.

Исследование энергоэффективности генерации золотых коллоидных наночастиц показало, что лазерные импульсы пикосекундной длительности, которые свободны от влияния нелинейных эффектов, обеспечивают эффективность в пересчете на единицу энергии импульса излучения на 1-2 порядка выше, чем для наносекундной длительности импульса (Рис.2 в). Сильный

эффект в области наносекунд связан с возникновением субкритической эрозионной плазмы, которая экранирует поверхность. Для массы тенденция подтверждается (Рис.2 г). Литературные данные из работы Namad [20] хорошо согласуются с нашими экспериментальными результатами.

В разделе 3.1 **третьей главы** была показана применимость универсального размерного соотношения для абляционного потока массы в газах, контролируемого субкритической эрозионной плазмой (2), которое было выведено для условий вакуума к абляции в жидкости.

$$M = 2.66 \times 10^{-6} \frac{\psi^{9/8} I^{1/2}}{A^{1/4} \lambda^{1/2} \tau^{1/4}} \quad (2)$$

Для этого был учтен размер площади области абляции и получена зависимость от интенсивности лазерного излучения $M(I) \propto I^{1/2} \times \frac{\pi D_0^2}{4} \ln(I/I_{abl})$.

Данная зависимость качественно описывает наши экспериментальные кривые для потери массы и эффективности генерации золотых наночастиц из объемной мишени в зависимости от интенсивности лазерного излучения для разных лазерных экспозиций (число импульсов в точку $N = 1-20$) (Рис.3). Голубая полоса на графике показывает угол наклона расчетной зависимости, который совпадает с поведением экспериментальных кривых.

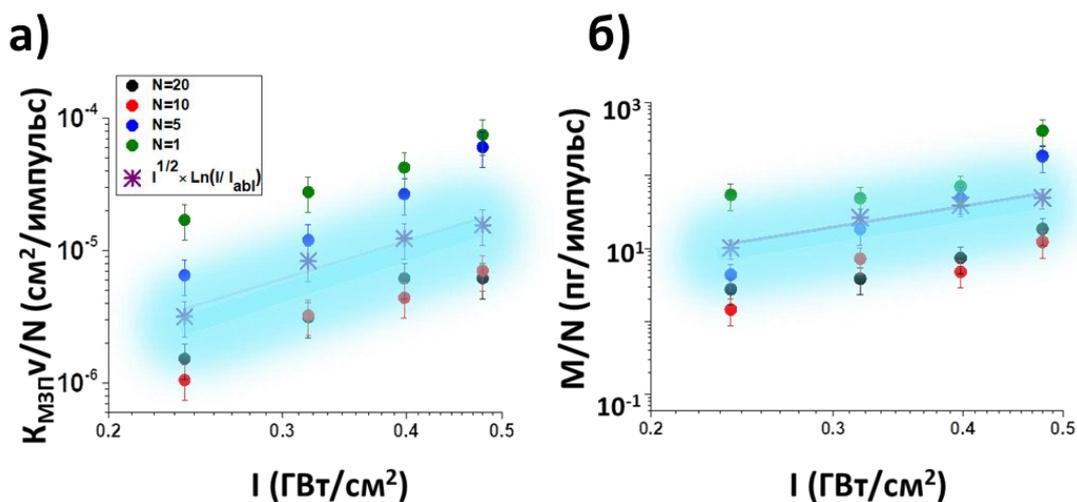


Рис.3. Зависимость эффективности генерации наночастиц (а) и потери массы (б) от интенсивности лазерного излучения для разных экспозиций.

С увеличением числа импульсов в точку эффективность генерации наночастиц и потеря массы падают, это связано с экранировкой лазерного излучения кавитационным пузырьком и ранее аблированными наночастицами. Диссоциация и ионизация продуктов абляции в эрозионной плазме позволяет в фазе схлопывания (коллапса) пузырька обеспечить агрегацию коллоидных частиц в жидкости с продуктами конденсации из рекомбинировавшей и расширившейся плазмы.

В разделе 3.2. **третьей главы** для подтверждения возникновения нелинейного эффекта- филаментации, который проявляется только для длительности 0.3 пс, была визуализирована с помощью черно-белой ПЗС камеры продольная структура плазменного канала в зависимости от приложенной пиковой мощности (рис. 4). Пунктирная линия показывает положение геометрического фокуса. При увеличении пиковой мощности длина плазменного канала меняется от 190 до 720 мкм и его центр смещается навстречу лазерному излучению.

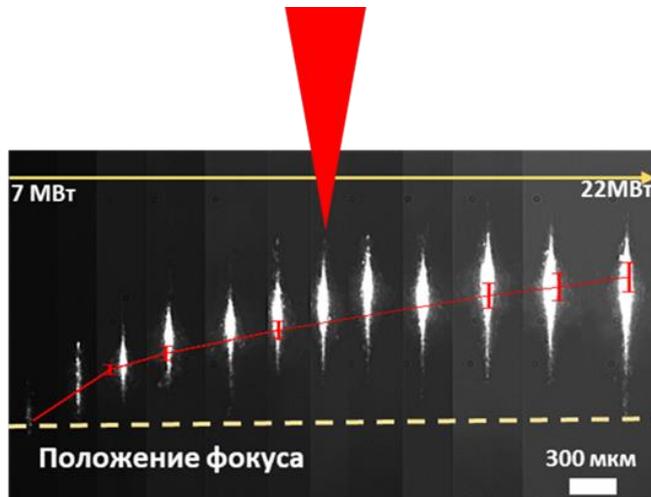


Рис.4. Визуализация плазменного канала для пиковых мощностей (красная линия показывает расчетное предполагаемое положение оптического пробоя жидкости).

Другим возможным механизмом возникновения плазменного канала является оптический пробой жидкости. Из экспериментальных данных был произведен расчет предполагаемого положения оптического пробоя в диапазоне рассматриваемых энергий. В результате, оказалось, что он попадает примерно в середину плазменного канала, что говорит скорее о филаментации, как о причине. Вторым доказательством проявления эффекта филаментации является сильно вытянутая форма одиночного плазменного канала.

Затем в **третьей главе** рассматривается влияние нелинейного фокуса на эффективность генерации коллоидных золотых наночастиц. В силу видимой неоднородности плазменного канала, эффективность генерации наночастиц будет зависеть от того, в какой его области разместить мишень. Для исследования этого эффекта менялось положение геометрического фокуса относительно мишени для двух режимов: дофиламентационного (10 пс) и филаментационного (0.3 пс). Сперва находился геометрический фокус для длительности 10 пс и производилась генерация наночастиц золота в дистиллированной воде для двух энергий (2.5, 6.5 мкДж) в геометрическом фокусе («0») и при смещении фокуса относительно мишени в положительном направлении (в сторону фокусирующей оптики, вглубь мишени) и в отрицательном (фокус в жидкости). То же самое повторялось для длительности 0.3 пс. Затем производилось снятие спектров пропускания наработанных коллоидных растворов золотых наночастиц, которые после этого пересчитывались в коэффициент экстинкции. Следующим шагом было построение значения коэффициента экстинкции в области межзонных переходов с учетом объема раствора и числа импульсов точку (критерий эффективности) в зависимости от положения геометрического фокуса (Рис. 5). Для подтверждения полученных результатов был задействован второй критерий- измерение потери массы за импульс.

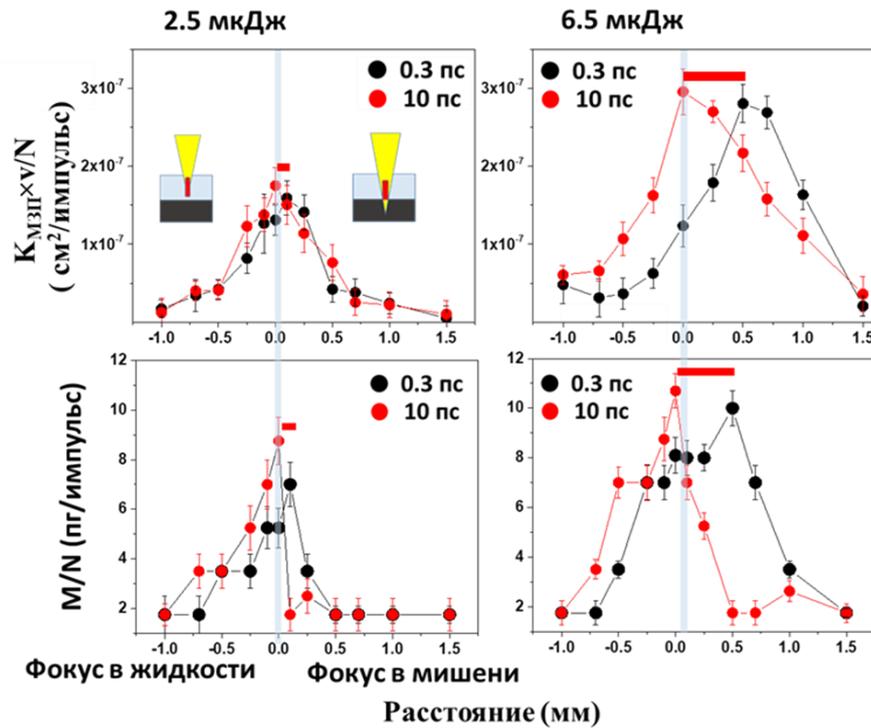


Рис.5. Эффективность генерации коллоидных золотых наночастиц (а, б) и потеря массы за импульс (в, г).

Максимум эффективности генерации наночастиц и потери массы для длительности импульса 10 пс в случае обеих рассмотренных энергий соответствует геометрическому фокусу, при смещении фокуса в положительном и отрицательном направлениях происходит их спад. Для длительности импульса 0.3 пс максимум эффективности генерации наночастиц и потери массы для энергии 2.5 мкДж смещается от геометрического фокуса \approx на 120 мкм, а в случае энергии 6.5 мкДж \approx на 500 мкм. Данные значения соответствуют смещению в область центра плазменного канала.

В разделе 3.4. **третьей главы** рассматривается эффективность генерации золотых наночастиц из тонких пленок толщинами 85, 175 и 330 нм. Лазерная абляция тонких пленок золота в дистиллированной воде в режиме фазового взрыва и опосредованная плазмой в случае наносекундной длительности была охарактеризована для различных энергий лазерного излучения, экспозиций и длительностей импульса в широком диапазоне 300 фс – 100 нс, сравнивая такие характеристики, как потеря массы, коэффициент экстинкции коллоидных

растворов в области межзонного перехода. Показано, что с увеличением длительности и энергии наблюдается увеличение эффективности генерации наночастиц для всех режимов. Установлено, что одноимпульсное воздействие является наиболее эффективным для удаления материала.

Показано, что для самой тонкой пленки наблюдается увеличение размера частиц с увеличением энергии. Для пленок с толщинами 175 и 330 нм появляется более мелкая фракция размером около 10 нм для длительности импульса 300 фс. С увеличением длительности импульса наблюдается незначительное уменьшение размеров. Также для более толстой пленки характерны частицы большего размера. Для наносекундной генерации характерно бимодальное распределение ($\approx 20, 150$ нм), а при абляции самой толстой пленки наблюдаются частицы крупнее 500 нм.

Четвертая глава посвящена разработке методов инактивации бактериальных биопленок пищевых патогенов на основе наночастиц металлов подгруппы меди, получаемых в результате лазерной абляции.

В начале **четвертой главы** рассмотрен антибактериальный эффект коллоидных наночастиц серебра, полученных на фемтосекундном лазере Satsuma с длиной волны 1030 нм, энергией в импульсе: 5.5 мкДж и длительностями в импульсе: 0.3 и 10 пс. В качестве мишеней, из которых производилась наработка наночастиц, использовались серебряные пленки с толщинами 85, 175 и 330 нм. Полученные в результате абляции пленок наночастицы имеют сферическую форму. Размер частиц варьируется от 10 нм до 180 нм. В целом размер частиц, полученных для длительности 0.3 пс больше, чем для 10 пс, и наблюдается увеличение размеров частиц с ростом толщины пленки.

Исследования проводились на бактериальной культуре золотистого стафилококка. Антибактериальные свойства наночастиц серебра оценивали с помощью стандартного микробиологического теста окрашивания Live/Dead, который указывает на степень проницаемости (повреждения) клеточной мембраны (Рис.6). Мертвые бактерии окрашиваются в красный цвет, а живые в зеленый. Как показали результаты, наибольшей эффективностью обладают

наночастицы, полученные с помощью лазерного излучения с длительностью импульса 10 пс. Вероятной причиной является более высокая концентрация наночастиц, полученная при длительности 10 пс по сравнению с 0.3 пс. Этот эффект, возможно, связан с нелинейным эффектом, таким как филаментация, которая мешает производству наночастиц.

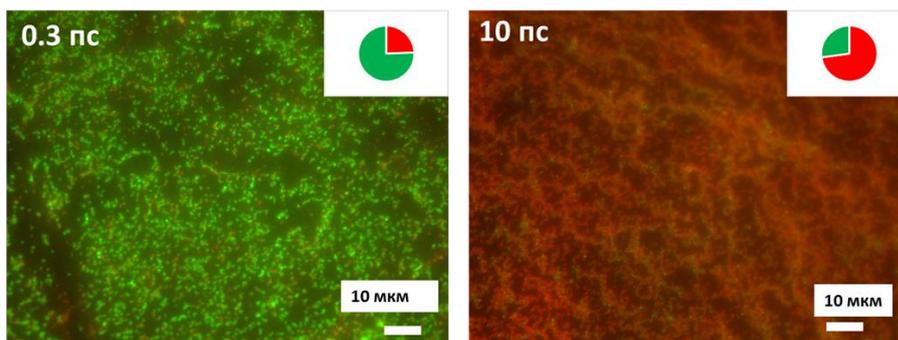


Рис.6 Микробиологические тесты Live/Dead на покрытиях из наночастиц серебра по отношению к бактериям золотистого стафилококка.

Эффект антибактериальных покрытий на основе наночастиц недолог. После первого применения они становятся непригодными. Они действуют в основном только на слой бактерий, который непосредственно соприкасается с наночастицами, на остальные бактерии действие уже не распространяется. И не стоит забывать эффект дозы. Концентрация, которая имеет ингибирующий эффект на бактерии в планктонной форме, не справится с бактериальной биопленкой.

В связи с этим возникла потребность разработки более эффективного метода. Раздел 4.2. **четвертой главы** посвящен новому разработанному и запатентованному методу инактивации бактерий на основе прямого лазерного переноса наночастиц металлов подгруппы меди из тонких пленок непосредственно на бактериальные биопленки сверху. Благодаря этому методу удастся достичь концентрации порядка 20-30 мкг/см². Метод заключается в предварительном напылении тонких металлических пленок (серебро, золото,

медь) на прозрачные гибкие полимерные (полиэтилен) подложки. Затем полимер с напыленной пленкой подвергается воздействию лазерного излучения наносекундной длительности с энергией в импульсе 0.2 мДж, частотой следования импульсов 20 кГц, и скоростью сканирования 1500 мм/с. Расстояние между мишенью и стеклом с биопленкой: 2 мм. Излучение фокусировалось на пленке. Возникающий в результате абляции расплав из наночастиц отлетал от мишени и попадал на стеклянную подложку с бактериальной биопленкой, где в итоге образовывались скопления наночастиц (Рис. 7 а)

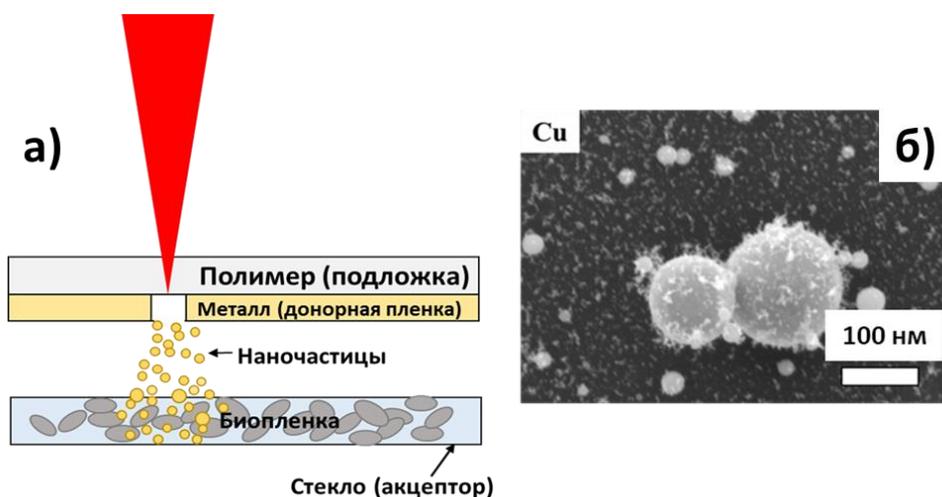


Рис.7 Схема переноса наночастиц на бактериальные биопленки (а), СЭМ-визуализация частиц меди.

Наночастицы, получаемые в результате переноса, преимущественно имеют сферическую форму и покрыты сверху «пушистой» оболочкой из углерода. На рис. 7 б в качестве примера показана СЭМ- визуализация наночастиц меди, которые переносились на кремниевую подложку. Размер частиц варьируется от 10 до 200 нм.

В работе производилось исследование доли перенесенного вещества с пленки на стеклянную подложку в зависимости от толщины пленки, плотности энергии, и расстояния между донором и акцептором. Было показано, что эффективность переноса растет с увеличением плотности энергии лазерного излучения, уменьшением расстояния между донором и акцептором и уменьшением толщины пленки.

В конце **четвертой главы** представлены результаты антибактериальных тестов. В работе использовались бактериальные биопленки Грам-положительных: золотистый стафилококк (*Staphylococcus Aureus*), листерия (*Listeria Monocytogenes*) и Грам-отрицательных: сальмонелла (*Salmonella*), синегнойная палочка (*Pseudomonas Aeruginosa*) пищевых патогенов. На предварительно выращенные на стерильных стеклах суточные бактериальные биопленки за счет лазерного переноса осуществлялось нанесение наночастиц серебра, золота и меди. После осуществления обработки микробиологами были проведены титрование и высевы, после чего стандартным микробиологическим методом определена концентрация бактерий в КОЕ (колониеобразующая единица- т.е. количество жизнеспособных бактерий, которые могут дать потомство). В качестве контроля использовались необработанные стекла с биопленками (нативная биопленка). Исследования показали, что наночастицы металлов серебра и меди обладают выраженными антибактериальными свойствами. Полученные результаты демонстрируют полное подавление роста микроорганизмов, что проявляется значительным снижением количества КОЕ изучаемых бактерий (таблица 1). Бактерицидного эффекта при переносе наночастиц золота и при воздействии лазером через пластиковую подложку без металлической пленки не обнаружено. Эти результаты показывают, что бактерицидная активность не связана с лазерным воздействием и температурой металлических наночастиц.

Таблица 1. Результаты антибактериальных тестов

| Бактерии | КОЕ/мл бактерий | | | | |
|-------------------------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | Наночастицы серебра | Наночастицы меди | Наночастицы золота | Лазер через пластик | Нативная биопленка |
| <i>Salmonella</i> | 0 | 0 | 2×10^7 | 4×10^7 | 5×10^7 |
| <i>Listeria</i> | 0 | 0 | 5×10^7 | 2×10^7 | 8×10^7 |
| <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> | 0 | 0 | 3×10^8 | 1×10^8 | 6×10^8 |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | 0 | 0 | 3×10^7 | 1×10^7 | 3×10^7 |

3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Данная работа посвящена исследованию физических процессов, определяющих эффективность лазерной генерации золотых наночастиц для диапазона длительностей субпико-, пико-, наносекунд в дистиллированной воде, и возможностей их применения как антибактериальных агентов. В ходе этих исследований были получены следующие основные результаты:

1. При генерации наночастиц золота слабофокусированными ультракороткими лазерными импульсами (0.3-10 пс) с длиной волны 1030 нм в дистиллированной воде (толщина слоя жидкости над поверхностью образца: 2 мм) обнаружено возникновение нелинейного фокуса при достижении критической мощности самофокусировки. Обнаружено смещение максимума эффективности абляции (потери массы мишени, коэффициента экстинкции коллоида) в сторону центра плазменного канала, визуализированного с помощью ПЗС камеры, положение которого зависит от пиковой мощности излучения.

2. Для анализа эффективности лазерной генерации золотых наночастиц при сопоставимых параметрах лазерных систем с различной длительностью импульса (субпико-, пико-, нс) был предложен и апробирован критерий сравнения (произведение объема коллоидного раствора на коэффициент экстинкции в области межзонных переходов) в пересчете на импульс и на единицу энергии излучения.

3. Наибольшая эффективность при сравнении субпико-, пико-, наносекундной лазерной генерации золотых наночастиц для длины волны в ближнем ИК-диапазоне и частоты следования импульсов 20 кГц при сопоставимых параметрах сканирования в жидкости наблюдается для наносекундной абляции, лимитируемой формированием субкритической эрозионной плазмы, и впервые описывается соответствующим размерным соотношением для плазмы с учетом площади области абляции. Вместе с тем, эффективность на единицу энергии для пикосекундной генерации наночастиц, свободной от влияния нелинейных эффектов оказывается выше на 1-2 порядка, чем для наносекундной.

4. Разработан и апробирован эффективный способ инактивации биопленок Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий пищевых патогенов на основе метода прямого лазерного переноса (длина волны — 1064 нм, длительность - 100 нс, энергия в импульсе — 0.2 мДж) металлических пленок нанометровой толщины с полимерной подложки в виде наночастиц серебра и меди (по сравнению с золотыми наночастицами) с высокой концентрацией (20-30 мкг/см²).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus

1. Nastulyavichus A., Smirnov N., Kudryashov S. Quantitative evaluation of LAL productivity of colloidal nanomaterials: which laser pulse width is more productive, ergonomic and economic? //Chinese Physics B. – 2022. – V. 31. – №. 7. – P. 077803 (published online 17 February 2022) <https://doi.org/10.1088/1674-1056/ac5602>

2. Nastulyavichus A.A., Kudryashov S.I, Ionin A.A., Yushina Yu. K., Semenova A.A., Gonchukov S.A. Focusing effects during ultrashort-pulse laser ablative generation of colloidal nanoparticles for antibacterial applications //Laser Physics Letters. – 2022. – Vol. 19. – №. 6. – P. 065601. <https://doi.org/10.1088/1612-202X/ac642e>

3. Nastulyavichus A.A., Kudryashov S.I., Ionin A.A., Gonchukov S.A. Optimization of nanoparticle yield for biomedical applications at femto-, pico- and nanosecond laser ablation of thin gold films in water// Laser Physics Letters. – 2022. – Vol. 19. – №. 4. <https://doi.org/10.1088/1612-202X/ac581a>.

4. Nastulyavichus A., Tolordava E., Rudenko A., Zazymkina D., Shakhov P., Busleev N., Romanova Yu., Ionin A., Kudryashov S. In vitro destruction of pathogenic bacterial biofilms by bactericidal metallic nanoparticles via laser-induced forward transfer//Nanomaterials.–2020.–Vol.10.–№11.–P.1-11. <https://doi.org/10.3390/nano10112259>.

5. Nastulyavichus A.A., Kudryashov S.I, Tolordava E.R., A.A. Rudenko, D.A. Kirilenko, Gonchukov S.A., Ionin A.A., Yushina Yu. K. Generation of silver nanoparticles from thin films and their antibacterial properties //Laser Physics Letters.- 2022.-Vol.19.-№.7-P. 075603.<https://doi.org/10.1088/1612-202X/ac7137>

6. Ионин А.А, Гончуков С. А. Зазымкина Д.А., Кириченко А.Н., Кудряшов

С.И., Настулявичус А. А., Романова Ю.М., Сараева И.Н., Смирнов Н.А., Толордава Э.Р. Гибридные лазерные нанотехнологии для борьбы с резистентными бактериальными биопленками // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т. 84. – № 11. – С. 1537-1541.

<https://doi.org/10.31857/S0367676520110137>

7. Толордава Э.Р., Кудряшов С.И., Настулявичус А.А., Ионин А.А., Романова Ю.М. Аппликационный лазерный перенос наночастиц металлов на бактериальные биопленки // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – Т. 37. – № 4. – С. 192-195.

<https://doi.org/10.17116/molgen201937041192>

Патент

1. Патент № 2737417 С1 Российская Федерация, МПК А61L 2/08. Способ борьбы с бактериальными биопленками: № 2019138420 : заявл. 27.11.2019 : опубл. 30.11.2020 / С. И. Кудряшов, А. А. Ионин, Э.Р. Толордава, Ю.М. Романова, А. А. Настулявичус; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук (ФИАН)

Публикации в материалах конференций

1. А. Настулявичус, Н. Смирнов, С. Кудряшов, А. Ионин, И. Сараева. Высокопроизводительная генерация наночастиц, VII Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий». 16-21 апреля 2018 г, Сборник тезисов конференции. г. Москва, Россия, 2018 г. С. 166.

2. A. Nastulyavichus, S. Kudryashov, N. Smirnov, A. Rudenko D. Zayarny, A. Ionin. Scaling relationships for film-to-nanoparticles conversion during nanosecond laser ablation of silver films of variable thickness, 5 International Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Lasers in Liquids, (ANGEL2018), 03 – 07 June, 2018, Lyon, France, 2018. P.17.

3. A. Nastulyavichus, S. Kudryashov, N. Smirnov, I. Saraeva, A. Rudenko, A. Kharin, A. Ionin, D. Zayarny. Nanosecond and femtosecond laser ablation of silver films of variable thickness, 11th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications –ICPEPA 11, 10-14 September, 2018, Programme Book of Abstracts., Vilnius, Lithuania, 2018 P.167.

4. A. Nastulyavichus, S. Kudryashov, A. Rudenko, D. Zayarny, A. Ionin. Femto-nanosecond laser ablation of gold target in liquid. *International Conference on Ultrafast*

Optical Science -UltrafastLight-2020, 28 сентября по 02 октября 2020 г, Сборник тезисов конференции., г. Москва, Россия, 2020 г. С 188.

5. A. Nastulyavichus, S. Kudryashov, E. Tolordava, N. Smirnov, A. Rudenko, A., A. Ionin. Fighting pathogenic bacterial biofilms by bactericidal nanoparticles, 6 th International Conference on Advanced Nanoparticle Generation & Excitation by Lasers in Liquids (ANGEL2021), 16-18 June 2021, Hefei, China, 2021. P.32.

6. A. Nastulyavichus, S. Kudryashov, N. Smirnov, D. Zayarny, A. Ionin. Upscaling of laser-ablative nanoparticle production in liquids, 6 th International Conference on Advanced Nanoparticle Generation & Excitation by Lasers in Liquids (ANGEL2020), Hefei, China, 2021. P.89.

7. A. Nastulyavichus, E. Tolordava, S. Kudryashov, Yu. Yushina, A. Ionin. Metal nanoparticles for antibacterial treatment. *International Conference on Ultrafast Optical Science -UltrafastLight-2021*, 04 – 08 октября 2021 г, Сборник тезисов конференции, г. Москва, Россия 2021 г. С.252.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ, ЦИТИРОВАННОЙ В АВТОРЕФЕРАТЕ

1. Mohanraj V.J., Chen Y. Nanoparticles - A review // Trop. J. Pharm. Res. 2007. Vol. 5, № 1. P. 561–573.

2. Tribelsky M.I. [et al]. Small Dielectric Spheres with High Refractive Index as New Multifunctional Elements for Optical Devices // Sci. Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 1–7.

3. Liu X.X., Alù A. Subwavelength leaky-wave optical nanoantennas: Directive radiation from linear arrays of plasmonic nanoparticles // Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys. 2010. Vol. 82, № 14. P. 144305.

4. Sharma P. [et al]/ Gadolinium-Doped Silica Nanoparticles Encapsulating Indocyanine Green for Near Infrared and Magnetic Resonance Imaging // Small. 2012. Vol. 8, № 18. P. 2856–2868.

5. Meng Y. [et al]. Water-soluble and biocompatible sono/photosensitizer nanoparticles for enhanced cancer therapy // Nanomedicine. 2010. Vol. 5, № 10. P. 1559–1569.

6. Yuan Y. [et al]. TiO₂ nanoparticles co-doped with silver and nitrogen for antibacterial application // J. Nanosci. Nanotechnol. 2010. Vol. 10, № 8. P. 4868–4874.

7. Eroshova O.I. [et al]. Structural properties of silicon nanoparticles formed by pulsed laser ablation in liquid media // Crystallogr. Reports 2012 576. 2012. Vol. 57, № 6. P. 831–835.

8. Fojtik A., Henglein A. Laser ablation of films and suspended particles in a solvent: formation of cluster and colloid solutions // Berichte-bunsengesellschaft fur phys.

chemie. 1993. Vol. 97. P. 252–252.

9. Zhang D., Gökce B., Barcikowski S. Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117, № 5. P. 3990–4103.

10. Dolgaev S.I. [et al]. Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment // *Appl. Surf. Sci.* 2002. Vol. 186, № 1–4. P. 546–551.

11. Kabashin A. V., Meunier M. Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water // *J. Appl. Phys.* 2003. Vol. 94, № 12. P. 7941.

12. Petrov Y. V. [et al]. Hydrodynamic phenomena induced by laser ablation of metal into liquid // *Appl. Surf. Sci.* 2019. Vol. 492. P. 285–297.

13. Inogamov N.A. [et al]. Laser Ablation: Physical Concepts and Applications (Review) // *High Temp.* 2020. Vol. 58, № 4. P. 632–646.

14. Shih C.-Y. [et al]. The effect of pulse duration on nanoparticle generation in pulsed laser ablation in liquids: insights from large-scale atomistic simulations // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. Vol. 22, № 13. P. 7077–7099.

15. Sajti C.L. [et al]. Gram scale synthesis of pure ceramic nanoparticles by laser ablation in liquid // *J. Phys. Chem. C.* 2010. Vol. 114, № 6. P. 2421–2427.

16. Riabinina D., Chaker M., Margot J. Dependence of gold nanoparticle production on pulse duration by laser ablation in liquid media // *Nanotechnology.* 2012. Vol. 23, № 13. P. 135603.

17. Saraeva I.N. [et al]. Effect of fs/ps laser pulsewidth on ablation of metals and silicon in air and liquids, and on their nanoparticle yields // *Appl. Surf. Sci.* 2019. Vol. 470. P. 1018–1034.

18. Menéndez-Manjón A., Wagener P., Barcikowski S. Transfer-matrix method for efficient ablation by pulsed laser ablation and nanoparticle generation in liquids // *J. Phys. Chem. C.* 2011. Vol. 115, № 12. P. 5108–5114.

19. Maciulevičius M. [et al]. Pulsed-laser generation of gold nanoparticles with on-line surface plasmon resonance detection // *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 2013. Vol. 111, № 1. P. 289–295.

20. Hamad A., Li L., Liu Z. A comparison of the characteristics of nanosecond, picosecond and femtosecond lasers generated Ag, TiO₂ and Au nanoparticles in deionised water // *Appl. Phys. A.* 2015. Vol. 120, № 4. P. 1247–1260.