

## Лазерная инженерия микробных систем: новый инструмент для микробиологии

© Н.В. Минаев<sup>1</sup>, В.С. Жигарьков<sup>1</sup>, В.С. Чепцов<sup>1,2</sup>, В.И. Юсупов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт фотонных технологий, Курчатовский комплекс „Кристаллография и фотоника“ НИЦ „Курчатовский институт“, 108840 Троицк, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, 119991 Москва, Россия

e-mail: minaevn@gmail.com

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

В окончательной редакции 09.01.2024 г.

Принята к публикации 16.01.2024 г.

Одним из новых направлений лазерной биопечати является лазерная инженерия микробных систем (ЛИМС). В этой технологии происходит контролируемый перенос микрокапель геля с микроорганизмами с донорной подложки на акцепторные среды с помощью наносекундного лазерного импульса. При таком переносе на живые системы действуют различные физические факторы: облучение, ударные волны, скачки температуры. Проведено исследование влияния на клетки *Escherichia coli* наночастиц, которые образуются при разрушении тонкого золотого поглощающего покрытия донорной пластинки. Показано, что размеры этих наночастиц, их концентрация в коллоиде и  $\zeta$ -потенциал значительно зависят от энергии лазерного импульса. Установлено, что наночастицы Au (нчAu) оказывают определённое влияние на кинетику роста микроорганизмов. Проведена систематизация основных физических факторов, влияющих на микроорганизмы при их лазероиндуцированном пространственном переносе, и проанализированы наиболее важные с практической точки зрения научные результаты, полученные с помощью перспективной технологии ЛИМС.

**Ключевые слова:** лазерная биопечать, лазерная инженерия микробных систем, прямой лазероиндуцированный перенос, микробиология, факторы воздействия.

DOI: 10.61011/OS.2024.01.57557.16-24

### Введение

В настоящее время микробиология и медицина остро нуждаются в технологии, способной расширить базу культивируемых микроорганизмов [1]. Это необходимо, например, для поиска продуцентов новых антибиотиков [2] и биологически активных веществ [3]. Глубина проблемы заключается в том, что более 99% микроорганизмов не культивируются обычными способами, являясь своеобразной „микробной темной материей“ [4].

На решение этой амбициозной задачи направлена активно разрабатываемая технология лазерной инженерии микробных систем (ЛИМС) [5], а также подходы, связанные с лазерной биопечатью единичными клетками [6,7]. В ЛИМС с помощью импульсного лазерного излучения происходит прямой перенос на питательную среду микроскопических капель геля с микроорганизмами [8,9]. При выделении клеток из природных сред такой подход позволяет сохранить естественное окружение микроорганизмов и убрать нежелательные взаимодействия между антагонистичными видами [10].

В процессе лазерного переноса на живые микросистемы действуют различные физические факторы: 1) прямое лазерное облучение, 2) ударные волны, 3) импульсный нагрев и 4) динамические воздействия при ускорении и „приземлении“ [11–15].

Еще одним фактором, воздействующим на микроорганизмы при лазерном переносе, являются наночастицы тонкого металлического поглощающего покрытия донорной подложки [16–19]. Известно, что наночастицы различных металлов могут по-разному воздействовать на микроорганизмы [20–22]. Представляет определенный интерес изучение влияния наночастиц, образующихся при биопечати, на физиологическое состояние микроорганизмов и, в частности, на характеристики и динамику их роста.

В настоящей работе проведено исследование распределения по размерам наночастиц, образующихся из тонкого поглощающего слоя золота при воздействии лазерного импульса с различной энергией, и выявлено их влияние на клетки *Escherichia coli*. Помимо этого, предпринята попытка систематизации основных физических факторов, влияющих на микроорганизмы при их лазероиндуцированном пространственном переносе, и проанализированы наиболее важные с практической точки зрения научные результаты, полученные с помощью ЛИМС-технологии.

### Материалы и методы

Основу ЛИМС-системы составляет импульсный лазер с длиной волны 1064 nm и длительностью импульса

8 ns [9]. С помощью гальваносканирующей системы и F-theta-объектива лазерное излучение фокусируется в пятно диаметром  $30\ \mu\text{m}$  на металлической поглощающей пленке толщиной  $\sim 50\ \text{nm}$  донорной пластины. В технологии ЛИМС на поглощающее покрытие наносится слой гидрогеля (1.5–2% водный раствор гиалуроновой кислоты) с биоматериалом толщиной  $\sim 200\ \mu\text{m}$ . Воздействие лазерного импульса приводит к сильному нагреву материала поглощающей пленки, последующему образованию парогазового пузыря, приводящего к формированию струи гидрогеля и переносу микрокапли на акцепторные среды.

Объектом исследования являлся штамм *Escherichia coli* ATCC-25922 и наночастицы, синтезированные с помощью лазерных импульсов, идентичных используемым при ЛИМС [23]. Использовались нчAu, полученные при абляции слоя Au толщиной  $50\ \text{nm}$  импульсным волоконным лазером YLPM-1-4x200-20-20 (ООО НТО „ИРЭ-Полус“, Россия) с длиной волны  $1064\ \text{nm}$ , длительностью импульса  $8\ \text{ns}$  и при двух энергиях импульсов —  $16$  и  $45\ \mu\text{J}$ . Абляция металлических пленок донорных подложек производилась в воде milli-Q, объем воды в кювете составлял  $3\ \text{ml}$ , количество импульсов для каждой энергии —  $225000$ . Подробно процесс синтеза наночастиц с использованием системы на основе наносекундного лазера описан в статье [23]. Оценка размеров синтезированных частиц, их концентрации и  $\zeta$ -потенциала осуществлялась посредством метода динамического рассеяния света (ДРС) с использованием прибора Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). Полученные наночастицы и микроструктуры изучались с помощью растрового электронно-ионного микроскопа Helios Nanolab 600i (FEI, США).

Для всех экспериментов биомасса бактерий наращивалась в жидкой среде LB (Merck, Германия) на качалке при комнатной температуре ( $23 - 25^\circ\text{C}$ ) в течение двух суток. Затем биомасса собиралась центрифугированием в течение  $3\ \text{min}$  при  $13400\ \text{rpm}$  и трижды промывалась фосфатно-солевым буферным раствором (PBS).

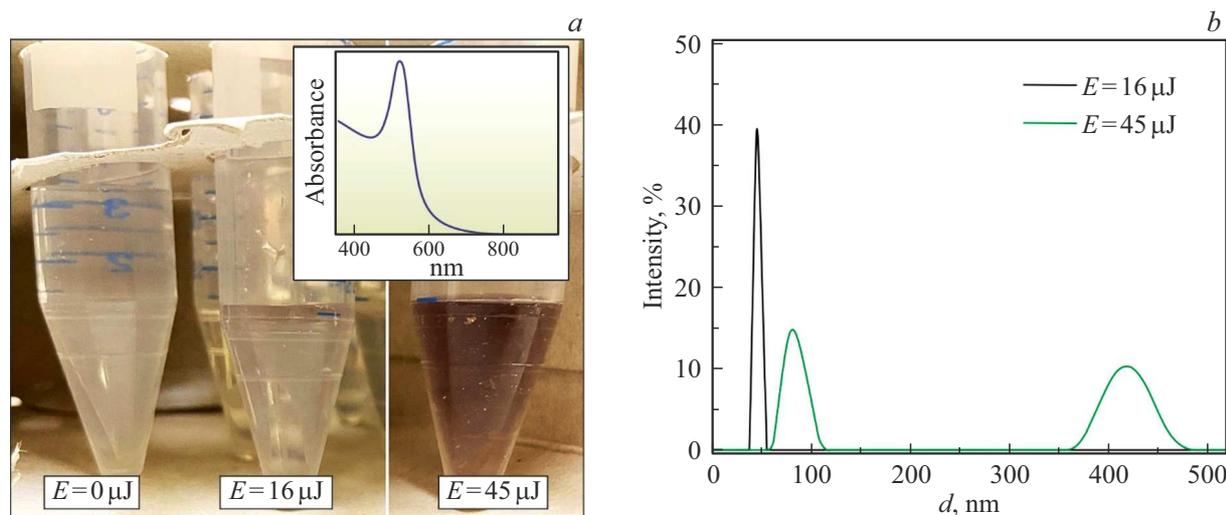
Затем были построены кривые зависимости оптической плотности суспензий клеток в PBS от концентрации клеток *E. coli*. Для этого был приготовлен ряд двукратных разведений суспензий клеток в PBS и измерена их оптическая плотность с помощью планшетного фотометра iMark (BioRad, США) при длине волны  $595\ \text{nm}$ . В тех же суспензиях была определена численность бактериальных клеток с помощью эпифлуоресцентной микроскопии с красителем акридиновым оранжевым на микроскопе Primo Star (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентной системой AmScore (AmScore, США). Полученные кривые в дальнейшем использовались для приготовления суспензий с заданными концентрациями клеток.

Для оценки влияния наночастиц на численность жизнеспособных клеток были приготовлены суспензии *E. coli* в PBS с концентрациями  $7.5 \cdot 10^5$  и

$7.5 \cdot 10^3\ \text{cell/ml}$ . Далее  $100\ \mu\text{l}$  суспензии клеток смешивали со  $100\ \mu\text{l}$  суспензии наночастиц, предварительно обработанных в ультразвуковой ванне NU20 (Nordberg, Китай) в течение  $1\ \text{h}$ , а также со стерильной дистиллированной водой ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) в качестве контроля. Таким образом, получались суспензии с концентрациями клеток *E. coli*  $3.8 \cdot 10^5$  и  $3.8 \cdot 10^3\ \text{cell/ml}$ , концентрациями наночастиц, синтезированных при  $16$  и  $45\ \mu\text{J}$ ,  $6 \cdot 10^{11}$  и  $1.1 \cdot 10^{11}\ \text{particles/ml}$  соответственно в 0.5-кратном PBS. Суспензии инкубировались на вортексе при  $1000\ \text{rpm}$  в течение  $2\ \text{h}$ . Затем из данных суспензий готовились серии десятикратных разведений в 0.5-кратном PBS и проводился их посев на плотную питательную среду LB в пятикратной повторности. После инкубации в течение суток при  $+37^\circ\text{C}$  учитывалась численность колоний.

Для оценки влияния наночастиц на физиологическое состояние бактерий была изучена кинетика роста *E. coli* в присутствии наночастиц. Для этого были приготовлены суспензии *E. coli* в двукратной жидкой среде LB с концентрациями  $7.5 \cdot 10^5\ \text{cell/ml}$ . Затем  $100\ \mu\text{l}$  суспензии клеток и  $100\ \mu\text{l}$  суспензии наночастиц или  $\text{dH}_2\text{O}$ , обработанных ультразвуком, вносились в лунки 96-луночного планшета. Таким образом, лунки планшета содержали  $3.8 \cdot 10^5\ \text{cell/ml}$  *E. coli* в среде LB однократной концентрации и наночастицы, синтезированные при  $16$  и  $45\ \mu\text{J}$ , в концентрациях  $6 \cdot 10^{11}$  и  $1.1 \cdot 10^{11}\ \text{particles/ml}$  соответственно. Также для контроля возможного изменения оптической плотности вследствие испарения воды и для контроля возможной контаминации (в том числе перекрестной) некоторые лунки планшета заполнялись растворами без клеток *E. coli*. Затем планшет помещался в планшетный фотометр Sunrise (Tecan, Швейцария), и снималась оптическая плотность при длине волны  $620\ \text{nm}$  каждые  $30\ \text{min}$  в течение  $238\ \text{h}$  (около  $10\ \text{days}$ ) с интенсивным встряхиванием планшета в течение  $30\ \text{s}$  перед каждым измерением. Инкубация проводилась при комнатной температуре ( $23 - 25^\circ\text{C}$ ).

Анализ кинетических кривых проводился с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel, RStudio v. 4.1.2 (пакеты gcplyr и growthcurver) и Statistica 8.0. Перед анализом с помощью Microsoft Office Excel проводилась нормализация данных путем вычитания наименьшего измеренного значения из данных, полученных во всех точках измерений. Сглаживание кривых (устранение шумов) проводилось последовательным применением методов скользящей медианы и скользящего среднего при  $n = 3$  [24]. Затем проводился расчет параметров (длительность лаг-фазы [25], площадь под кривой, максимальная скорость роста и др.) каждой кинетической кривой с помощью пакетов gcplyr [24] и growthcurver [26], далее достоверность различий определялась с применением U-теста Манна-Уитни с использованием Statistica 8.0; аналогичным образом определялась достоверность различий в численности бактериальных колоний при посевах. Анализ кривых методом главных компонент проводился с применением Statistica 8.0.



**Рис. 1.** Аблированные при различных энергиях лазерного импульса нчAu. (а) Фотография пробирок с суспензиями наночастиц. На врезке показан типичный спектр поглощения для нчAu. (б) Распределение нчAu по размерам, определенное методом ДРС.

**Таблица 1.** Характеристики нчAu, полученные методом ДРС

Энергия в импульсе, $\mu\text{J}$	Средний гидродинамический диаметр, nm	Концентрация pcs/ml	$\xi$ -потенциал mV
16	$46 \pm 4$	$1.2 \cdot 10^{12}$	-5.4
45	$82 \pm 13$	$2.1 \cdot 10^{11}$	-32.4
	$416 \pm 28$	$1.5 \cdot 10^8$	

## Полученные результаты и обсуждение

На рис. 1 показаны пробирки с суспензией золотых наночастиц, полученных в условиях, применяемых при технологии ЛИМС при различных энергиях лазерных импульсов. С увеличением энергии суспензия выглядит более темной, что может свидетельствовать как об увеличении размеров полученных наночастиц, так и об увеличении их концентрации. Характерный бордовый цвет сформированного коллоидного раствора объясняется плазмонным поглощением нчAu (врезка на рис. 1, а), длина волны поглощения которого находится в видимом диапазоне. Измерения, выполненные методом ДРС, показали, что при  $E = 16 \mu\text{J}$  синтезируются наночастицы с узким распределением по размерам (на рис. 1, б)  $46 \pm 4 \text{ nm}$  (табл. 1). При  $E = 45 \mu\text{J}$  распределение по размерам имеет бимодальный вид, а средний гидродинамический диаметр нчAu составляет  $82 \pm 13$  и  $416 \pm 28 \text{ nm}$ . По размерам и концентрации нчAu (табл. 1) легко оценить, что в 1 ml суспензии для  $E = 16 \mu\text{J}$  содержится  $1 \text{ mg Au}$ , а для  $E = 45 \mu\text{J}$  —  $1 \text{ mg}$  и  $0.1 \text{ mg}$  в мелкой и крупной фракциях соответственно.

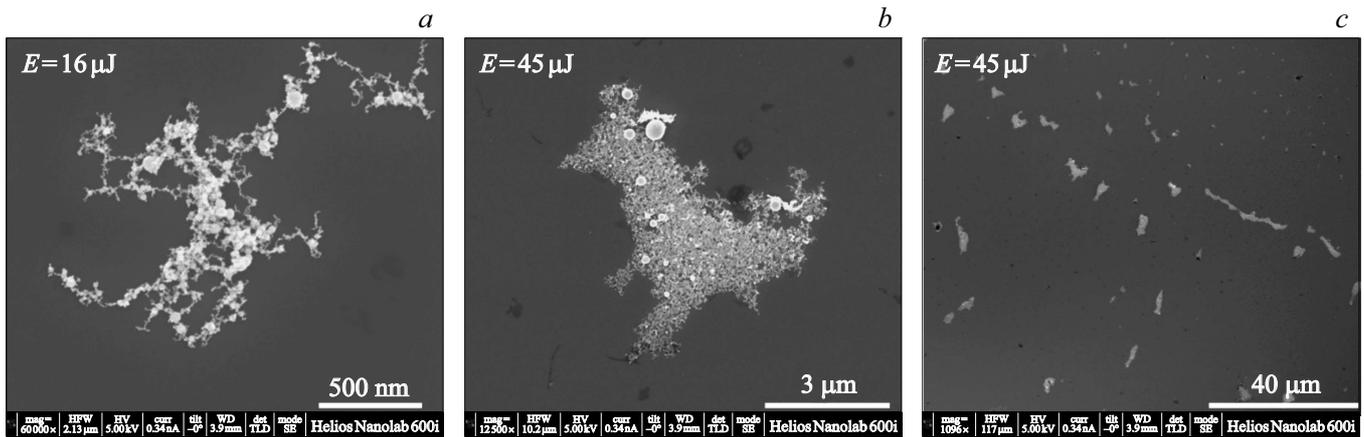
Как хорошо известно, что устойчивость коллоидных растворов во многом связана с дзета-потенциалом. При

этом значении  $\xi = 30 \text{ mV}$  (положительное или отрицательное) рассматривается как характерное значение для условного разделения низко- и высоко-заряженных поверхностей. Из табл. 1 видно, что  $\xi$ -потенциал суспензии, полученной при  $E = 16 \mu\text{J}$ , составляет всего  $-5.4 \text{ mV}$ . Это свидетельствует о плохой устойчивости коллоидной системы, что может приводить к коагуляции нчAu и осаждению. При  $E = 45 \mu\text{J}$  модуль  $\xi$ -потенциала превышает  $30 \text{ mV}$ , что указывает на хорошую устойчивость полученной суспензии [27].

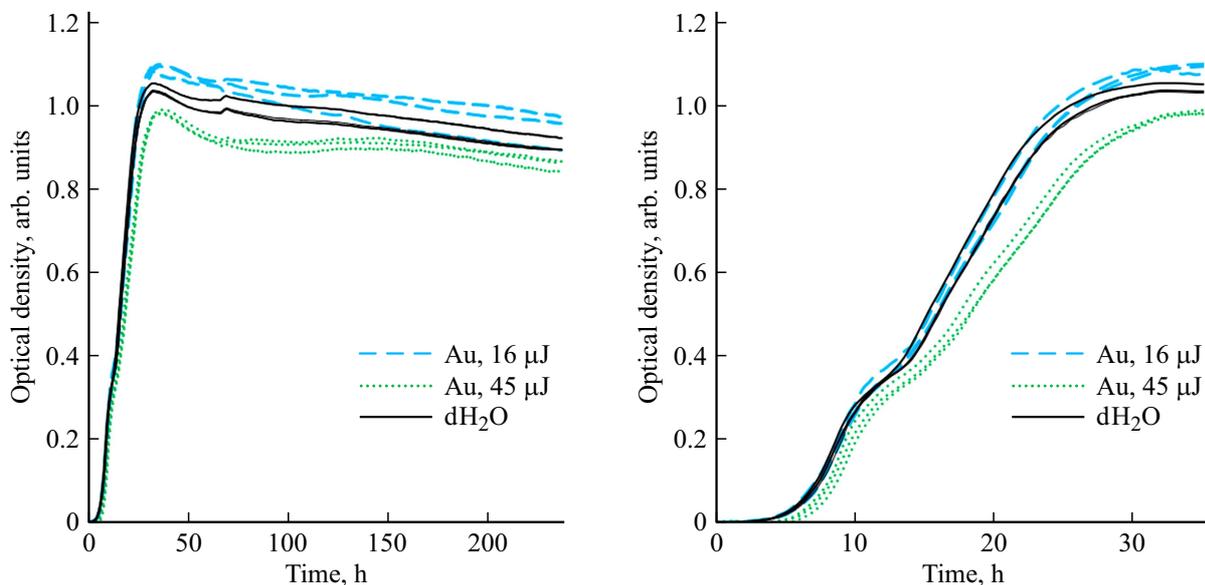
На рис. 2 показаны СЭМ-изображения нчAu, высаженных на поверхность кремниевой пластины. При энергии  $E = 16 \mu\text{J}$  образуются достаточно малые наночастицы, которые на поверхности кремниевой пластины собираются в бесформенные сгустки, частично с фрактальной структурой. При использовании энергии  $E = 45 \mu\text{J}$  на СЭМ-изображениях помимо мелкой фракции наночастиц видны относительно крупные субмикро- и микрочастицы. Мы полагаем, что в этом случае помимо абляции происходит ударное отслоение участков золотой пленки от стеклянной поверхности.

Инкубация в присутствии наночастиц не повлияла на численность колоний *E. coli*. Численность колоний во всех вариантах эксперимента составляла 96 – 99% от численности, определенной с помощью анализа оптической плотности суспензий клеток. Таким образом, воздействие наночастиц в течение 2 h не привело к гибели бактерий.

При культивировании в жидких средах в присутствии наночастиц также наблюдался рост бактерий во всех вариантах эксперимента, и все кривые роста имели форму логистических кривых (рис. 3). Кривые, полученные при внесении нчAu, синтезированных при  $E = 16 \mu\text{J}$ , в сравнении с контролем характеризовались увеличением средних значений лаг-фазы, площади под кривой, времени удвоения популяции, времени достижения точки



**Рис. 2.** СЭМ-изображения нчAu на поверхности кремниевой пластины, синтезированных при различных энергиях лазерного импульса.



**Рис. 3.** Кривые роста *E. coli* в зависимости от внесения нчAu, синтезированных при различных энергиях лазерных импульсов. Представлены кривые после нормализации и устранения шумов. Слева — кривые, полученные за все время измерений (238 h), справа — те же кривые, но в первые 35 h измерений.

перегиба логистической кривой и параметра емкости среды, однако отличия были статистически недостоверны ( $p > 0.05$ ) (табл. 2). При отсутствии изменений основных ростовых характеристик оптическая плотность среды с наночастицами в период 29 – 85 h культивирования была достоверно ( $p < 0.05$ ) выше, чем в контроле.

Кинетические кривые при культивировании с наночастицами, полученными с помощью импульсов с  $E = 45 \mu\text{J}$ , достоверно отличались как от контроля, так и от других исследованных наночастиц. Было выявлено увеличение длительности лаг-фазы, снижение скорости роста, площади под кривой, параметра емкости среды и увеличение времени удвоения популяции.

При анализе методом главных компонент кривые, полученные при внесении наночастиц, синтезированных

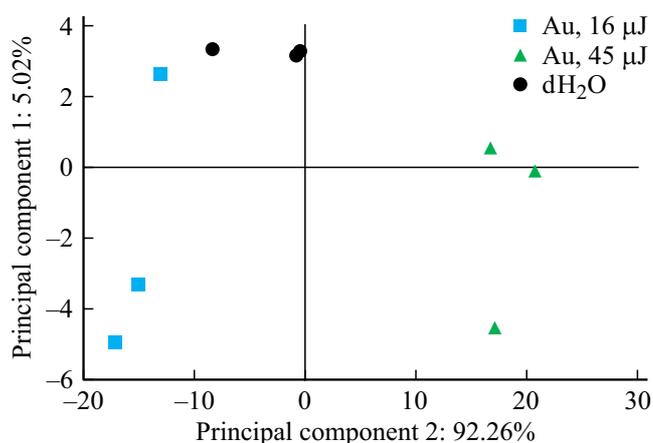
при  $E = 45 \mu\text{J}$ , группируются отдельно от других кривых (рис. 4), что также свидетельствует о влиянии наночастиц на ростовые характеристики бактерий.

Таким образом, выявлено слабое, но достоверное влияние частиц золота на ряд кинетических параметров *E. coli*, при этом наибольшее влияние оказали наночастицы, синтезированные при  $E = 45 \mu\text{J}$ .

К настоящему времени проведено довольно много работ по изучению влияния нчAu, образующихся при лазерной биопечати, на живые клетки. При этом показана низкая цитотоксичность наночастиц или ее полное отсутствие для клеток млекопитающих [28–30]. Однако влияние таких наночастиц на микроорганизмы ранее не изучалось. Наши данные согласуются с результатами, полученными для клеток млекопитающих — наночасти-

**Таблица 2.** Параметры кривых роста *E. coli* (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) в зависимости от внесения нчAu, синтезированных при различных энергиях лазерных импульсов. Разными буквами обозначены статистически достоверно отличающиеся значения

Воздействие	Лаг-фаза, h	Площадь под кривой	$k$ , емкость среды	$r$ , скорость роста	Время точки перегиба логистической кривой, h	Время удвоения популяции, h
dH <sub>2</sub> O	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	214.1 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.017 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Au, 16 $\mu$ J	2.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	223.6 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	15.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
Au, 45 $\mu$ J	4.8 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	199.8 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	16.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	2.78 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>



**Рис. 4.** Кривые роста *E. coli* в пространстве главных компонент.

цы не повлияли на численность клеток *E. coli* и слабо влияли на их рост. Антибактериальное действие нчAu, синтезированных другими методами, гораздо лучше изучено. Установлено, что нчAu в чистом виде как правило не обладают бактерицидным действием, однако могут проявлять бактерицидную активность в присутствии других веществ (например, при образовании органических комплексов Au) [31]. При этом в некоторых случаях было показано цитотоксическое действие чистых нчAu, синтезированных другими методами [32,33]. Известно, что действие наночастиц на клетку зависит от многих параметров — концентрации, формы, размера, состава наночастиц [34–36], что объясняет отсутствие подобных эффектов в нашем исследовании.

Следует отметить, что нами изучена выборка наночастиц, синтезированных в ходе большого количества лазерных импульсов и благодаря этому усредненных по своим характеристикам и концентрациям. Однако при одиночных импульсах возможно образование различного количества наночастиц, отличающихся по ряду параметров (форма, размер) [34,37,38]. Как упоминалось выше, эти параметры могут существенно влиять на эффекты, вызываемые наночастицами. В связи с этим можно предполагать, что при лазерном переносе каждой микрокапли геля с микроорганизмами возникают

несколько отличающиеся условия на начальных стадиях роста популяции клеток. Полученные данные отчасти объясняют наблюдавшийся ранее эффект увеличения культивируемого разнообразия бактерий при их выделении из почв с помощью ЛИМС в сравнении с микробиологическим посевом [39,40]. Лазерная биопечать из сложных природных сред, вероятно, не только обеспечивает пространственное разделение микробных клеток, но и увеличивает количество физиологических состояний и/или начальных условий культивирования микроорганизмов.

Другой целью нашего исследования была систематизация основных физических факторов, влияющих на микроорганизмы при лазерной биопечати, и наиболее важных с практической точки зрения научных результатов, полученных на сегодняшний день с помощью разрабатываемой ЛИМС-технологии. На рис. 5 в схематическом виде представлены физические факторы, воздействующие на клетки микроорганизмов при их переносе, и наиболее существенные возможности ЛИМС с точки зрения микробиологии.

С помощью различных исследований были определены оптимальные параметры, обеспечивающие стабильный перенос микрокапель заданного размера [41]. Установлено, что при оптимальных значениях поверхностной плотности лазерного импульса ( $F_0 = 1 - 4 \text{ J/cm}^2$ ) живые системы в геле подвергаются прямому лазерному облучению с  $F = 0.6 \text{ J/cm}^2$  (фактор 1 на рис. 5). Методами теневой съемки удалось зарегистрировать ударные волны, амплитуда давления в которых вблизи поглощающего покрытия в геле достигает 30 МПа [42].

Что касается критического для живых систем импульсного нагрева (фактор 3), то оказалось, что максимальные температуры поглощающего покрытия достигают почти 3000°C для Au и превышают 3000°C для Ti. Удивительно, но при этом в примыкающем к покрытию гидрогеле за время лазерного импульса нагревается до температуры  $\sim 100^\circ\text{C}$  только очень тонкий слой  $\sim 1 \mu\text{m}$  [43]. То есть можно утверждать, что температурные повреждения могут получать только микроорганизмы, которые находятся в области лазерного пятна и вплотную примыкают к поглощающему покрытию.

Значительный нагрев металлической пленки приводит к ее разрушению с образованием отверстий [40] и появ-

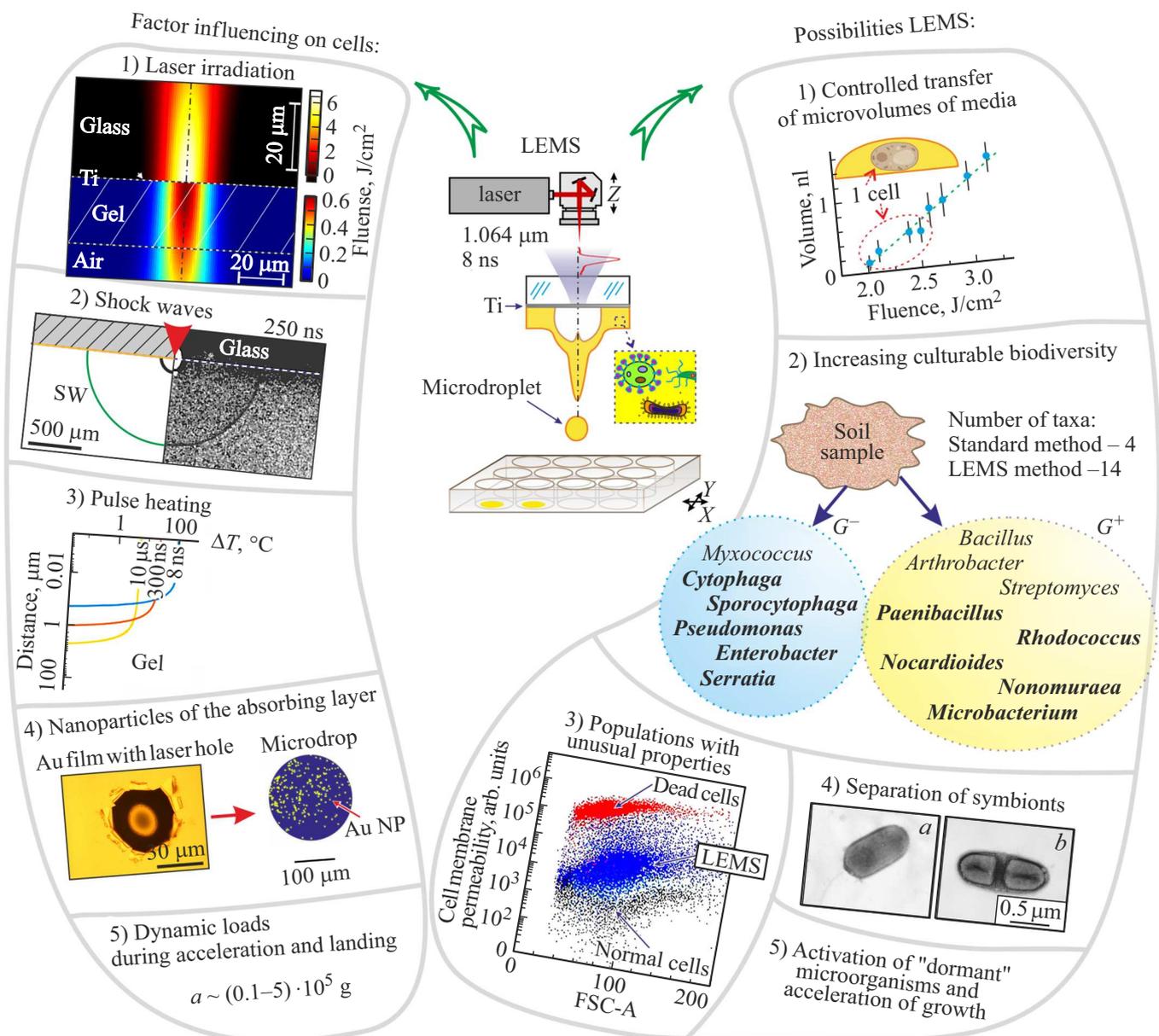


Рис. 5. Технология ЛИМС: физические факторы воздействия на микроорганизмы и наиболее существенные возможности.

лению в гидрогеле наночастиц. Однако практически все наночастицы остаются на донорной подложке и лишь от 0.5 до 2.5% переносятся с микрокаплей на акцепторную поверхность [39,44] (фактор 4 на рис. 5). При этом перенесенные с живыми системами наночастицы могут оказывать влияние на длительность лаг-фазы и скорость роста микроорганизмов. С помощью скоростной видеосъемки удалось установить, что скорость микроструи геля составляет 20 – 50 м/с, а динамические нагрузки (фактор 5) лежат в диапазоне 100 – 5000 км/с<sup>2</sup> [5,39], что обеспечивает перенос живых объектов без значительных повреждений [12,14,15,44].

В проведенных микробиологических исследованиях показана эффективность ЛИМС, которая, как мы по-

лагаем, связана с возможностью контролируемого и деликатного переноса микрообъемов от 0.1 нл, когда в микрокаплях содержится лишь по одной клетке при исходной концентрации  $(0.2 - 1) \cdot 10^6$  cell/ml. Достоверно установлено, что ЛИМС способствует значительному увеличению культивируемого биоразнообразия [5], позволяя выделять бактерии, трудно культивируемые или не культивируемые стандартными способами (2 справа на рис. 1). Технология приводит к появлению популяций с необычными свойствами (3 справа на рис. 1). Так, после переноса увеличивается проницаемость клеточных мембран [43]. ЛИМС способствует успешному выделению чистых культур [8], а также разделению устойчивых симбионтов [13] (4 справа на рис. 1). Так, впервые удалось

разделить устойчивую бинарную культуру, полученную из вод горячих источников Чукотки. Выделенный штамм был отнесен к новому классу с присвоением названия *Tepidiforma bonchosmolovskayae* [45].

## Заключение

В работе проведено исследование характеристик нчAu, образующихся при разрушении тонкого золотого покрытия донорной пластинки при лазерной биопечати. Показано, что размеры этих наночастиц, их концентрация в коллоиде и  $\zeta$ -потенциал значительно зависят от энергии лазерного импульса. На примере клеток *Escherichia coli* показано, что такие наночастицы могут оказывать определённое влияние на кинетику роста микроорганизмов. Проведена систематизация основных физических факторов, влияющих на микроорганизмы при их лазероиндуцированном пространственном переносе и проанализированы наиболее важные с практической точки зрения научные результаты, полученные с помощью ЛИМС-технологии. Накопленные в этой области знания позволяют сделать вывод о том, что новая разрабатываемая технология является новым интересным инструментом для микробиологии и имеет значительный потенциал для практических приложений в биотехнологии и медицине.

## Финансирование работы

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 20-14-00286) в части систематизации знаний о ЛИМС и проведения микробиологических исследований, а также частично поддержана государственным заданием НИЦ „Курчатовский институт“ в части лазерного синтеза материалов для изучения воздействия нчAu на микроорганизмы и использования оборудования ресурсных центров НИЦ „Курчатовский институт“.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] W.H. Lewis, G. Tahon, P. Geesink, D.Z. Sousa, T.J.G. Ettema. *Nat. Rev. Microbiol.*, **19** (4), 225 (2021). DOI: 10.1038/s41579-020-00458-8
- [2] J. Clardy, M.A. Fischbach, C.T. Walsh. *Nat. Biotechnol.*, **24** (12), 1541 (2006). DOI: 10.1038/nbt1266
- [3] J.V. Pham, M.A. Yilma, A. Feliz, M.T. Majid, N. Maffetone, J.R. Walker, E. Kim, H.J. Cho, J.M. Reynolds, M.C. Song, et al. *Front. Microbiol.*, **19** (4), 10 (2019). DOI: 10.3389/fmicb.2019.01404
- [4] A. Dance. *Nature*, **582**, 301 (2020). DOI: 10.1038/d41586-020-01684-z
- [5] V.I. Yusupov, M.V. Gorlenko, V.S. Cheptsov, N.V. Minaev, E.S. Churbanova, V.S. Zhigarkov, E.A. Chutko, S.A. Evlashin, B.N. Chichkov, V.N. Bagratashvili. *Laser Phys. Lett.*, **15** (6), 065604 (2018). DOI: 10.1088/1612-202X/aab5ef
- [6] P. Liang, B. Liu, Y. Wang, K. Liu, Y. Zhao, W.E. Huang, B. Li. *Appl. Environ. Microbiol.*, **88** (3), e01165-21 (2022). DOI: 10.1128/aem.01165-21
- [7] Y. Deng, P. Renaud, Z. Guo, Z. Huang, Y. Chen. *J. Biol. Eng.*, **11** (1), 2 (2017). DOI: 10.1186/s13036-016-0045-0
- [8] V.S. Cheptsov, S.I. Tsykina, N.V. Minaev, V.I. Yusupov, B. Chichkov. *Int. J. Bioprinting*, **5** (1), 1 (2018). DOI: 10.18063/ijb.v5i1.165
- [9] Н.В. Минаев, В.И. Юсупов, Б.Н. Чичков. Патент РФ, RU198221U1 (2020).
- [10] J. Feichtmayer, L. Deng, C. Griebler. *Front. Microbiol.*, **8** (2017). DOI: 10.3389/fmicb.2017.02192
- [11] N.R. Schiele, D.T. Corr, Y. Huang, N.A. Raof, Y. Xie, D.B. Chrisey. *Biofabrication*, **2** (3), 032001 (2010). DOI: 10.1088/1758-5082/2/3/032001
- [12] H.Q. Xu, J.C. Liu, Z.Y. Zhang, C.X. Xu. *Mil. Med. Res.*, **9** (1), 1 (2022). DOI: 10.1186/s40779-022-00429-5
- [13] Ž.P. Kačarević, P.M. Rider, S. Alkildani, S. Retnasingh, R. Smeets, O. Jung, Z. Ivanišević, M. Barbeck. *Materials (Basel)*, **11** (11), (2018). DOI: 10.3390/ma11112199
- [14] J. Adhikari, A. Roy, A. Das, M. Ghosh, S. Thomas, A. Sinha, J. Kim, P. Saha. *Macromol. Biosci.*, **21** (1), (2021). DOI: 10.1002/mabi.202000179
- [15] B. Hopp, T. Smausz, N. Barna, C. Vass, Z. Antal, L. Kredics, D. Chrisey. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38** (6), 833 (2005). DOI: 10.1088/0022-3727/38/6/007
- [16] H. Assad, A. Assad, A. Kumar. *Pharmaceutics*, **15** (1), 255 (2023). DOI: 10.3390/pharmaceutics15010255
- [17] Y.N. Slavin, H. Bach. *Nanomaterials*, **12** (24), 4470 (2022). DOI: 10.3390/nano12244470
- [18] R. Gaebel, N. Ma, J. Liu, J. Guan, L. Koch, C. Klopsch, M. Gruene, A. Toelk, W. Wang, P. Mark et al. *Biomaterials*, **32** (35), 9218 (2011). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.071
- [19] E. Pagés, M. Rémy, V. Kériquel, M.M. Correa, B. Guillotin, F. Guillemot. *J. Nanotechnol. Eng. Med.*, **6** (2), 021005 (2015). DOI: 10.1115/1.4031217
- [20] J.H. Niazi, M.B. Gu. *Toxicity of Metallic Nanoparticles in Microorganisms- a Review. In Atmospheric and Biological Environmental Monitoring* (Springer Netherlands, Dordrecht, 2009), pp. 193–206. DOI: 10.1007/978-1-4020-9674-7\_12
- [21] I.A. Mamonova, I.V. Babushkina, I.A. Norkin, E.V. Gladkova, M.D. Matasov, D.M. Puchin'yan. *Nanotechnologies Russ.*, **10** (1–2), 128 (2015). DOI: 10.1134/S1995078015010139
- [22] M.R. Khan, K.M. Fromm, T.F. Rizvi, B. Giese, F. Ahamad, R.J. Turner, M. Füeg, E. Marsili. *Part. Part. Syst. Charact.*, **37** (5), 1 (2020). DOI: 10.1002/ppsc.201900419
- [23] В.С. Жигарьков, Е.В. Ивановская, К.О. Айыбыжы, А.В. Овчаров. *Письма в ЖТФ*, **49** (22), 31 (2023). DOI: 10.61011/PJTF.2023.22.56597.19649
- [24] M. Blazanin. *Gplyr: An R Package for Microbial Growth Curve Data Analysis*. bioRxiv 2023.04.30.538883, (2023). DOI: 10.1101/2023.04.30.538883
- [25] M. Peleg, M.G. Corradini. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **51** (10), 917 (2011). DOI: 10.1080/10408398.2011.570463
- [26] K. Sprouffske, A. Wagner. *BMC Bioinformatics*, **17** (1), 17 (2016). DOI: 10.1186/s12859-016-1016-7

- [27] A. Agha, W. Waheed, I. Stiharu, V. Nerguizian, G. Destgeer, E. Abu-Nada, A. Alazzam. *A Review on Microfluidic-Assisted Nanoparticle Synthesis, and Their Applications Using Multiscale Simulation Methods* (Springer US, 2023), vol. 18. DOI: 10.1186/s11671-023-03792-x
- [28] L. Koch, O. Brandt, A. Deiwick, B. Chichkov. *Int. J. Bioprinting*, **3** (1), 1 (2017). DOI: 10.18063/IJB.2017.01.001
- [29] L. Koch, A. Deiwick, B. Chichkov. *3D Printing and Biofabrication*, **303** (2018).
- [30] S. Catros, J.-C. Fricain, B. Guillotin, B. Pippenger, R. Bareille, M. Remy, E. Lebraud, B. Desbat, J. Amédé, F. Guillemot. *Biofabrication*, **3** (2), 025001 (2011). DOI: 10.1088/1758-5082/3/2/025001
- [31] Y. Zhang, T.P. Shareena Dasari, H. Deng, H. Yu. *J. Environ. Sci. Heal. Part C: Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **33** (3), 286 (2015). DOI: 10.1080/10590501.2015.1055161
- [32] K. Chandran, S. Song, S. Il Yun. *Arab. J. Chem.*, **12** (8), 1994 (2019). DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.11.041
- [33] D. Pissuwan, C.H. Cortie, S.M. Valenzuela, M.B. Cortie. *Trends Biotechnol.*, **28** (4), 207 (2010). DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.12.004
- [34] Y. Roiter, M. Ornatska, A.R. Rammohan, J. Balakrishnan, D.R. Heine, S. Minko. *Nano Lett.*, **8** (3), 941 (2008). DOI: 10.1021/nl080080l
- [35] A. Simon-Deckers, S. Loo, M. Mayne-L’Hermite, N. Herlin-Boime, N. Menguy, C. Reynaud, B. Gouget, M. Carriere. *Environ. Sci. Technol.*, **43** (21), 8423 (2009). DOI: 10.1021/es9016975
- [36] Y.N. Slavin, J. Asnis, U.O. Hfeli, H. Bach. *J. Nanobiotechnology*, **15** (1), 1 (2017). DOI: 10.1186/s12951-017-0308-z
- [37] O.A. Lazar, A.S. Nikolov, C.C. Moise, S. Rosoiu, M. Prodana, M. Enachescu. *Appl. Surf. Sci.*, **609**, 155289 (2023). DOI: 10.1016/j.apsusc.2022.155289
- [38] S. Dittrich, S. Barcikowski, B. Gökce. *Opto-Electronic Adv.* **4** (1), 200072 (2021). DOI: 10.29026/oea.2021.200072
- [39] M.V. Gorlenko, E.A. Chutko, E.S. Churbanova, N.V. Minaev, K.I. Kachesov, L.V. Lysak, S.A. Evlashin, V.S. Cheptsov, A.O. Rybaltoivskiy, V.I. Yusupov, et al. *J. Biol. Eng.*, **12** (1), 27 (2018). DOI: 10.1186/s13036-018-0117-4
- [40] V.S. Cheptsov, E.S. Churbanova, V.I. Yusupov, M.V. Gorlenko, L.V. Lysak, N.V. Minaev, V.N. Bagratashvili, B.N. Chichkov. *Lett. Appl. Microbiol.*, **67** (6), 544 (2018). DOI: 10.1111/lam.13074
- [41] V. Yusupov, S. Churbanov, E. Churbanova, K. Bardakova, A. Antoshin, S. Evlashin, P. Timashev, N. Minaev. *Int. J. Bioprinting*, **6** (3), 1 (2020). DOI: 10.18063/ijb.v6i3.271
- [42] E. Mareev, N. Minaev, V. Zhigarkov, V. Yusupov. *Photonics*, **8** (9), 374 (2021). DOI: 10.3390/photonics8090374
- [43] E.V. Grosfeld, V.S. Zhigarkov, A.I. Alexandrov, N.V. Minaev, V.I. Yusupov. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (17), (2022). DOI: 10.3390/ijms23179823
- [44] V. Zhigarkov, I. Volchkov, V. Yusupov, B. Chichkov. *Nanomaterials*, **11** (10), 2584 (2021). DOI: 10.3390/nano11102584
- [45] T.V. Kochetkova, K.S. Zayulina, V.S. Zhigarkov, N.V. Minaev, B.N. Chichkov, A.A. Novikov, S.V. Toshchakov, A.G. Elcheninov, I.V. Kublanov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70** (2), 1192 (2020). DOI: 10.1099/ijsem.0.003902