

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ОКСИДА ЦИНКА



Р. И. Довнар<sup>1</sup>, С. М. Смотрин<sup>1</sup>, С. С. Ануфрик<sup>2</sup>, Т. Н. Соколова<sup>1</sup>,  
С. Н. Анучин<sup>2</sup>, Н. Н. Иоскевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

*Введение.* Наночастицы металлов могут обладать уникальными свойствами, отличающимися от свойств цельного металла, из которого они получены. Именно это обуславливает повышенный интерес к ним со стороны исследователей всего мира.

*Цель исследования.* Количественная оценка антибактериального действия наночастиц серебра и оксида цинка на полиантибиотикорезистентные штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

*Материал и методы.* Выполнен синтез наночастиц серебра и оксида цинка методом лазерной абляции в жидкости. Изучены физические свойства и размеры данных наночастиц на основе спектральных характеристик и атомно-силовой микроскопии. Произведены изучение антибактериальной резистентности исследуемых микроорганизмов, а также количественная оценка антибактериального действия полученных наночастиц на основании определения минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций.

*Результаты.* Все используемые в исследовании микроорганизмы являлись клиническими патогенными штаммами, обладающими полиантибактериальной резистентностью. При этом минимальные ингибирующие концентрации наночастиц серебра составили от 7,81 до 31,25 мкг/мл, а минимальные бактерицидные – от 31,25 до 62,50 мкг/мл, в то время как для наночастиц оксида цинка значения минимальных ингибирующих концентраций находились в пределах от 125 до 500 мкг/мл, а значения минимальных бактерицидных – от 250 до 1000 мкг/мл.

*Выводы.* Метод лазерной абляции в жидкости позволяет синтезировать химически чистые наночастицы серебра, оксида цинка, а при необходимости и других металлов. Наночастицы серебра и оксида цинка являются эффективными противомикробными агентами по отношению к полиантибиотикорезистентной патогенной микробной флоре. Полученные значения минимальных бактерицидных и минимальных ингибирующих концентраций необходимо учитывать при последующем клиническом внедрении медицинских изделий на основе использования наночастиц металлов.

**Ключевые слова:** металлические наночастицы, серебро, оксид цинка, тесты на чувствительность микробов, антибактериальные агенты, лекарственная устойчивость, противоифекционные агенты.

*Для цитирования:* Антибактериальные и физико-химические свойства наночастиц серебра и оксида цинка / Р. И. Довнар, С. М. Смотрин, С. С. Ануфрик, Т. Н. Соколова, С. Н. Анучин, Н. Н. Иоскевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022. Т. 20, № 1. С. 98-107. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-1-98-107>.

### Введение

Наночастицы металлов – уникальный класс веществ не только из-за их малых размеров, сопоставимых с диаметром вирусов, но и большого соотношения площади поверхности к объему в сравнении с более крупными частицами или цельным веществом. Это обуславливает появление у наночастиц необычных свойств: механических, биологических, каталитической активности, тепло- и электропроводности, оптического поглощения, иной пространственной структуры молекулы и ряду других [1, 2]. Уникальные свойства наночастиц металлов объясняют факт все большего применения данных веществ в разных областях жизнедеятельности человека, в том числе в биологии, электронике, фотонике, солнечной энергетике и медицине [3, 4].

Среди большого разнообразия наночастиц металлов наночастицы оксида цинка (ZnO) обладают такими важными свойствами, как сильная химическая и физическая стабильность, высокая каталитическая активность, а также интенсивная адсорбция ультрафиолетового и инфракрасного излучения [5]. Были выявлены также уникальные оптические, пьезоэлектрические и магнит-

ные свойства наночастиц данного металла [6]. Имеются публикации, свидетельствующие о селективной токсичности наночастиц оксида цинка по отношению к раковым клеткам [7]. Например, обнаружена противоопухолевая активность наноразмерных частиц ZnO по отношению к клеткам опухоли головного мозга человека линии U87 и клеткам рака шейки матки линии HeLa [8]. Полученные результаты делают применение данных наночастиц многообещающим. В настоящее время эти наночастицы используются при создании новых косметических средств, в электронике, оптике, радиоэлектронной связи, охране окружающей среды, фармакологии, биологии и медицине [9, 10]. К примеру, в медико-биологических областях наночастицы оксида цинка все шире используются в биологических испытаниях, биологической маркировке и доставке лекарств.

Наночастицы серебра привлекли внимание исследователей для использования при биомаркировке, создании интегральных схем, сенсоров, фильтров, клеточных электродов и антимикробных веществ [11, 12].

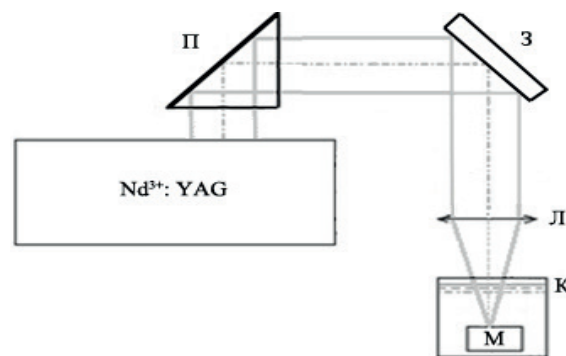
Для синтеза наноразмерных частиц металлов предложены разные химические и физические методы. Так, наночастицы оксида цинка могут быть получены золь-гель методом, парофазным каталитическим окислением, микромульсионным синтезом, металло-паровым методом, сонохимическим восстановлением, методом преципитации и некоторыми другими. Однако в большинстве традиционно применяемых физико-химических способах получения наночастиц используются органические растворители, токсические восстановители и другие вещества, являющиеся потенциально опасными для окружающей среды [13, 14]. Так, синтез наночастиц серебра путем химического восстановления, например, с использованием гидразин-гидрата, борогидрида натрия, диметилформамида и этиленгликоля, может привести к абсорбции этих чрезвычайно токсических веществ на поверхности наночастиц. В дальнейшем это будет негативно сказываться не только на биологическом объекте при непосредственном контакте с полученными таким образом наночастицами, но и на окружающей среде в целом при производстве в промышленных масштабах. Именно поэтому чрезвычайно актуальное направление – разработка и широкое внедрение «экологически безопасных» методов синтеза наночастиц.

Один из современных и эффективных способов синтеза наночастиц металлов, в частности серебра и оксида цинка, – метод лазерной абляции [15]. В более ранних работах продемонстрировано, что с помощью данного метода могут быть получены наночастицы серебра, золота и ряда переходных металлов, при этом наночастицы в зависимости от используемых параметров могут быть синтезированы разных форм, размеров, пространственной структуры и степени агрегации [16]. Ключевой сущностью механизма лазерной абляции металлов является взаимодействие плотных паров жидкости с расплавленным слоем металла на поверхности мишени. При данном методе свойства генерируемых наночастиц металлов зависят от временных и энергетических параметров лазерного излучения и используемой среды синтеза: атмосфера, жидкость либо вакуум. Оптические свойства наночастиц зависят от размеров последних и изменяются при их агрегации. Это связано с тем, что при агрегации наночастиц поверхностные электроны отдельной наночастицы захватываются другими наночастицами и мигрируют по поверхности образующегося кластера. При этом энергия поверхностного плазмонного резонанса снижается, вызывая батохромное смещение полосы поглощения наночастиц. В связи с тем, что данный метод не сопровождается использованием токсических для человека веществ, он относится к экологически безопасным, а значит и перспективным при дальнейшем применении.

**Цель** данного исследования – количественная оценка антибактериального действия наночастиц серебра и оксида цинка на полиантибиотикорезистентные штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

### Материал и методы

Используемые в исследовании наночастицы серебра и оксида цинка были получены на кафедре теоретической физики и теплотехники УО Гродненский государственный университет им. Я. Купалы методом лазерной абляции в жидкости по отработанной методике на установке, схема которой изображена на рисунке 1.



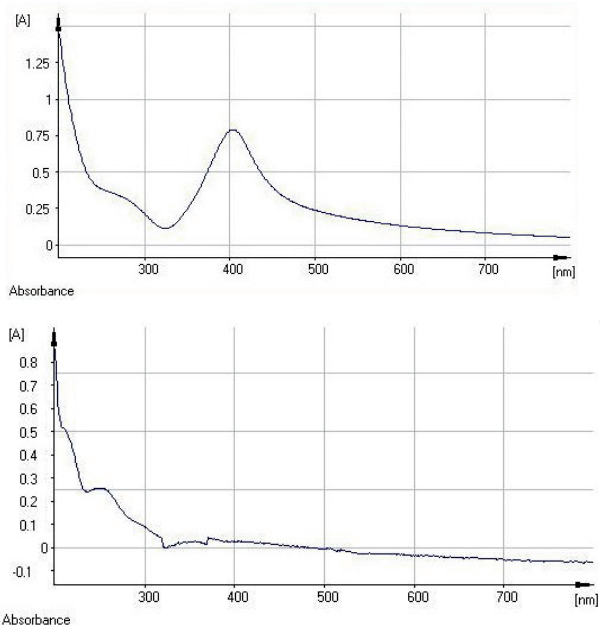
ЛАЗЕР – Nd<sup>3+</sup>:YAG лазер Lotis LS-2147; П – поворотная призма; З – ИК зеркало; Л – фокусирующая линза ( $f=614$  мм); К – кварцевая кювета с жидкостью; М – облучаемая мишень

**Рисунок 1.** – Схема экспериментальной установки, используемой для получения наночастиц  
**Figure 1.** – Schematic of the experimental plant used to obtain nanoparticles

Согласно рисунку 1, излучение твердотельного лазера LS-2147 на основе алюмо-иттриевого граната, легированного ионами неодима (Nd<sup>3+</sup>), направляется на поворотную призму и далее, отражаясь от зеркала (коэффициент отражения  $R \approx 100\%$ ), фокусируется длиннофокусной линзой в кварцевую кювету с дистиллированной водой, в которой находится серебряная либо цинковая мишень. В качестве серебряной мишени использовался мерный слиток серебра высшей пробы (999,9) Национального банка Республики Беларусь. Цинковой мишенью стал стержень из чистого (99,9%) металлического цинка. Степень чистоты проверялась на рентгенофлуоресцентном анализаторе ElvaX. Учитывая то, что поверхность цинка, в том числе его наночастиц, на воздухе быстро покрывается тонким слоем оксида цинка, в приводимом исследовании синтезированные наночастицы рассматриваются именно как наночастицы оксида цинка.

Параметры лазерного излучения: энергия генерации в импульсе составляла 100 мДж, длительность лазерного импульса по полувысоте  $\tau=18$  нс, длина волны излучения  $\lambda=1064$  нм. Диаметр сфокусированного лазерного пучка был равен 3,0 мм. Плотность мощности в лазерном пятне при указанной энергии генерации составила: для серебра  $4,2 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup> и  $1,76 \times 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup> – для цинка. Лазерная абляция мишени в жидкости (дистиллированная вода) проводилась при частоте следования импульсов 10 Гц в течение 15-20 минут.

Исследование параметров наночастиц металлов осуществлялось спектральными методами на спектрофотометре Specord 200 и на атомно-силовом микроскопе (АСМ) NT-206. Спектры поглощения коллоидных растворов наночастиц серебра и оксида цинка приведены на рисунке 2.



**Рисунок 2.** – Спектры поглощения коллоидных растворов наночастиц серебра (а) и оксида цинка (б) в воде  
**Figure 2.** – Absorption spectra of colloidal solutions of silver (a) and zinc oxide (b) nanoparticles in water

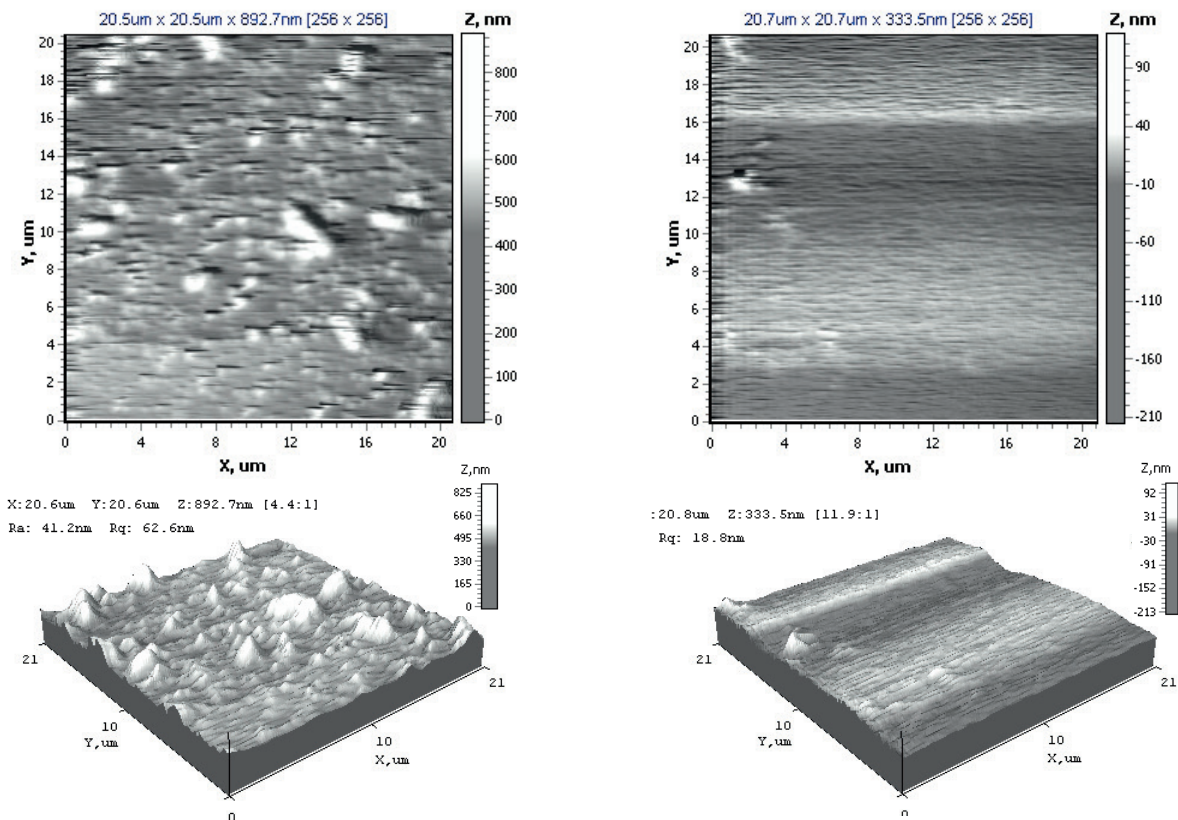
Как видно из рисунков, для коллоидного раствора наночастиц серебра наблюдается отчетливый максимум на длине волны 410 нм, оптическая плотность раствора составила 0,8D, что соответствует концентрации  $\sim 0,8 \times 10^4$  моль/дм<sup>3</sup>.

Спектр поглощения наночастиц цинка содержит два максимума: основной, в области  $\lambda=250-300$  нм, и пологий, в диапазоне 320-450 нм. Концентрация наночастиц по основному максимуму составляет  $\sim 0,3D$ , что соответствует  $0,3 \times 10^4$  моль/дм<sup>3</sup>.

Размерные параметры исследовались путем осаждения коллоидных растворов наночастиц на диэлектрические покрытия с последующим выпариванием. Полученные снимки АСМ серебра и оксида цинка приведены на рисунке 3.

Анализ приведенных на рисунке 3 АСМ изображений показывает, что наночастицы серебра на поверхности образуют неравномерное покрытие, состоящее из средних (40-60 нм) и более крупных (порядка 100-400 нм), образующих агрегации, частиц серебра, преимущественно конусообразной формы (рис. 3а). При этом количество частиц с размерностью до 60 нм значительно превышает ( $\sim 70\%$ ) количество больших по размеру.

На рисунке 3б приведены снимки АСМ микроморфологии поверхности с наночастицами оксида цинка. Для них характерна близкая к призматической форма частиц. Из снимка можно выделить две размерные группы наночастиц: основная масса ( $\sim 98\%$ ) с размерностью



**Рисунок 3.** – АСМ изображения наночастиц серебра (а) и оксида цинка (б) (вверху – прямая проекция, внизу – изометрическая проекция)

**Figure 3.** – AFM images of (a) silver and (b) zinc oxide nanoparticles (top - direct projection, bottom - isometric projection)

15-18 нм и менее, и крупные агрегации –  $\sim 1,5 \times 2$  мкм. По сравнению с серебром, на снимке наблюдается большее общее количество адсорбированных наночастиц одинакового размера, что может быть связано с физико-химическими особенностями цинка и оптимальными условиями получения. Частицы расположены равномерным слоем. Наличие разноразмерных наночастиц в растворе приводит к уширению полосы поглощения наночастиц окиси цинка с появлением второго максимума, что и наблюдается на рисунке 3б.

В связи с тем, что стандартные штаммы микроорганизмов, как правило, не обладают выраженной полирезистентностью, кроме того, географически выделены далеко от Республики Беларусь, а у музейных штаммов микробов при многократных пересевах происходит процесс диссоциации культуры, выражающийся в возможной потере имеющихся факторов патогенности и антибиотикорезистентности, в данном исследовании было принято решение использовать актуальные патогенные полирезистентные штаммы бактерий. Последние были высеяны из гнойных ран хирургических пациентов УЗ «Гродненская университетская клиника». Идентификация, типирование и определение антибактериальной чувствительности микроорганизмов производились на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы «BioMérieux».

В данной работе использованы клинические патогенные штаммы грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*) и грамотрицательных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*). В сериях экспериментов использовали суточные культуры микробов.

Антибактериальные свойства наночастиц серебра и оксида цинка по отношению к изучаемым микроорганизмам оценивались методом серийных разведений в жидкой питательной среде количественно, путем определения минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций. Данный метод осуществлялся в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах с крышкой. Первоначально осуществлялось приготовление основного раствора, содержащего максимальную концентрацию наночастиц серебра 1 мг/мл или оксида цинка 2 мг/мл. В первые опытные лунки планшетов (объемом 250 мкл каждая) помещали 100 мкл золя наночастиц серебра (группа «опыт-1») или оксида цинка (группа «опыт-2»), 5 мкл взвеси микроорганизмов в концентрации  $7,5 \times 10^6$  КОЕ/мл и питательный бульон объемом 95 мкл. Таким образом, в данной лунке планшета создавалась концентрация наночастиц металла, равная 1:2 от первоначальной. В последующих опытных лунках формировались двукратные убывающие разведения наночастиц изучаемых металлов – 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256. В качестве питательной среды применялся мясopептонный бульон Мюллера-Хинтона. На

лабораторном денситометре Biosan McFarland DEN-1 по стандарту мутности производился контроль концентрации микроорганизмов. В данной работе была использована методика положительного и отрицательного контроля. Положительный контроль был представлен контрольной группой, в которой лунки были заполнены мясopептонным бульоном и взвесью микроорганизмов. В данных лунках всегда происходил рост бактерий (контроль-1). Отрицательный контроль состоял из лунок, заполненных только стерильным мясopептонным бульоном, соответственно, роста микроорганизмов в нем не происходило (контроль-2). После заполнения всех лунок на фотометре определялась оптическая плотность опытной и контрольных групп, после чего осуществлялась суточная инкубация в термостате ТС 1/80 СПУ при 37,0°C. После инкубации производилось повторное определение оптической плотности опытной и контрольных лунок. Отсутствие роста микробов подтверждалось идентичными данными фотометра, в то время как фиксируемая прибором мутность была обусловлена бактериальным ростом. Описанный выше спектрофотометрический метод измерения оптической плотности выполняли на фотометре универсальном Ф300, позволяющем работать с 96-луночными плоскодонными планшетами с обработкой результатов встроенным микроконтроллером. При этом минимальная ингибирующая концентрация соответствовала концентрации препарата в последней лунке с видимой задержкой роста, имеющей после инкубации прозрачную питательную среду. Для получения достоверных результатов опыты проводили в пятикратной повторности с каждой концентрацией наночастиц металлов и исследуемой культурой микроорганизмов.

После вышеописанного суточного культивирования в термостате для определения минимальной бактерицидной концентрации из опытных лунок планшетов с задержкой роста производился посев на чашки Петри с питательной средой. С этой целью с помощью дозатора и стерильных наконечников отбиралось по 10 мкл суспензии, которая переносилась на чашки Петри, где капля растиралась по поверхности стерильным шпателем. После этого выполнялось повторное инкубирование в термостате при 37,0°C в течение 24 часов с последующим подсчетом выросших колоний. Минимальная бактерицидная концентрация наночастиц серебра или оксида цинка соответствовала лунке планшета, посев из которой не давал роста микрофлоры.

Статистическая обработка результатов осуществлялась традиционными методами с помощью лицензионных пакетов прикладных программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США).

### **Результаты и обсуждение**

Антибактериальная чувствительность изучаемых микробов была выражена в процентном

соотношении количества антибиотиков, к которым чувствителен каждый штамм, к общему количеству исследованных антибиотиков в антибиотикограмме. Так, антибиотикочувствительность *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* составила 87,5%, *Staphylococcus haemolyticus* – 62,5%, *Pseudomonas aeruginosa* – 53,3%, *Proteus mirabilis* – 18,7% и *Klebsiella pneumoniae* – 6,7%. Следовательно, у изученных микроорганизмов имеется множественная антибактериальная резистентность. Несмотря на высокий процент антибиотикочувствительности обоих штаммов стафилококка, они были устойчивы к метициллину, то есть представляли серьезную проблему в лечении вызванных ими заболеваний, так как были резистентными ко всем бета-лактамам антибиотикам, включая пенициллины и цефалоспорины. *Staphylococcus haemolyticus* одновременно был и ванкомицин-устойчивым, что соответствует современным тенденциям развития антибиотикорезистентности у стафилококков. Из группы грамотрицательных микроорганизмов наибольшей антибиотикочувствительностью обладали *Escherichia coli* и *Pseudomonas*

*aeruginosa*. Несмотря на это, все изученные грамотрицательные микробы были устойчивы к ампициллину, а синегнойная палочка одновременно и к меропенему. Таким образом, использованные в исследовании клинические патогенные штаммы были полиантибиотикоустойчивыми. При этом антибиотикорезистентность выражена сильнее у грамотрицательных бактерий.

В таблице 1 представлены данные, полученные при изучении влияния разных концентраций наночастиц серебра и оксида цинка на патогенные штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

В соответствии с таблицей 1 фиксируемое фотометром универсальным помутнение бульона свидетельствует о наличии роста микроорганизма в питательной среде, что говорит о том, что данная концентрация наночастиц металла недостаточна для подавления жизнедеятельности микроорганизма. С увеличением концентрации наночастиц серебра или оксида цинка рост микроорганизмов ухудшается. Рост грамположительных микроорганизмов отсутствовал при минимальном разведении наночастиц серебра 1:128, и для наночастиц оксида цинка – 1:16. Для грамотрицательных микроорганизмов требовалось меньшее разведение: для наночастиц серебра – от 1:32 до 1:64 и от 1:4 до 1:8 – для наночастиц оксида цинка.

Минимальная бактерицидная концентрация соответствует наименьшей концентрации наночастиц, которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9% микроорганизмов от исходного уровня в течение определенного периода времени. Исходя из определения, минимальная бактерицидная концентрация не может быть меньше минимальной ингибирующей. Иными словами, минимальная ингибирующая концентрация – наименьшая концентрация препарата, который тормозит рост тестовой культуры, вызывая бактериостатическое действие, и минимальная бактерицидная концентрация – наименьшая концентрация препарата, который вызывает бактерицидный эффект.

Результаты изучения минимальной бактерицидной концентрации для разных концентраций наночастиц серебра и оксида цинка представлены в таблице 2.

Данные, отраженные в таблице 2, демонстрируют, что у изучаемых микробов наименьшее разведение наноча-

**Таблица 1.** – Результаты роста микроорганизмов после 24-часовой инкубации в термостате при 37,0°C в разных группах в 96-луночных планшетах

**Table 1.** – The results of the growth of microorganisms after 24-hour incubation in a thermostat at 37.0°C in different groups in 96-well plates

Штамм микроорганизма	Группа	Пропорции разведения золя							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Staphylococcus aureus</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	н	н	р
	опыт-2	н	н	н	н	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	н	н	р
	опыт-2	н	н	н	н	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	н	р	р
	опыт-2	н	н	р	р	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	р	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Escherichia coli</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	р	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Proteus mirabilis</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	н	р	р
	опыт-2	н	н	р	р	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н

Примечания – 1 н – в лунке отсутствует рост микроорганизмов; 2 р – в лунке имеется рост микроорганизмов

стиц для проявления бактерицидного эффекта требуется для грамотрицательных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*), в то время как у грамположительных стафилококков (*Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus*) рост отсутствует при большем разведении. Отмеченная тенденция характерна как для наночастиц серебра, так и для наночастиц оксида цинка.

Выполненная математическая обработка представленных в таблицах 1 и 2 данных позволила вычислить минимальную ингибирующую и минимальную бактерицидную концентрации. Полученные результаты отражены в таблице 3.

Данные таблицы 3 показывают, что минимальная ингибирующая и минимальная бактерицидная концентрации наночастиц серебра и оксида цинка различаются в зависимости от используемого штамма микроорганизма. При

**Таблица 2.** – Результаты посевов на чашки Петри из лунок опытной группы после 24-часовой инкубации в термостате при 37,0°C  
**Table 2.** – The results of inoculation on Petri dishes from the wells of the experimental group after 24-hour incubation in a thermostat at 37.0°C

Штамм микроорганизма	Группа	Пропорции разведения золя							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Staphylococcus aureus</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	-
	опыт-2	н	н	н	р	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	-
	опыт-2	н	н	н	р	--	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	опыт-1	н	н	н	н	р	р	-	-
	опыт-2	н	р	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	опыт-1	н	н	н	н	р	-	-	-
	опыт-2	н	н	р	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	опыт-1	н	н	н	н	р	-	-	-
	опыт-2	н	н	р	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	опыт-1	н	н	н	н	р	р	-	-
	опыт-2	н	р	-	-	-	-	-	-

Примечания – 1 н – на чашке отсутствует рост микроорганизмов; 2 р – на чашке имеется рост микроорганизмов

**Таблица 3.** – Показатели противомикробной активности наночастиц серебра и оксида цинка по отношению к разным штаммам микроорганизмов

**Table 3.** – Indicators of antimicrobial activity of silver and zinc oxide nanoparticles in relation to various strains of microorganisms

Штамм микроорганизма	Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц металлов, мкг/мл		Минимальная бактерицидная концентрация наночастиц металлов, мкг/мл	
	серебра	оксида цинка	серебра	оксида цинка
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,81	125	31,25	250
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7,81	125	31,25	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,63	500	62,50	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31,25	250	62,50	500
<i>Escherichia coli</i>	31,25	250	62,50	500
<i>Proteus mirabilis</i>	15,63	500	62,50	1000

этом для грамположительных микроорганизмов необходимы меньшие концентрации в сравнении с грамотрицательными. Среднее значение минимальной ингибирующей концентрации для исследуемых штаммов составило: для наночастиц серебра – 18,23 мкг/мл, а для наночастиц оксида цинка – 291,67 мкг/мл. Среднее же значение минимальной бактерицидной концентрации – 52,08 мкг/мл для наночастиц серебра и 583,33 мкг/мл – для наночастиц цинка.

Механизм антибактериального действия наночастиц серебра и наночастиц цинка до настоящего времени окончательно не установлен. Считается, что для наночастиц серебра он сложен и реализуется несколькими путями: высвобождение катионов  $Ag^+$ , которые сами взаимодействуют с серосодержащими белками внутри или вне клеточной мембраны, уничтожая бактериальную клетку либо замещая другие необходимые металлические ионы, такие как  $Ca^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ ; непосредственное механическое воздействие наночастиц на клеточную стенку, продукция активных форм кислорода или электростатическое взаимодействие между отрицательно заряженными бактериальными клетками и положительно заряженными наночастицами [17, 18].

Среди существующих теорий воздействия на клеточную стенку наночастиц оксида цинка выделяют следующие: (1) образование активных форм кислорода [19], (2) потеря целостности клеточной стенки после контакта между ней и наночастицей оксида цинка [20], (3) воздействие высвобождаемых из наночастиц ионов  $Zn^{2+}$ , обладающих антибактериальным действием [21], (4) интернализация наночастиц оксида цинка [20]. Наиболее часто в литературе описан механизм образования активных форм кислорода, таких как супероксидные анионы ( $O_2^-$ ), гидроксильные радикалы ( $HO_2^-$ ) и перекись водорода ( $H_2O_2$ ), которые разрушают белки, липиды и ДНК микробных клеток [22, 23]. При этом стенка бактериальной клетки имеет отрицательный заряд, такой же, как у гидроксильных радикалов ( $HO_2^-$ ) и супероксидных анионов ( $O_2^-$ ). Именно поэтому данные соединения не могут проникнуть через мембрану, а только повреждают ее снаружи, в то время как перекись водорода может проходить через клеточную стенку и, воздействуя на внутренние структуры бак-

териальной клетки, вызывает гибель последней. В подтверждение этих слов исследователями было замечено, что бактерии, обладающие большей чувствительностью к перекиси водорода, более чувствительны и к наночастицам оксида цинка [24].

Традиционно используемые противомикробные препараты имеют, как правило, один механизм действия на бактериальную клетку: так, бета-лактамы и гликопептиды ингибируют синтез клеточной стенки, хинолоны и кумарины – продукцию ДНК, рифамицины – синтез РНК, аминогликозиды, макролиды и хлорамфеникол ингибируют построение белков, сульфаниламиды и триметропин угнетают ферменты клетки [25]. Учитывая один механизм действия конкретного антибиотика, для приобретения устойчивости к нему бактерии достаточно приобрести соответствующую единичную мутацию. Механизм действия наночастиц серебра и оксида цинка до конца не раскрыт, но реализуется иными путями, нередко при этом действуя одновременно на несколько ключевых звеньев жизнедеятельности микроба. К примеру, преодоление механизмов микробной устойчивости может идти через разрушение клеточных мембран, препятствование образованию биопленок или остановку роста микробов с использованием нескольких механизмов действия одновременно. Исходя из этой проблемы, оправдано использование наноматериалов в качестве антимикробных агентов, особенно в тех областях, где антибиотики оказываются неэффективными. В этом смысле применение наночастиц серебра или оксида цинка может быть альтернативой для минимизации микробной устойчивости и снижения токсичности для клеток человека.

В сравнении с противомикробными органическими веществами, в том числе антибиотиками, наночастицы серебра и оксида цинка

имеют более низкую токсичность, более высокую устойчивость, долговечность и хорошую селективность.

### Выводы

1. Методом лазерной абляции в жидкости получены наночастицы серебра и оксида цинка. Изучены спектральные характеристики их коллоидных растворов и определены размерные параметры. Типичный размер наночастиц серебра составляет ~40-60 нм, цинка ~15-18 нм.

2. Наночастицы серебра и оксида цинка – эффективные противомикробные агенты по отношению к полиантибиотикорезистентной патогенной микробной флоре.

3. Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц серебра составляют от 7,81 до 31,25 мкг/мл, минимальные бактерицидные – от 31,25 до 62,50 мкг/мл, в то время как для наночастиц цинка значения минимальных ингибирующих концентраций находятся в пределах от 125 до 500 мкг/мл, а значения минимальных бактерицидных – от 250 до 1000 мкг/мл.

4. Меньшие значения антибактериальных концентраций наночастиц серебра (в сравнении с наночастицами оксида цинка) показывают меньший расход металла при массовом производстве и большую эффективность низких доз. Однако значительно большая стоимость серебра по сравнению с цинком демонстрирует перспективность внедрения наночастиц обоих металлов.

5. Метод лазерной абляции позволяет синтезировать химически чистые наночастицы серебра, оксида цинка, а при необходимости и других металлов.

6. Установленные минимальная ингибирующая и минимальная бактерицидная концентрации наночастиц серебра и оксида цинка могут быть использованы при создании новых противомикробных средств и изделий следующего поколения.

### Литература

- Daniel, M. C. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology / M. C. Daniel, D. Astruc // *Chem. Rev.* – 2004. – Vol. 104, iss. 1. – P. 293-346. – doi: 10.1021/cr030698+.
- Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy / V. P. Zharov [et al.] // *Nanomedicine.* – 2005. – Vol. 1, iss. 4. – P. 326-345. – doi: 10.1016/j.nano.2005.10.006.
- Tuning the combined magnetic and antibacterial properties of ZnO nanopowders through Mn doping for biomedical applications / K. Ravichandran [et al.] // *J. Magn. Mater.* – 2014. – Vol. 358-359. – P. 50-55. – doi: 10.1016/j.jmmm.2014.01.008.
- Brief modeling equation for metal-oxide; TGS type gas sensors / A. J. Moshayedi [et al.] // *Filomat.* – 2020. – Vol. 34, iss. 15. – P. 4997-5008. – doi: 10.2298/FIL2015997M.
- Synthesis and characterization of ZnO – polymer nanocomposites / A. Matei [et al.] // *Int. J. Mater. Form.* – 2008. – Vol. 1. – P. 767-770. – doi: 10.1007/s12289-008-0288-5.
- Marcus, C. N. ZnO tetrapod nanocrystals / C. N. Marcus, A. W. Paul // *J. Mater. Today.* – 2007. – Vol 10, iss. 5. – P. 50-54. – doi: 10.1016/S1369-7021(07)70079-2.
- Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells / S. Nair [et al.] // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2009. – Vol. 20, suppl. 1. – P. S235-S241. – doi: 10.1007/s10856-008-3548-5.
- Fabrication and growth mechanism of ZnO nanostructures and their cytotoxic effect on human brain tumor U87, cervical cancer HeLa, and normal HEK cells / R. Wahab [et al.] // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2011. – Vol. 16, iss. 3. – P. 431-442. – doi: 10.1007/s00775-010-0740-0.
- Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications / J. W. Rasmussen [et al.] // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2010. – Vol. 7, iss. 9. – P. 1063-1077. – doi: 10.1517/17425247.2010.502560.
- Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation / S. E. Cross [et al.] // *Skin Pharmacol. Physiol.* – 2007. – Vol. 20, iss. 3. – P. 148-154. – doi: 10.1159/000098701.
- Cao, G. Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications / G. Cao, Y. Wang. – 2nd ed.

## References

- London : Imperial College Press, 2011. – 596 p. – doi: 10.1142/7885.
- Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens / C. Krishnaraj [et al.] // *Colloids Surf. B.* – 2010. – Vol. 76, iss. 1. – P. 50-56. – doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.008.
  - Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*) / Y. Abboud [et al.] // *Applied nanoscience.* – 2014. – Vol. 4. – P. 571-576. – doi: 10.1007/s13204-013-0233-x.
  - Xia, B. Preparation of bimetallic nanoparticles using a facile green synthesis method and their application / B. Xia, F. He, L. Li // *Langmuir.* – 2013. – Vol. 29, iss. 15. – P. 4901-4907. – doi: 10.1021/la400355u.
  - Иванов, А. М. Получение наночастиц при лазерной абляции металлических поверхностей в жидкости и исследование полученных структур оптическими методами / А. М. Иванов, Н. А. Мыслицкая, М. С. Капелевич // *Изв. КГТУ.* – 2011. – № 23. – С. 18-24.
  - Исследование морфологических особенностей наночастиц серебра в приповерхностных слоях стекла при их синтезе методом термообработки в парах воды / В. И. Егоров [и др.] // *Оптический журнал.* – 2013. – Т. 80, № 3. – С. 61-67.
  - Barngrover, B. M. Incremental binding energies of gold(I) and silver(I) thiolate clusters / B. M. Barngrover, C. M. Aikens // *J. Phys. Chem. A.* – 2011. – Vol. 115, iss. 42. – P. 11818-11823. – doi: 10.1021/jp2061893.
  - Chernousova, S. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal / S. Chernousova, M. Epple // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2013. – Vol. 52, iss. 6. – P. 1636-1653. – doi: 10.1002/anie.201205923.
  - Raghupathi, K. R. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles / K. R. Raghupathi, R. T. Koodali, A. C. Manna // *Langmuir.* – 2011. – Vol. 27, iss. 7. – P. 4020-4028. – doi: 10.1021/la104825u.
  - Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium / R. Brayner [et al.] // *Nano Lett.* – 2006. – Vol. 6, iss. 4. – P. 866-870. – doi: 10.1021/nl052326h.
  - Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: interactions with common formulation ingredients / J. Pasquet [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2015. – Vol. 479, iss. 1. – P. 88-95. – doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.031.
  - ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility / G. Applerot [et al.] // *RSC Adv.* – 2012. – Vol. 2, iss. 6. – P. 2314-2321. – doi: 10.1039/c2ra00602b.
  - Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry / J. Sawai [et al.] // *J. Ferment. Bioeng.* – 1998. – Vol. 86, iss. 5. – P. 521-522. – doi: 10.1016/S0922-338X(98)80165-7.
  - Efficient coverage of ZnO nanoparticles on cotton fibres for antibacterial finishing using a rapid and low cost in situ synthesis / R. Borda d'Água [et al.] // *New J. Chem.* – 2018. – Vol. 42, iss. 2. – P. 1052-1060. – doi: 10.1039/C7NJ03418K.
  - Hooper, D. C. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones / D. C. Hooper // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 32, suppl. 1. – P. S9-S15. – doi: 10.1086/319370.
  - Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004;104(1):293-346. doi: 10.1021/cr030698+.
  - Zharov VP, Kim JW, Curiel DT, Everts M. Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy. *Nanomedicine.* 2005;1(4):326-45. doi: 10.1016/j.nano.2005.10.006.
  - Ravichandran K, Karthika K, Sakthivel B, Begum NJ, Snega S, Swaminathan K, Senthamilselvi V. Tuning the combined magnetic and antibacterial properties of ZnO nanopowders through Mn doping for biomedical applications. *J Magn Magn Mater.* 2014;358-359:50-55. doi: 10.1016/j.jmmm.2014.01.008.
  - Moshayedi AJ, Kazemi E, Tabatabaei M, Liao L. Brief modeling equation for metal-oxide; TGS type gas sensors. *Filomat.* 2020;34(15):4997-5008. doi: 10.2298/FIL2015997M.
  - Matei A, Cernica I, Cadar O, Roman C, Schiopu V. Synthesis and characterization of ZnO – polymer nanocomposites. *Int J Mater Form.* 2008;1:767-770. doi: 10.1007/s12289-008-0288-5.
  - Marcus CN, Paul AW. ZnO tetrapod nanocrystals. *J Mater Today.* 2007;10(5):50-54. doi: 10.1016/S1369-7021(07)70079-2.
  - Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K, Raina S. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(Suppl 1):S235-41. doi: 10.1007/s10856-008-3548-5.
  - Wahab R, Kaushik NK, Verma AK, Mishra A, Hwang IH, Yang YB, Shin HS, Kim YS. Fabrication and growth mechanism of ZnO nanostructures and their cytotoxic effect on human brain tumor U87, cervical cancer HeLa, and normal HEK cells. *J Biol Inorg Chem.* 2011;16(3):431-442. doi: 10.1007/s00775-010-0740-0.
  - Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(9):1063-1077. doi: 10.1517/17425247.2010.502560.
  - Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007;20(3):148-154. doi: 10.1159/000098701.
  - Cao G, Wang Y. Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. London: Imperial College Press; 2011. 596 p.
  - Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf B.* 2010;76(1):50-56. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.008.
  - Abboud Y, Saffaj T, Chagraoui A, Bouari AE, Brouzi K, Tanane O, Ihssane B. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*). *Applied nanoscience.* 2014;4:571-576. doi: 10.1007/s13204-013-0233-x.
  - Xia B, He F, Li L. Preparation of bimetallic nanoparticles using a facile green synthesis method and their applica-



- tion. *Langmuir*. 2013;29(15):4901-4907. doi: 10.1021/la400355u.
15. Ivanov AM, Myslickaja NA, Kapelevich MS. Poluchenie nanochastic pri lazernoj ablacii metallicheskih poverhnostej v zhidkosti i issledovanie poluchennyh struktur opticheskimi metodami [Obtaining nanoparticles during laser ablation of metal surfaces in a liquid and studying the resulting structures by optical methods]. *Izvestija KGTU [KSTU News]*. 2011;23:18-24. (Russian).
  16. Egorov VI, Nashhekin AV, Obrazcov PA, Sidorov AI, Brunkov PN. Issledovanie morfologicheskikh osobennostej nanochastic serebra v pripoverhnostnyh slojah stekla pri ih sinteze metodom termoobrabotki v parah vody [Investigation of the morphological features of silver nanoparticles in near-surface layers of glass during their synthesis by the method of heat treatment in water vapor]. *Opticheskii zhurnal [Journal of Optical Technology]*. 2013;80(3):61-67. (Russian).
  17. Barngrover BM, Aikens CM. Incremental binding energies of gold(I) and silver(I) thiolate clusters. *J Phys Chem A*. 2011;115(42):11818-11823. doi: 10.1021/jp2061893.
  18. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed*. 2013;52(6):1636-1653. doi: 10.1002/anie.201205923.
  19. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2011;27(7):4020-4028. doi: 10.1021/la104825u.
  20. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett*. 2006;6(4):866-870. doi: 10.1021/nl052326h.
  21. Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, Bouvier D, Bolzinger MA. Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: interactions with common formulation ingredients. *Int J Pharm*. 2015;479(1):88-95. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.031.
  22. Applerot G, Lellouche J, Perkas N, Nitzan Y, Gedanken A, Banin E. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. *RSC Adv*. 2012;2(6):2314-2321. doi: 10.1039/c2ra00602b.
  23. Sawai J, Shoji S, Igarashi H, Hashimoto A, Kokugan T, Shimizu M, Kojima H. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *J Ferment Bioeng*. 1998;86(5):521-522. doi: 10.1016/S0922-338X(98)80165-7.
  24. Borda d'Água R, Branquinho R, Duarte MP, Mauricio E, Fernando AL, Martins R, Fortunato E. Efficient coverage of ZnO nanoparticles on cotton fibres for antibacterial finishing using a rapid and low cost in situ synthesis. *New J Chem*. 2018;42(2):1052-1060. doi: 10.1039/C7NJ03418K.
  25. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001;32(1):S9-S15. doi: 10.1086/319370.

## ANTIBACTERIAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SILVER AND ZINC OXIDE NANOPARTICLES

**R. I. Dovnar<sup>1</sup>, S. M. Smotryn<sup>1</sup>, S. S. Anufrik<sup>2</sup>, T. M. Sakalova<sup>1</sup>, S. N. Anuchin<sup>2</sup>, N. N. Iaskevich<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Belarus,

<sup>2</sup>Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

*Background.* Metal nanoparticles can have unique properties that differ from those of the solid metal from which they are obtained. This is what determines the increased interest in them on the part of researchers from all over the world.

*Objective of the study:* quantitative assessment of the antibacterial effect of silver and zinc oxide nanoparticles on polyantibiotic-resistant strains of gram-positive and gram-negative microorganisms.

*Material and methods.* The synthesis of silver and zinc oxide nanoparticles was performed by laser ablation in a liquid. The physical properties and sizes of these nanoparticles were studied on the basis of spectral characteristics and atomic force microscopy. The study of the antibacterial resistance of the studied microorganisms was carried out, as well as a quantitative assessment of the antibacterial effect of the obtained nanoparticles based on the determination of the minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations.

*Results.* All microorganisms used in the study were clinical pathogenic strains with polyantibacterial resistance. In this case, the minimum inhibitory concentrations of silver nanoparticles ranged from 7.81 to 31.25 µg/ml, and the minimum bactericidal concentrations - from 31.25 to 62.50 µg/ml, while for zinc oxide nanoparticles the values of the minimum inhibitory concentrations were within the range from 125 to 500 µg/ml, and the values of the minimum bactericidal - from 250 to 1000 µg/ml.

*Conclusions.* The laser ablation method allows the synthesis of chemically pure nanoparticles of silver, zinc oxide, and, if necessary, other metals. Silver and zinc oxide nanoparticles are effective antimicrobial agents against polyantibiotic-resistant pathogenic microbial flora. The obtained values of the minimum bactericidal and minimum inhibitory concentrations must be taken into account in the subsequent clinical implementation of medical devices based on the use of metal nanoparticles.

**Keywords:** metal nanoparticles, silver, zinc oxide, microbial sensitivity tests, antibacterial agents, drug resistance, anti-infective agents.

**For citation:** Dovnar RI, Smotryn SM, Anufrik SS, Sakalova TM, Anuchin SN, Iaskevich NN. Antibacterial and physico-chemical properties of silver and zinc oxide nanoparticles. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2022;20(1):98-107. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-1-98-107>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фотоника и электроника для инноваций», задание «Антибактериальные и ранозаживляющие свойства наночастиц металлов при индивидуальном и сочетанном воздействии лазерным излучением».

**Financing.** The work was carried out within the framework of the state program of scientific research "Photonics and electronics for innovations", the task "Antibacterial and wound healing properties of metal nanoparticles under individual and combined exposure to laser radiation".

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Об авторах / About the authors**

\*Довнар Руслан Игоревич / Dovnar Ruslan, e-mail: dr\_ruslan@mail.ru, ORCID: 0000-0003-3462-1465

Смотрин Сергей Михайлович / Smotryn Siarhei, e-mail: s.smotrin@mail.ru, ORCID: 0000-0002-3944-1124

Ануфрик Славамир Степанович / Anufriuk Slavamir, e-mail: anufriuk@grsu.by, ORCID: 0000-0002-5761-4965

Соколова Татьяна Николаевна / Sakalova Tatsiana, e-mail: sakalova@tut.by, ORCID: 0000-0002-4075-4515

Анучин Сергей Николаевич / Anuchin Sergei, e-mail: anuchin\_sn@grsu.by, ORCID: 0000-0003-4699-4349

Иоскевич Николай Николаевич / Iaskevich Nikolai, e-mail: inngrno@mail.ru, ORCID: 0000-0002-2954-0452

\* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

---

Поступила / Received: 10.12.2021

Принята к публикации / Accepted for publication: 26.01.2022