

## MEDICAL METALS SCIENCE

PACS numbers: 61.80.Jh, 68.35.bd, 68.35.Ct, 68.37.Ps, 68.43.-h, 79.20.Rf

### Антибактериальная обработка титана ионами $\text{Ar}^+$

М. А. Васильев, С. И. Сидоренко, С. М. Волошко,  
В. С. Филатова\*, П. А. Гурин\*\*

*Национальный технический университет Украины*  
*«Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского»*  
*просп. Победы, 37,*  
*03056 Киев, Украина*

*\*Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова НАН Украины,*  
*бульв. Академика Вернадского, 36,*  
*03142 Киев, Украина*

*\*\*Национальная медицинская академия последипломного образования*  
*имени П.Л. Шупика,*  
*ул. Дорогожицкая, 9,*  
*04112 Киев, Украина*

В работе исследованы физико-химические характеристики поверхности титана (BT1-0) и титанового сплава (BT6) после следующих внешних воздействий: 1) механической полировки; 2) бомбардировки ионами  $\text{Ar}^+$  (энергией 6 кэВ, доза облучения  $5 \cdot 10^{19}$  ион·см<sup>-2</sup>); 3) осаждения бактерий золотистого стафилококка (*S. aureus*) на полированной поверхности; 4) осаждения бактерий золотистого стафилококка (*S. aureus*) на обработанной ионами поверхности. Послойные изменения в химическом составе и морфологии поверхностных слоёв образцов после указанных воздействий

---

Corresponding author: Mykhailo Oleksiyovych Vasylyev  
E-mail: vasil@imp.kiev.ua

*National Technical University of Ukraine 'Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute',*  
*37 Peremohy Ave., UA-03056 Kyiv, Ukraine*

*\*G. V. Kurdyumov Institute for Metal Physics, N.A.S. of Ukraine,*  
*36 Academician Vernadsky Blvd., UA-03142 Kyiv, Ukraine*

*\*\*Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education,*  
*9 Dorohozhytska Str., UA-04112 Kyiv, Ukraine*

Citation: M. A. Vasylyev, S. I. Sidorenko, S. M. Voloshko, V. S. Filatova, and P. A. Gurin, Antibacterial Treatment of the Titanium with  $\text{Ar}^+$  Ions, *Metallofiz. Noveishie Tekhnol.*, 42, No. 2: 215–236 (2019) (in Russian), DOI: 10.15407/mfint.42.02.0215.

анализировали методами оже-электронной спектроскопии и растровой электронной микроскопии. Установлены эффекты пассивации поверхности и уменьшения количества адгезированных бактерий в результате бомбардировки ионами  $\text{Ar}^+$ , а также существенные изменения поверхностной структуры. Даны современные представления о механизмах взаимодействия в системе металл/бактерии.

**Ключевые слова:** поверхность титана, патогенные бактерии, ионная бомбардировка, оже-электронная спектроскопия, растровая электронная микроскопия.

У роботі досліджено фізико-хімічні характеристики поверхні титану (VT1-0) і титанового стопу (VT6) після наступних зовнішніх впливів: 1) механічної поліровки; 2) бомбардування іонами  $\text{Ar}^+$  (енергією 6 кеВ, доза опромінення  $5 \cdot 10^{19}$  іон·см<sup>-2</sup>); 3) осадження бактерій золотистого стафілокока (*S. aureus*) на полірованій поверхні; 4) осадження бактерій золотистого стафілокока (*S. aureus*) на обробленій іонами поверхні. Пошарові зміни в хімічному складі і морфології поверхневих шарів зразків після зазначених дій аналізували методами оже-електронної спектроскопії і растрової електронної мікроскопії. Встановлено ефекти пасивації поверхні і зменшення кількості адгезованих бактерій в результаті бомбардування іонами  $\text{Ar}^+$ , а також суттєві зміни поверхневої структури. Дано сучасні уявлення про механізми взаємодії в системі метал/бактерії.

**Ключові слова:** поверхня титану, патогенні бактерії, іонне бомбардування, оже-електронна спектроскопія, растрова електронна мікроскопія.

In the present work, the physic-chemical characteristics of the titanium (VT1-0) and titanium alloy (VT6) surfaces are studied after the following external influences: 1) mechanical polishing; 2) bombardment by  $\text{Ar}^+$  ions (energy 6 keV, irradiation dose  $5 \cdot 10^{19}$  ion·cm<sup>-2</sup>); 3) the deposition of the *S. aureus* bacteria on a polished surface; 4) the deposition of the *S. aureus* bacteria on the surface treated with ions. Layer-by-layer changes in the chemical composition and morphology of the samples' surface layers after mentioned treatments are analysed by Auger electron spectroscopy and scanning electron microscopy. The effects of surface passivation and the decrease in the number of the adherent bacteria as a result of bombardment by  $\text{Ar}^+$  ions, as well as significant changes in the surface structure are established. Modern ideas about the mechanisms of the interaction in the system of the metal/bacteria are presented.

**Key words:** titanium surface, pathogenic bacteria, ion bombardment, Auger electron spectroscopy, scanning electron microscopy.

(Получено 3 октября 2019 г.)

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Металлическая имплантология относится к той области медицины, которая связана с хирургической установкой в живой организм металлических устройств, которые заменяют поврежденные костные

органы для улучшения работы пострадавших частей костного скелета [1–4]. Методы интеграции металлических имплантатов в костную ткань хирургическим путём охватили многие области медицины, включая стоматологию, ортопедию тазобедренных суставов, а также сердечно-сосудистую хирургию. Число пациентов, нуждающихся в операциях по восстановлению целостности кости, постоянно растёт. Согласно мировой статистике наблюдается от 6 до 30% случаев отторжения или проявления повышенной реакции на вживленные имплантаты, что требует проведения их хирургической ревизии [5]. Целью современных исследований металлической имплантологии является разработка биосовместимых металлических устройств разнообразной конструкции и хирургических операций, обеспечивающих быструю интеграцию имплантатов в окружающие живые твёрдые и мягкие ткани и длительную продолжительность их службы. Важной задачей является также изучение физических, химических и физиологических механизмов отторжения инородного металлического тела в результате реакций на него живого организма. Основные явления и процессы, ведущие к интеграции имплантата, и, в конечном счёте, к успеху или разрушению имплантированного устройства, имеют место, в основном, на интерфейсе ткань/имплантат. Разработка интерфейса достаточно сложна и включает множество факторов. Сюда входят не только факторы, относящиеся к имплантатам, такие как материал, форма, топография, химия поверхности, но также и механическая нагрузка, хирургический метод, особенности тканей пациента, такие как количество и качество кости. По контрасту с ортопедическими протезами, рассчитанными только на взаимодействие с костью, зубные имплантаты должны также взаимодействовать с эпителием и подслизистой мягкой соединительной тканью. Однако некоторые базовые явления являются общими для всех взаимодействий ткань–биоматериал.

Перед современной металлической имплантологией стоят две важнейшие задачи, связанные с улучшением качества жизни пациентов: 1) разработка новых биосовместимых металлических материалов и конструкций вживляемых устройств; 2) модифицирование биомеханических свойств поверхности имплантатов, обеспечивающих ингибирование девайс-ассоциированных инфекций [6–14]. В европейских странах число инфекций, вызванных заражением имплантационного устройства, превышает 100 тыс. случаев в год. В США и Западной Европе каждый год фиксируется до 500 тыс. Особенностью имплантат-ассоциированных инфекций является образование инфекционных биоплёнок, возбудители которых постоянно пребывают в окружении определенного внеклеточного полимерного вещества (матрикса). Количество бактерий при этом может составлять лишь 5–35% массы биоплёнок. Матрикс биоплёнки состоит из экзополисахаридов, белков, тейхоевых кислот, липидов,

внутриклеточной ДНК. Накопление микроорганизмов на поверхности имплантатов в виде биоплёнок является причиной возникновения тяжёлых имплантат-ассоциированных инфекционных осложнений, сепсисов, что, в свою очередь, приводит к необходимости удаления различных заражённых металлических устройств, имплантируемых в организм человека. Микроорганизмы, которые чаще всего образуют биоплёнки на имплантатах, являются представителями нормальной микрофлоры организма человека. Ведущие позиции в этом отношении представляют два вида штаммов стафилококков *S. aureus* и *S. epidermidis* (~50%) [15]. Из-за высокой устойчивости к антибиотикам возникающие хронические инфекции трудно поддаются лечению. В большинстве случаев хирургическое удаление заражённого устройства является единственным эффективным способом борьбы с биоплёночными инфекциями. Таким образом, на сегодняшний день борьба с имплантат-ассоциированными инфекциями, является актуальной задачей современной металлической имплантологии. В связи с этим не только активно изучаются физиологические механизмы взаимодействия микроорганизмов с поверхностью металлических имплантатов, но и постоянно разрабатываются новые методы снижения степени адсорбции различных штаммов бактерий для предотвращения формирования биофильмов на поверхности металлических изделий.

Поскольку медикаментозное воздействие носит временный характер, предотвращения осложнений имплантации не обеспечивает продолжительную службу имплантатов, в последние годы наибольшее внимание уделяется развитию физических методов модификации физико-химического состояния поверхности металлических имплантатов для придания антибактериальных свойств без применения антибактериальных препаратов.

Наиболее распространённым металлическим материалом для серийного производства стоматологических и ортопедических имплантатов является технически чистый титан. По сравнению с другими металлами титан имеет ряд преимуществ, к которым относятся хорошая механическая прочность, высокая биосовместимость, биоинертность, практически отсутствие токсичности, высокая коррозионная стойкость, благодаря образованию на поверхности пассивирующего оксидного слоя, низкая теплопроводность, малый коэффициент линейного расширения, относительно малый удельный вес. Его высокая биосовместимость обусловлена присутствием природного однородного оксидного слоя  $TiO_2$  толщиной 1,5–2 нм. Однако чистый титан не имеет необходимой износостойкости, что приводит к загрязнению пространства возле протеза частицами износа. В связи с этим для производства зубных и ортопедических имплантатов начали использовать более прочные титановые сплавы, имеющие благоприятную комбинацию механических свойств и

биосовместимости. Самым распространённым из них является сплав ВТ6 ( $Ti_6Al_4V$ , Grade 5).

В литературе наибольшее внимание уделяется исследованию эффективности антибактериальных свойств поверхности титановых имплантатов путём нанесения покрытий, в состав которых входят элементы, уничтожающие бактерии и при этом сохраняющие биоактивные и биосовместимые свойства поверхности [16, 17]. В этом направлении наиболее распространённая стратегия связана с внедрением в покрытия атомов серебра [18–20]. Бактерицидный  $Ag$  является привлекательным из-за его широкого спектра антибактериальных свойств, хорошей стабильности в физиологической среде и небольшой вероятности развития устойчивых штаммов. Высвобождаемые с поверхности ионы  $Ag$  могут проникать в бактерии через ионные каналы, не повреждая клеточные мембраны и воздействуя на рибосому, ферменты, белки и ДНК, которые являются важными компонентами клеточных процессов бактерий. Вместе с этим вызывают определенные сомнения рекомендации с антибактериальной целью модифицировать поверхность титановых изделий с помощью ионов серебра. Во-первых, такие покрытия являются дорогостоящими и, во-вторых, ионы серебра могут вызывать отдалённые эффекты локальной клеточной токсичности в организме человека, что требует дополнительных клинических исследований [21–23].

Серебросодержащие биопокрытия, чаще всего, наносятся вакуумными физическими методами, основанными на ионной имплантации или катодном распылении [24, 25]. При этом особое внимание уделяется способам формирования нанокристаллических покрытий, показывающих большую антимикробную защиту [26–31]. Авторы [32] предлагают лазерную обработку поверхности титана с целью торможения формирования на ней бактериальных биофильмов.

Несмотря на огромное количество работ, направленных на разработку способов антибактериальной обработки титановых имплантатов, эта задача до настоящего времени полностью не завершена и требует дальнейшего развития. Для этого требуется и более глубокое изучение физиологических, физических и химических аспектов механизмов взаимодействия микроорганизмов с металлическими поверхностями на атомно-молекулярном уровне.

В результате многочисленных исследований (см. обзор [33]) установлены эффекты изменения химической активности металлических поверхностей в результате их бомбардировки ионами инертных газов невысоких энергий (менее 10 кэВ). При этом в зависимости от энергии ионов и дозы облучения химическая активность, например, по взаимодействию с кислородом может, как увеличиваться, так и снижаться.

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы заключается в том, чтобы впервые исследовать влияние бомбардировки ионами

инертного газа (аргона) на физико-химическое состояние поверхности титана (BT1-0) и титанового сплава (BT6) после их выдержки в культуре одного из штаммов стафилококков *S. aureus* и последующей стерилизации образцов.

## 2. МАТЕРИАЛЫ, ОБРАБОТКИ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные образцы технически чистого титана BT1-0 и титанового сплава BT6 имели форму шайбы диаметром 18 мм и толщиной 2 мм. Химический состав исследованных материалов приведен в табл. 1 по данным рентгенофлуоресцентного анализа. Образцы вырезали из прутков в состоянии поставки и затем отжигали в вакууме ( $P = 10^{-3}$  Па) при температуре 850°C в течение 2 часов и охлаждали вместе с печью. Такая термическая обработка обеспечивала получение глобулярной микроструктуры  $\alpha$ -фазы для BT1-0 и смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -фаз для сплава BT6. Поверхности отожжённых шайб были отшлифованы с помощью серии шлифовальных бумаг из карбида кремния (#320, #400, #600 и #800), с последующей полировкой алмазной пастой до зеркального состояния. Среднее арифметическое отклонение профиля ( $R_a$ ) для BT1-0 составили 0,05 мкм, для сплава BT6 — 0,12 мкм. Часть отполированных образцов помещали в сверхвысоковакуумную установку, оснащённую ионным источником с холодным полым катодом, и облучали ионами аргона ( $Ar^+$ ) с энергией 6 кэВ в течение времени, соответствующего дозе облучения  $5 \cdot 10^{19}$  ион·см<sup>-2</sup>. Данная доза по результатам предварительных исследований обеспечивает максимальный эффект пассивации [33]. Затем облученные и необлученные образцы подвергались очистке в ультразвуковой ванне, промывке дистиллированной и деионизированной водой и последующей сушке в духовке при 40°C в течение 1 часа. Для предохранения от внешних загрязнений образцы хранились в эксикаторе. Перед экспериментами по культивированию клеток и формированию биоплёнок эти образцы стерилизовали в паровом автоклаве при 120°C в течение 30 минут.

В качестве агрессивной культурной среды исследовано влияние на физико-химическое состояние поверхности титановых образцов одного из штаммов стафилококковой группы, а именно золотистого

ТАБЛИЦА 1. Химический состав исследованных материалов (% масс.).

TABLE 1. The chemical composition of the investigated materials (% wt.).

Сплав	Al	Mo	V	Zr	Fe	Si	O	C	Ti
BT1-0	0,01	–	–	–	0,12	0,002	0,144	0,003	99,721
BT6	6,45	–	3,85	0,02	0,087	0,01	0,165	0,005	89,413

стафилококка *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Данный штамм стафилококка является представителем нормальной микрофлоры человека и главной патогенной бактерией в клинической области и в пищевой промышленности [34].

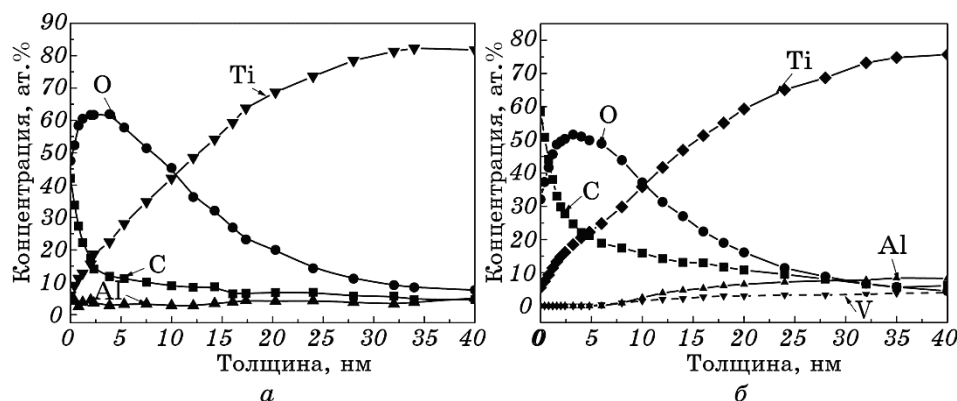
Выращивание (посев) золотистого стафилококка *S. aureus* на поверхности образцов проводили на питательной среде, содержащей желточно-солевой агар, в бактериологической лаборатории Киевской областной больницы № 2. В состав данного агара входит 100 мл мясопептонного бульона, 100 г хлорида натрия, 20% об. стерильной желточной взвеси [35]. В стерильные чашки Петри заливали свежеприготовленный агар и помещали экспериментальные образцы. Культивирование происходило в термостате при 37°C в течение трёх суток. Затем образцы подвергались стандартной процедуре стерилизации в автоклаве с водяным насыщенным паром при 130°C под давлением 1,5–2 ат. В таких условиях погибали все патогенные бактерии.

Изменения в химическом составе поверхностных слоёв образцов после различных воздействий анализировали с помощью метода оже-электронной спектроскопии (ОЭС) на приборе Jamp-9500F. Послойный оже-анализ осуществляли путём травления поверхности плёнки ионами  $\text{Ar}^+$  с энергией 1 кэВ под углом 30° к поверхности образца. Оже-спектры регистрировали при энергии первичного электронного пучка 10 кэВ и токе 30 нА с разрешением 0,6%. Данный прибор позволял также изучать морфологию поверхности образцов методом растровой электронной микроскопии (РЭМ).

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТ

С помощью методов ОЭС и РЭМ анализировали различия в химическом составе и микроструктуре поверхностных слоёв технически чистого титана ВТ1-0 и сплава титана ВТ6, содержащего в качестве легирующих элементов Al и V. Анализу подвергались образцы данных материалов после таких предварительных воздействий: 1 — механической полировки; 2 — бомбардировки ионами  $\text{Ar}^+$  (с энергией 6 кэВ и дозой облучения  $5 \cdot 10^{19}$  ион·см<sup>-2</sup>) полированной поверхности; 3 — осаждения бактерий на полированной поверхности; 4 — осаждения бактерий на обработанной ионами поверхности. Сначала изучали характер послойных распределений примесных атомов и легирующих элементов для всех указанных состояний поверхности экспериментальных образцов путём их распыления ионами  $\text{Ar}^+$  в камере оже-спектрометра. В качестве примера, такие распределения приведены на рис. 1 для ВТ1-0 (рис. 1, а) и ВТ6 (рис. 1, б) для состояния 4.

Как правило, на глубине распылённого поверхностного слоя до 40 нм наблюдается выход на стабильный уровень концентрации всех анализируемых элементов. Основными поверхностными при-



**Рис. 1.** Послойное распределение элементов для VT1-0 (а) и VT6 (б). Бомбардировка ионами  $\text{Ar}^+$  + бактерии (состояние 4).

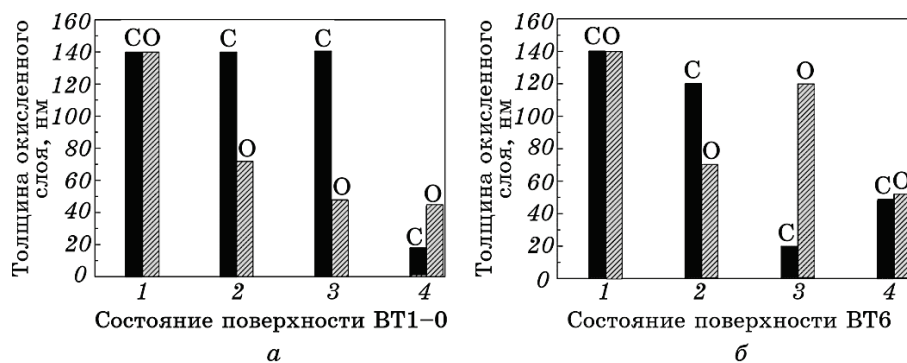
**Fig. 1.** Layer-by-layer distribution of elements for the VT1-0 (а) and VT6 (б). Bombardment with  $\text{Ar}^+$  ions + the bacteria (state 4).

месями в обоих случаях являются атомы O и C. По мере ионного распыления их концентрация достигает фонового уровня, приближаясь к содержанию в объёме материала, а концентрация атомов Ti, соответственно, достигает своего предельного значения. Атомы O и C являются составляющими оксикаридных слоёв, формирующихся на поверхности в результате предварительных обработок и взаимодействия с окружающей атмосферой. Для наглядности на рис. 2 приведены столбчатые диаграммы толщины оксикаридных слоёв для всех состояний поверхности VT1-0 (рис. 2, а) и VT6 (рис. 2, б), построенные по данным послойного анализа. Как видно из данного рисунка, наименьшая толщина такого слоя для обоих материалов наблюдается после ионной бомбардировки и воздействия бактерий (состояние 4).

Характер изменения концентрации анализируемых элементов до («пов») и после завершения ионного распыления («об») в камере оже-спектрометра приведён на рис. 3 для всех поверхностных состояний VT1-0 (рис. 3, а) и VT6 (рис. 3, б). Для VT1-0 (рис. 3, а), во-первых, можно отметить повышение концентрации O и зеркальное снижение содержания C в последовательности изменения состояний поверхности от 1 до 4.

Более высокая концентрация атомов O на исходной поверхности материала наблюдается для образцов, подвергнутых воздействию бактерий. Однако вглубь объёма она резко снижается для всех обработок. Обращает на себя особое внимание факт появления в оже-спектрах для VT1-0 после воздействия бактерий заметных пиков, обусловленных оже-переходами атомов Al.

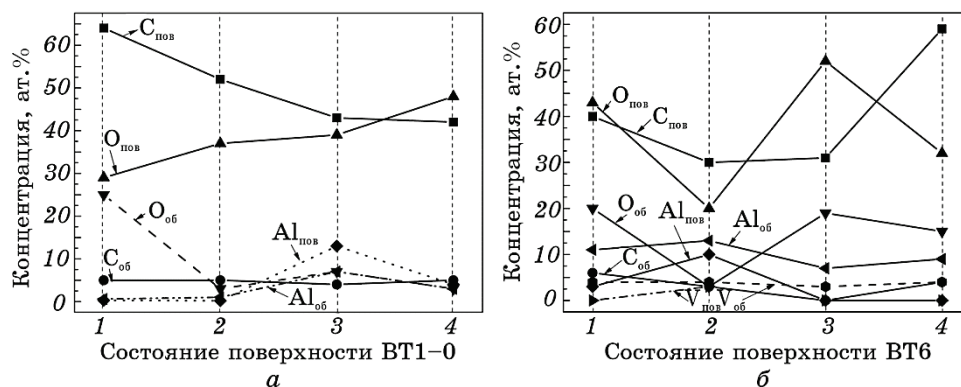




**Рис. 2.** Толщина поверхностного слоя, содержащего С и О, для разных состояний поверхности VT1-0 (а) и VT6 (б): 1 — полировка, 2 — бомбардировка ионами  $Ar^+$ , 3 — полировка + бактерии, 4 — бомбардировка ионами  $Ar^+$  + бактерии.

**Fig. 2.** Thickness of the surface layer containing C and O for different surface states for VT1-0 (a) and VT6 (b): 1—polishing, 2—bombardment with  $Ar^+$  ions, 3—polishing + bacteria, 4—ion bombardment with  $Ar^+$  ions + bacteria.

Расчёт концентрации этого элемента показал, что на поверхности полированного образца после выдержки в культуре бактерий она равна 13 ат.%. После распыления до 40 нм эта величина снижается



**Рис. 3.** Содержание примесных элементов на поверхности («пов») и на глубине распыления 40 нм («об») для разных состояний поверхности VT1-0 (а) и VT6 (б): 1 — полировка, 2 — бомбардировка ионами  $Ar^+$ , 3 — полировка + бактерии, 4 — бомбардировка ионами  $Ar^+$  + бактерии.

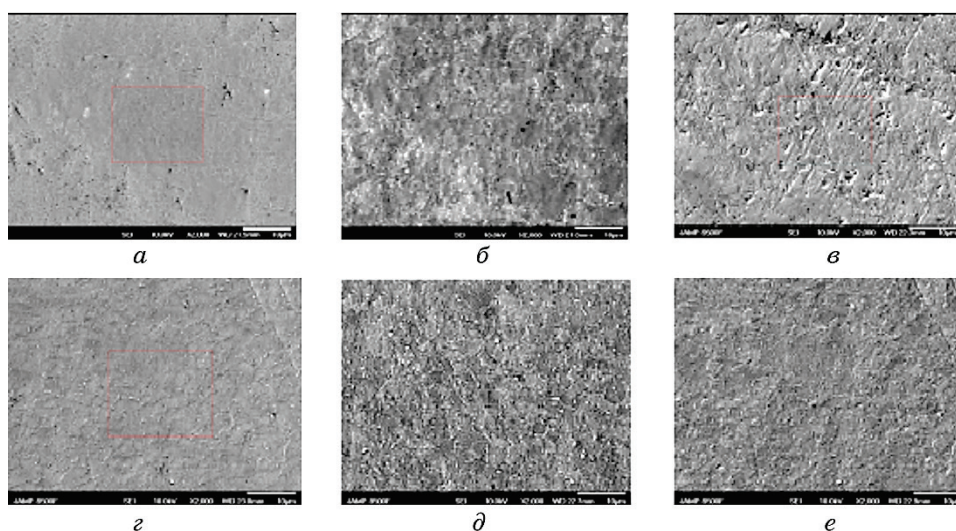
**Fig. 3.** The content of the impurity elements on the surface ('пов') and at the sputtering depth of 40 nm ('об') for different surface conditions for VT1-0 (a) and VT6 (b): 1—polishing, 2—bombardment with  $Ar^+$  ions, 3—polishing + bacteria, 4—ion bombardment with  $Ar^+$  ions + bacteria.

до 3,5 ат.%. В тоже время объёмное содержание этого элемента составляет не более 0,3 ат.%. Таким образом, выдержка в среде бактерий приводит к существенному обогащению атомами Al поверхностных слоёв VT1-0 за счёт их сегрегации из объёма материала.

Для сплава VT6 отмечается немонотонное изменение концентрации O и C на поверхности и в более глубоких слоях для всех состояний поверхности образцов (рис. 3, б). Резкое снижение количества атомов кислорода, как для поверхности, так и для более глубоких слоёв происходит только в случае полированного образца с бомбардировкой ионами аргона. Как показывают результаты для состояний 3 и 4 (т.е. после воздействия бактерий), концентрация атомов O сохраняется достаточно высокой и для поверхности, и для объёма. Содержание атомов Al для всех образцов отличается незначительно. На полированной поверхности атомы V не обнаружены. Однако после ионного распыления и воздействия бактерий его концентрация приближается к объёмному значению.

Кроме изменений в химическом составе поверхности и приповерхностных слоёв исследованных титановых материалов в результате воздействий ионной обработки и бактерий в настоящей работе установлены отличия и в морфологии их поверхностей.

На рисунке 4, в качестве примера, приведены РЭМ-изображения



**Рис. 4.** РЭМ-изображения микроструктуры для разных состояний поверхности VT1-0 (а-в) и VT6 (z-е): а, z — полировка; б, д — бомбардировка ионами Ar<sup>+</sup>; в, е — бомбардировка ионами Ar<sup>+</sup> + бактерии.

**Fig. 4.** SEM-images of microstructure for different surface states for VT1-0 (a-e) and VT6 (z-e): a, z—polishing; б, д—bombardment with Ar<sup>+</sup> ions; в, е—ion bombardment with Ar<sup>+</sup> ions + bacteria.

поверхности ВТ1-0 (рис. 4, а) и ВТ6 (рис. 4, б) для исходных поверхностей (1), а также после ионной и бактериальной обработок (2 и 4, в соответствии с принятыми обозначениями). Можно отметить, во-первых, существенное изменение морфологии исходной (полированной) поверхности после указанных воздействий для обоих материалов, и во-вторых, — эффект сглаживания поверхностного рельефа после адгезии бактерий. Особенностью изменения микроструктуры поверхности сплава ВТ6 является эффект практически полного исчезновения  $\beta$ -фазы. С помощью РЭМ также установлено, что эффективность снижения количества адгезированных бактерий в результате распыления поверхности ионами  $Ag^+$  составляет около 100% для ВТ1-0 и 85% для ВТ6.

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии являются представителями первых одноклеточных живых организмов и населяют почву, пресные и морские водоёмы, кислые горячие источники, радиоактивные отходы и глубинные слои земной коры [36]. Бактерии также составляют человеческую микрофлору в количестве десятков триллионов бактериальных клеток [37]. Бактериальная клетка представляет собой довольно сложную биологическую структуру, состоящую из клеточной стенки, клеточной мембраны, цитоплазмы в виде прозрачной белковой массы. В цитоплазме находятся рибосомы, ядерный аппарат с молекулами ДНК, различные включения запасных питательных веществ (гликогена, жира и др.). Бактериальная клетка обычно на 70–80% состоит из воды. В сухом остатке она имеет следующий химический состав: белок 50%, компоненты клеточной стенки 10–20%, молекула РНК 10–20%, молекула ДНК 3–4%, липиды 10%, углерод 50%, кислород 20%, азот 14%, водород 8%, фосфор 3%, сера и калий по 1%, кальций и магний по 0,5%, железо 0,2% [38].

Штамм золотистого стафилококка *S. aureus*, воздействие которого изучено в настоящей работе, является возбудителем многих инфекций и заболеваний, в том числе переимплантита (воспаления вокруг титановых имплантатов). *S. aureus* относится к виду шаровидных грамположительных бактерий из рода стафилококков, диаметр клетки которых составляет от 0,6 до 1,2 мкм. Приблизительно 25–40% населения являются постоянными носителями этой бактерии, которая может сохраняться на кожных покровах и слизистых оболочках верхних дыхательных путей [39].

Одна из важных проблем современной микробиологии связана с изучением механизмов взаимодействия одноклеточных организмов с окружающими веществами, содержащими атомы металлов. При этом можно выделить два аспекта этой проблемы: 1) роль металлов в жизнедеятельности бактерий; 2) явление металлической биосорб-

ции металлических ионов. Проблема взаимодействия металлов с клетками микроорганизмов представляет практический и теоретический интерес.

Тяжёлые металлы играют двойственную роль в процессах жизнедеятельности микроорганизмов. Некоторые из них (Mo, Fe, Cu, Mn, Mg, Zn, Ni и Co) являются жизненно необходимыми в «примесных» количествах. Так, общеизвестно, что ионы металлов входят в состав многих биологически важных макромолекул (ферментов, гормонов, витаминов, дыхательных пигментов, липидов и т.д.) и являются их необходимой частью, без которой не реализуется их физиологическая функция. Такие металлы как Cd, Pb, Sn, Hg, U и Ag не выполняют биологических функций, однако, при высоких концентрациях все эти элементы, за счёт хорошей способности к комплексообразованию, являются чрезвычайно токсичными для бактерий. Металлы могут влиять на процессы, протекающие в клетке, только проникая внутрь её и фиксируясь на субклеточных мембранах [40, 41].

Практически все микроорганизмы обладают способностью сорбировать металлы из растворов посредством реализации различных механизмов, таких как ионный обмен, комплексообразование, окислительно-восстановительные процессы и формирование нерастворимых соединений с ковалентными связями. Биохимические механизмы сорбции металлов обуславливают достижение концентраций металлов в тысячи и даже в миллионы раз больших по сравнению с их концентрацией в жидкости, из которой металл извлекается [42–44].

Установлено, что биосорбция на поверхности бактериальных клеток обусловлена наличием в клеточных стенках соединений, имеющих функциональные группы (фосфатная, карбоксильная, сульфгидрильная, гидроксильная и др.), способные связывать положительно заряженные ионы металлов. Такой вид сорбции происходит быстро, обратимо, часто не зависит от температуры и энергетического метаболизма. Механизмы, которыми металл связывается на поверхности клетки, вероятно, включают электростатические взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы, ковалентное взаимодействие и комбинации этих процессов [45, 46].

Способность микроорганизмов к сорбции ионов металлов является основой для разработки методов биоконцентрации металлов из разбавленных растворов и суспензий, методов биологической очистки сточных вод рудных и других предприятий, а также биотехнологии получения биологически активных добавок, обогащенных микроэлементами [47–49].

Указанные выше хорошо изученные аспекты взаимодействия в системе металл–бактерия относятся к водным средам, в которых атомы растворенных металлов находятся в виде положительно за-

ряженных ионов. Однако понимание механизма взаимодействия микроорганизмов с поверхностью твёрдых металлов далеко от завершения. Актуальность этой задачи, в первую очередь, связана с проблемами отторжения медицинских имплантатов и биокоррозии.

Первый акт взаимодействия бактерий с твёрдой металлической поверхностью начинается с их адгезии. В литературе приводятся некоторые достижения в понимании механизмов, с помощью которых бактериальные клетки прикрепляются и удерживаются на металлических поверхностях [50–55].

Бактериальная адгезия определяется физико-химическими свойствами прикрепляющихся клеток, субстрата и окружающей среды. Большая часть факторов среды, такие как её состав, гидродинамические условия, температура, время контакта, концентрация бактерий или присутствие антибиотиков и дезинфектантов, могут влиять на бактериальную адгезию. К факторам, которые влияют на адгезию бактерий к твёрдой поверхности, можно также отнести химический состав материала, поверхностный заряд, гидрофобность и свободную энергию поверхности, а также шероховатость и пористость поверхности. Кроме того, бактерии в водных растворах обычно отрицательно заряжены. Следовательно, поверхностный заряд, как для бактериального, так и для биоматериала должен учитываться при прогнозировании бактериальной адгезии на поверхностях материала. Бактерии предпочитают шероховатые или рифленые поверхности, которые увеличивают площадь контакта и улучшают способность к связыванию по сравнению с плоскими поверхностями.

Первоначальный механизм адгезии бактериальной клетки на поверхности металла представляет собой довольно сложное физико-химическое и биологическое явление. Бактериальная адгезия инициируется силами Ван-дер-Ваальса, электростатическими силами, водородными и ионными связями, выделением веществ, которые связывают ионы, например, внеклеточные полимерные вещества, а также кислотно-кислотными взаимодействиями и различными специфическими взаимодействиями рецептор–лиганд. Знания о возможных различиях в механизмах адгезии бактерий к металлическим поверхностям по сравнению с непроводящими полимерными поверхностями весьма ограничены. Можно высказать предположение, что в процессах адгезии бактерий к проводящим материалам важную роль может играть процесс переноса электронов. Кроме того, клеточная поверхность, как правило, заряжена отрицательно и поэтому предполагается, что электростатическое взаимодействие возникает между положительно заряженными ионами металла и отрицательно заряженными группами клеток, например, карбоксильными группами. Регулирование силой электростатического отталкивания может быть перспективной стратегией подав-

ления микробной адгезии на поверхности металлов.

На следующем этапе бактериальные клетки начинают пролиферировать и слипаться друг с другом, в результате чего происходит образование микроколоний или биоплёнок. Затем биоплёнки погружаются в собственно продуцированный внеклеточный матрикс. Последний представляет собой смесь таких веществ, как липополисахариды, гликопротеиды, протеогликаны, нуклеиновые кислоты и другие вещества, аналогичные по составу клеточным стенкам бактерий. Он пронизан каналами, полостями, порами и выростами, по которым циркулируют питательные вещества, ферменты, продукты жизнедеятельности, кислород. Вода является основным компонентом матрикса биоплёнки. Содержание бактерий составляет 10–50% от общего объёма биоплёнки. Количество внеклеточных полимерных веществ колеблется в пределах 50–90% от общего количества органического углерода в биоплёнках [56, 57]. Биоплёнки имеют большое значение для медицины, потому что они часто образуются при хронических бактериальных инфекциях или инфекциях, связанных с инородными имплантатами. Более того, бактерии в составе биоплёнок гораздо более живучие, чем отдельные бактериальные клетки.

Для понимания природы бактериального воздействия в случае титановых материалов, которые являются объектами исследования в настоящей работе, необходимо остановиться на особенностях физико-химического строения их поверхности. В первую очередь, это касается структуры оксидного слоя, который всегда образуется на поверхности титана или его сплавов в естественных условиях. Именно свойства их поверхностных оксидов определяют взаимодействие между металлическими имплантатами и матриксными белками, тканевыми клетками и микроорганизмами.

Обычно в спектрах ЭОС для поверхности полированных образцов технически чистого Ti доминирующие пики низкоэнергетических оже-переходов относятся к Ti (LMV), C (LMV) и O (LMV). За пределами углеродсодержащего слоя по форме и энергетическому положению указанных сигналов можно сделать вывод о том, что Ti присутствует в зарядовом состоянии  $Ti^{4+}$ , что соответствует поверхностному оксиду  $TiO_2$ . Рассчитанная толщина естественного оксидного слоя составляет обычно около 2 нм [58].

Строение оксидного слоя на поверхности титанового сплава более сложное в связи с тем, что, как известно, его объёмная кристаллическая структура характеризуется композиционной и морфологической гетерогенностью [59]. В отличие от чистого титана, ВТ6 при комнатной температуре представляет собой двухфазный сплав с дифференциальным распределением составляющих элементов в двух фазах. Результирующая микроструктура состоит из областей низкотемпературной  $\alpha$ -фазы (ГПУ,  $a = 0,295$  нм,  $c = 0,468$  нм,  $c/a =$

= 1,587), окруженных областями зёрен высокотемпературной  $\beta$ -фазы (ОЦК,  $a = 0,328$  нм). Легирующие элементы Al и V являются стабилизаторами  $\alpha$ - и  $\beta$ -фазы, соответственно. При этом  $\beta$ -фаза имеет более высокую концентрацию V, чем  $\alpha$ -фаза.

Из-за присутствия в сплаве ВТ6 двух легирующих элементов (Al и V) и связанного с этим изменения микроструктуры имеют место некоторые различия между поверхностными оксидами на Ti и сплаве. По данным ОЭС на исходной поверхности сплава на фоне основного оксида  $TiO_2$  присутствуют естественные оксиды алюминия ( $Al_2O_3$ ) и ванадия ( $V_2O_5$ ). Относительное количество указанных оксидов практически пропорционально концентрации соответствующих легирующих элементов. Как видно из результатов послойного анализа, концентрация V увеличивается с глубиной в оксид, достигая объёмных значений на границе раздела металл-оксид. Однако в реальной ситуации приведенная картина существенно усложняется благодаря присутствию в поверхностном слое ВТ1-0 и ВТ6 атомов С. Наиболее вероятно, что в данном случае присутствуют соединения типа оксикарида  $TiC_xO_y$  [60].

Отмеченные обстоятельства могут приводить и к различиям во взаимодействии этих материалов с бактериями, что, в свою очередь, может повлиять на характеристики материала в разных контекстах. Например, в работе [61] подробно изучена бактериальная адгезия клетки *S. Epidermic* к сплаву Ti6Al4V и установлено, что клетки имели тенденцию к прилипанию в оксидных участках смешанной фазы, а также на фазовых границах, содержащих более высокое количество атомов ванадия и азота. Оказалось, что бактерии чувствительны к вариациям концентрации ванадия, даже если она менее 0,1 ат. %.

Рассмотрим влияние ионной бомбардировки на морфологию и физико-химическое состояние металлических поверхностей, которые могут повлиять на механизмы взаимодействия бактерий с окисленными металлическими поверхностями. В настоящее время бомбардировка металлических поверхностей низкоэнергетическими ионами инертных газов широко используется в различных областях науки и техники, как для целенаправленного изменения свойств поверхности, так и в качестве средства диагностики поверхностных слоёв. В качестве примера, можно отметить физические и химические методы нанесения ионно-лучевых покрытий и тонких плёнок для улучшения адгезии [63–65]. Многочисленными исследованиями установлено, что при взаимодействии с поверхностью твёрдого тела ионный пучок инертных газов неизбежно приводит к изменению многих её свойств. В первую очередь, нарушается атомная структура за счёт генерации различных типов дефектов, начиная от точечных, и кончая формированием на исходно гладкой поверхности макроскопически трёхмерной морфологии. В случае

сплавов нарушение атомной структуры дополняется существенным изменением элементного состава приповерхностной области. Одна из причин этого эффекта — селективное распыление компонентов сплава, обусловленное различием их коэффициентов распыления и величины поверхностной энергии [66].

В рамках настоящей работы особый интерес представляют результаты, связанные с изучением влияния ионного облучения на изменение физико-химических свойств металлических поверхностей, в частности кинетики и механизма адсорбции кислорода, формирования оксидных слоёв и эффекта пассивации [33]. Для объяснения полученных результатов принята физико-химическая модель процесса, основанная на следующих двух основных предположениях: 1) точечные дефекты типа вакансий (или их скопления), а также выходы дислокаций, возникающие при ионной бомбардировке, увеличивают скорость адсорбции, являясь центрами адсорбции; 2) внедренные ионы аргона блокируют центры адсорбции, понижая энергию адсорбции на ближайших к дефекту атомах, и, тем самым, уменьшают скорость адсорбции. Конкурирующее влияние этих двух факторов на процесс адсорбции и должно определять характер кинетики взаимодействия кислорода с облучённой металлической поверхностью.

В связи с вышеизложенным, возникла идея исследовать влияние низкоэнергетического облучения ионами  $Ar^+$  поверхности титановых материалов, с одной стороны, на степень адгезии бактерий, а с другой — на изменение микроструктуры и химического состава поверхности металла. Эта задача актуальна, как с точки зрения создания антибактериальной поверхности для медицинских имплантатов, так и с точки зрения понимания механизма биокоррозии технических сооружений.

Обнаруженные в настоящей работе химические и морфологические эффекты влияния бомбардировки ионами инертного газа и адгезии бактерий штамма золотистого стафилококка *S. aureus* при исследовании титановых материалов возможно интерпретировать на основе специфических механизмов взаимодействия в системе металл/бактерии, изложенных выше. Эта задача будет решена нами в последующей работе.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Впервые исследовано влияние бомбардировки ионами инертного газа (аргона) на физико-химическое состояние поверхности титана (BT1-0) и титанового сплава (BT6) после их выдержки в культуре штамма золотистого стафилококка *S. aureus* и последующей стерилизации образцов.
2. Методами оже-электронной спектроскопии и растровой элек-



тронной микроскопии изучены послойные изменения в химическом составе и морфологии поверхностных слоёв образцов после следующих воздействий: 1 — механической полировки; 2 — бомбардировки ионами  $Ar^+$  (энергией 6 кэВ, доза облучения  $5 \cdot 10^{19}$  ион·см<sup>-2</sup>) полированной поверхности; 3 — осаждения бактерий на полированную поверхность; 4 — осаждения бактерий на обработанной ионами поверхности.

3. После внешних воздействий и контакта с окружающей атмосферой на поверхности образцов формируется оксикарбидные слоя различной толщины. Наименьшая толщина такого слоя для обоих материалов наблюдается после ионной бомбардировки и воздействия бактерий (эффект пассивации).

4. Выдержка в среде бактерий приводит к существенному обогащению атомами Al поверхностных слоёв VT1-0 за счёт диффузии его из объёма материала. Для сплава VT6 существенных сегрегационных эффектов не обнаружено.

5. Установлено, во-первых, существенное изменение морфологии исходной (полированной) поверхности после указанных воздействий для обоих материалов, и во-вторых, эффект сглаживания поверхностного рельефа после адгезии бактерий. Особенностью изменения микроструктуры поверхности сплава VT6 является эффект практически полного исчезновения  $\beta$ -фазы.

6. Эффективность снижения количества адгезированных бактерий в результате распыления поверхности ионами  $Ar^+$  составляет около 100% для VT1-0 и 85% для VT6.

Работа выполнена в рамках д/б темы МОН Украины № 2101 ф (номер государственной регистрации 0118U000221).

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Григорьян, А. К. Топоркова, *Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань* (Москва: Техносфера: 2007).
2. В. Л. Параскевич, *Дентальная имплантология: Основы теории и практики* (Минск: Юнипресс: 2012).
3. М. А. Васильев, П. А. Гурин, *Поверхность дентальных имплантатов: электронная, ионная спектроскопия* (Lambert Academic Publishing: 2019).
4. М. А. Васильев, В. И. Беда, П. А. Гурин, *Физиологический отклик на состояние поверхности дентальных имплантатов* (Львов: ГалДент: 2010).
5. *Биосовместимые материалы: учебное пособие* (Ред. В. И. Севастьянова, М. П. Кирпичникова) (Москва: МИА: 2011).
6. И. Н. Петухова, А. В. Соколовский, З. В. Григорьевская, Н. С. Багирова, И. В. Терещенко, Г. В. Варлан, В. В. Агинова, Н. В. Дмитриева, *Злокачественные опухоли*, 7, № 3s1: 57 (2017).
7. В. И. Чернявский, *Анали Мечниківського інституту*, № 1: 86 (2013).
8. С. А. Божкова, Р. М. Тихилов, М. В. Краснова, А. Н. Рукина, *Травматоло-*

- гия и ортопедия России*, **4**: 5 (2013).
9. Л. С. Бузолева, А. В. Пузь, С. Л. Синебрюхов, С. В. Гнеденков, А. В. Ким, А. И. Еськова, А. Л. Пономарева, *Современные проблемы науки и образования*, **5**: 34 (2016).
  10. G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey, *J. Clin. Microbiol.*, **22**, Iss. 6: 996 (1985).
  11. D. Lebeaux, J.-M. Ghigo, and Ch. Beloin, *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, **78**, No. 3: 510 (2014).
  12. G. Reid, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **11**, Iss. 3–4: 223 (1999).
  13. А. В. Голуб, *Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия*, № 1: 23 (2012).
  14. C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, and J. W. Costerton, *Biomaterials*, **33**, Iss. 26: 5967 (2012).
  15. Р. В. Ушакова, В. Н. Царева, *Стоматология для всех*, № 3: 22 (1998).
  16. J. Grischke, J. Eberhard, and M. Stiesch, *Dental Mater. J.*, **35**, Iss. 4: 545 (2016).
  17. И. Мушеев, Е. Брагин, Х. Мушеева, А. Мушеев, В. Балин, М. Харайда, С. Якубов, *Дентальная имплантология и хирургия*, № 3: 24 (2016).
  18. Sungwon Kim, Cheonil Park, Kwang-Hee Cheon *et al.*, *Appl. Sur. Sci.*, **451**: 232 (2018).
  19. H.-L. Huang, Y.-Y. Chang, M.-C. Lai, C.-R. Lin, Ch.-H. Lai, and T.-M. Shieh, *Surf. Coat. Technol.*, **205**, Iss. 5: 1636 (2010).
  20. Deepak Patil, Mishi Kaushal Wasson, S. Aravindan, P. Vivekanandan, and P. V. Rao, *Mater. Sci. Eng.: C*, **99**: 1007 (2019).
  21. J.-H. Lee, J.-S. Kwon, S.-K. Moon, S.-H. Uhm, B.-H. Choi, U.-H. Joo, K.-M. Kim, and K.-N. Kim, *J. Oral Maxillofacial Surg.*, **74**, Iss. 8: 1622.e1 (2016).
  22. P. Li, Zh. Tong, L. Huo, F. Yang, and W. Su, *J. Biomater. Appl.*, **31**, Iss. 2: 205 (2016).
  23. Wich Orapiriyakul, Peter S. Young, Laila Damiati, and Penelope M. Tsimbouri, *J. Tissue Eng.*, **9**: 1 (2018).
  24. J.-H. Lee, W.-S. Jeong, S.-J. Seo, H.-W. Kim, K.-N. Kim, E.-H. Choi, and K.-M. Kim, *Dental Mater.*, **33**, Iss. 3: 257 (2017).
  25. Bong Joo Park, D. H. Lee, and J.-C. Park, *Phys. Plasm.*, **10**, Iss. 11: 4539 (2003).
  26. D. Sabrina Puckett, Erik Taylor, Theresa Raimondo, and Thomas J. Webster, *Biomaterials*, **31**, Iss. 4: 706 (2010).
  27. Vi. K. Truong, Rimma Lapovok, Yuri S. Estrin, Stuart Rundell, James Y. Wang, Christopher J. Fluke, Russell J. Crawford, and Elena P. Ivanova, *Biomaterials*, **31**, Iss. 13: 3674 (2010).
  28. Andras Z. Komaromy, Shuyan Li, Hailong Zhang, Dan V. Nicolau, Reinhard I. Boysen, and Milton T. W. Hearn, *Microelectronic Eng.*, **91**: 39 (2012).
  29. Fabio Variola, John B. Brunski, Giovanna Orsini, Paulo Tambasco de Oliveira, Rima Wazen, and Antonio Nanci, *Nanoscale*, **3**, Iss. 2: 335 (2011).
  30. Carolina Díaz, Maria Cecilia Cortizo, Patricia Laura Schilardi, Sandra Gabriela Gómez de Saravia, and Mónica Alicia Fernández Lorenzo de Mele, *Mater. Res.*, **10**, No. 1: 11 (2007).
  31. M. Gosau, M. Haupt, S. Thude, M. Strowitzki, B. Schminke, and R. Buegers, *J. Biomedical Mater. Res.*, **104**, Iss. 8: 1571 (2016).

32. Lorenzo Drago, Monica Bortolin, Elena De Vecchi, Serse Agrappi, Roberto L. Weinstein, Roberto Mattina, and Luca Francetti, *J. Chemotherapy*, **28**, Iss. 5: 383 (2016).
33. M. O. Vasylyev, S. I. Sidorenko, S. M. Voloshko, and T. Ishikawa, *Usp. Fiz. Met.*, **17**, No. 3: 209 (2016).
34. К. Д. Пяткин, *Микробиология с вирусологией и иммунологией* (Москва: Медицина: 1971).
35. Л. Б. Борисов, *Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии* (Москва: Медицина: 1992).
36. J. K. Fredrickson, J. M. Zachara, D. L. Balkwill, D. Kennedy, Sh.-mei W. Li, H. M. Kostandarithes, M. J. Daly, M. F. Romine, and F. J. Brockman, *Appl. Environmental Microbiol.*, **70**, Iss. 7: 4230 (2004).
37. R. Sender, Sh. Fuchs, and R. Milo, *PLOS Biology*, **14**: e1002533 (2016).
38. М. В. Гусев, Л. А. Минеева, *Микробиология* (Москва: Академия: 2003).
39. J. Kluytmans, A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Clinical Microbiol. Rev.*, **10**, Iss. 3: 505 (1997).
40. D. H. Nies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, Iss. 6: 730 (1999).
41. Л. С. Бузолёва, А. М. Кривошеева, *Успехи современного естествознания*, № 7: 30 (2013).
42. А. Б. Таширев, *Микробиол. журн.*, № 2: 95 (1995).
43. А. Б. Таширев, *Микробиол. журн.*, № 6: 76 (1994).
44. А. Б. Таширев, Г. Ф. Смирнова, С. Б. Яновер, А. И. Самчук, *Микробиол. журн.*, № 3: 70 (1997).
45. H.-C. Flemming, *Water Sci. Tech.*, **32**, Iss. 8: 27 (1995).
46. V. Volesky, *Hydrometallurgy*, **59**, Iss. 2–3: 203 (2001).
47. М. В. Иванов, Г. И. Каравайко, *Микробиология*, **73**: 581 (2004).
48. А. Блайда, *Энерготехнологии и ресурсосбережение*, № 6: 39 (2010).
49. И. А. Блайда, Т. В. Васильева, Л. И. Слюсаренко, В. Ф. Хитрич, И. Н. Барба, *Комплексное использование минерального сырья*, № 3: 59 (2010).
50. B. L. Gabriel, J. Gold, A. G. Gristina, B. Kasemo, J. Lausmaa, C. Harrer, and Q. N. Myrvik, *Biomaterials*, **15**, Iss. 8: 628 (1994).
51. M. Ask, J. Lausmaa, and B. Kasemo, *Appl. Surf. Sci.*, **35**, Iss. 3: 283 (1988).
52. Baikun Li and Bruce E. Logan, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **36**, Iss. 2: 81 (2004).
53. Carla Renata Arciola, Davide Campoccia, Pietro Speciale, Lucio Montanaro, and John William Costerton, *Biomaterials*, **33**, Iss. 26: 5967 (2012).
54. A. Fan, H. Zhang, Y. Ma, X. Zhang, J. Zhang, and B. Tang, *J. Wuhan Univ. Technol.-Mat. Sci. Ed.*, **28**, Iss. 6: 1223 (2013).
55. Suganthan Veerachamy, Tejasri Yarlagadda, Geetha Manivasagam, and Prasad KDV Yarlagadda, *J. Eng. Medicine*, **228**, Iss. 10: 1083 (2014).
56. H. O. Gbejuade, A. M. Lovering, and J. C. Webb, *Acta Orthopaedica*, **86**, Iss. 2: 147 (2015).
57. W. M. Dunne, Jr., *Clinical Microbiology Rev.*, **15**, Iss. 2: 155 (2002).
58. M. Ask, J. Lausmaa, and B. Kasemo, *Appl. Surf. Sci.*, **35**, Iss. 3: 283 (1988).
59. Б. Б. Чечулин, С. С. Ушков, И. Н. Разуваева, В. Н. Гольдфайн, *Титановые сплавы в машиностроении* (Ленинград: Машиностроение: 1977).
60. В. А. Жилиев, Е. И. Патраков, *Тугоплавкие, керамические и композиционные материалы*, № 3: 49 (2014).
61. B. L. Gabriel, J. Gold, A. G. Gristina, B. Kasemo, J. Lausmaa, C. Harrer, and

- Q. N. Myrvik, *Biomaterials*, **15**, Iss. 8: 628 (1994).
62. A. J. R. van den Boogaard, E. Zoethout, I. A. Makhotkin, E. Louis, and F. Bijkerk, *J. Appl. Phys.*, **112**, Iss. 12: 123502 (2012).
63. S. Zuccon, E. Napolitani, E. Tessarolo, P. Zuppella, A. J. Corso, F. Gerlin, M. Nardello, and M. G. Pelizzo, *Opt. Mater. Express*, **5**, Iss. 1: 176 (2014).
64. X. Li, K.-W. Lin, H.-T. Liang, H.-F. Hsu, N. G. Galkin, Y. Wroczynskij, J. van Lierop, and P. W. T. Pong, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, **365**, Part A: 196 (2015).
65. L. Repetto, R. Lo Savio, B. Šetina Batič, G. Firpo, E. Angeli, and U. Valbusa, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, **354**: 28 (2015).
66. M. A. Vasiliev, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **30**, No. 22: 3037 (1997).

## REFERENCES

1. A. S. Grigoryan and A. K. Toporkova, *Problemy Integratsii Implantatov v Kostnuyu Tkan* (Moscow: Tekhnosfera: 2007) (in Russian).
2. V. L. Paraskevich, *Dentalnaya Implantologiya: Osnovyi Teorii i Praktiki* (Minsk: Yunipress: 2012) (in Russian).
3. M. A. Vasilev and P. A. Gurin, *Poverkhnost Dentalnykh Implantatov: Elektronnaya, Ionnyaya Spektroskopiya* (Lambert Academic Publishing: 2019) (in Russian).
4. M. A. Vasilev, V. I. Beda, and P. A. Gurin, *Fiziologicheskiy Otklik na Sostoyanie Poverkhnosti Dentalnykh Implantatov* (Lvov: GalDent: 2010) (in Russian).
5. *Biosovmestimye Materialy: Uchebnoe Posobie* (Eds. V. I. Sevastyanova and M. P. Kirpichnikova) (Moscow: MIA: 2011) (in Russian).
6. I. N. Petuhova, A. V. Sokolovskiy, Z. V. Grigorevskaya, N. S. Bagirova, I. V. Tereshchenko, G. V. Varlan, V. V. Aginova, and N. V. Dmitrieva, *Zlokachestvennye Opuholi*, **7**: 57 (2017) (in Russian).
7. V. I. Chernyavskiy, *Annals of Mechnikov Institute*, No. 1: 86 (2013) (in Russian).
8. S. A. Bozhkova, R. M. Tikhilov, M. V. Krasnova, and A. N. Rukina, *Travmatologiya i Ortopediya Rossii*, **4**: 5 (2013) (in Russian).
9. L. S. Buzoleva, A. V. Puz, S. L. Sinebryuhov, S. V. Gnedenkov, A. V. Kim, A. I. Eskova, and A. L. Ponomareva, *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya*, **5**: 34 (2016) (in Russian).
10. G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey, *J. Clin. Microbiol.*, **22**, Iss. 6: 996 (1985).
11. D. Lebeaux, J.-M. Ghigo, and Ch. Beloin, *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, **78**, No. 3: 510 (2014).
12. G. Reid, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **11**, Iss. 3–4: 223 (1999).
13. A. V. Golub, *Klinicheskaya Mikrobiologicheskaya Antimikrobnaya Khimioterapiya*, **1**: 23 (2012) (in Russian).
14. C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, and J. W. Costerton, *Biomaterials*, **33**, Iss. 26: 5967 (2012).
15. R. V. Ushakova and V. N. Tsareva, *Stomatologiya dlya Vsekh*, № 3: 22 (1998) (in Russian).
16. J. Grischke, J. Eberhard, and M. Stiesch, *Dental Mater. J.*, **35**, Iss. 4: 545

- (2016).
17. I. Musheev, E. Bragin, Kh. Musheeva, A. Musheev, V. Balin, M. Kharayda, and S. Yakubov, *Dentalnaya Implantologiya i Khirurgiya*, No. 3: 24 (2016) (in Russian).
  18. Sungwon Kim, Cheonil Park, Kwang-Hee Cheon *et al.*, *Appl. Surf. Sci.*, **451**: 232 (2018).
  19. H.-L. Huang, Y.-Y. Chang, M.-C. Lai, C.-R. Lin, Ch.-H. Lai, and T.-M. Shieh, *Surf. Coat. Technol.*, **205**, Iss. 5: 1636 (2010).
  20. Deepak Patil, Mishi Kaushal Wasson, S. Aravindan, P. Vivekanandan, and P. V. Rao, *Mater. Sci. Eng.: C*, **99**: 1007 (2019).
  21. J.-H. Lee, J.-S. Kwon, S.-K. Moon, S.-H. Uhm, B.-H. Choi, U.-H. Joo, K.-M. Kim, and K.-N. Kim, *J. Oral Maxillofacial Surg.*, **74**, Iss. 8: 1622.e1 (2016).
  22. P. Li, Zh. Tong, L. Huo, F. Yang, and W. Su, *J. Biomater. Appl.*, **31**, Iss. 2: 205 (2016).
  23. Wich Orapiriyakul, Peter S. Young, Laila Damiati, and Penelope M. Tsimbouri, *J. Tissue Eng.*, **9**: 1 (2018).
  24. J.-H. Lee, W.-S. Jeong, S.-J. Seo, H.-W. Kim, K.-N. Kim, E.-H. Choi, and K.-M. Kim, *Dental Mater.*, **33**, Iss. 3: 257 (2017).
  25. Bong Joo Park, D. H. Lee, and J.-C. Park, *Phys. Plasm.*, **10**, Iss. 11: 4539 (2003).
  26. D. Sabrina Puckett, Erik Taylor, Theresa Raimondo, and Thomas J. Webster, *Biomaterials*, **31**, Iss. 4: 706 (2010).
  27. Vi. K. Truong, Rimma Lapovok, Yuri S. Estrin, Stuart Rundell, James Y. Wang, Christopher J. Fluke, Russell J. Crawford, and Elena P. Ivanova, *Biomaterials*, **31**, Iss. 13: 3674 (2010).
  28. Andras Z. Komaromy, Shuyan Li, Hailong Zhang, Dan V. Nicolau, Reinhard I. Boysen, and Milton T. W. Hearn, *Microelectronic Eng.*, **91**: 39 (2012).
  29. Fabio Variola, John B. Brunski, Giovanna Orsini, Paulo Tambasco de Oliveira, Rima Wazen, and Antonio Nanci, *Nanoscale*, **3**, Iss. 2: 335 (2011).
  30. Carolina Díaz, María Cecilia Cortizo, Patricia Laura Schilardi, Sandra Gabriela Gómez de Saravia, and Mónica Alicia Fernández Lorenzo de Mele, *Mater. Res.*, **10**, No. 1: 11 (2007).
  31. M. Gosau, M. Haupt, S. Thude, M. Strowitzki, B. Schminke, and R. Buegers, *J. Biomedical Mater. Res.*, **104**, Iss. 8: 1571 (2016).
  32. Lorenzo Drago, Monica Bortolin, Elena De Vecchi, Serse Agrappi, Roberto L. Weinstein, Roberto Mattina, and Luca Francetti, *J. Chemotherapy*, **28**, Iss. 5: 383 (2016).
  33. M. O. Vasylyev, S. I. Sidorenko, S. M. Voloshko, and T. Ishikawa, *Usp. Fiz. Met.*, **17**, No. 3: 209 (2016).
  34. K. D. Pyatkin, *Mikrobiologiya s Virusologiyey i Immunologiyey* (Moscow: Meditsina: 1971) (in Russian).
  35. L. B. Borisov, *Rukovodstvo k Laboratornym Zanyatiyam po Meditsinskoy Mikrobiologii, Virusologii i Immunologii* (Moscow: Meditsina: 1992) (in Russian).
  36. J. K. Fredrickson, J. M. Zachara, D. L. Balkwill, D. Kennedy, Sh.-mei W. Li, H. M. Kostandarithes, M. J. Daly, M. F. Romine, and F. J. Brockman, *Appl. Environmental Microbiol.*, **70**, Iss. 7: 4230 (2004).
  37. R. Sender, Sh. Fuchs, and R. Milo, *PLOS Biology*, **14**: e1002533 (2016).

38. M. V. Gusev and L. A. Mineeva, *Mikrobiologiya* (Moscow: Akademiya: 2003).
39. J. Kluytmans, A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Clinical Microbiol. Rev.*, **10**, Iss. 3: 505 (1997).
40. D. H. Nies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, Iss. 6: 730 (1999).
41. L. S. Buzolyova and A. M. Krivosheeva, *Uspehi Sovremennogo Estestvoznaniya*, **7**: 30 (2013) (in Russian).
42. A. B. Tashirev, *Mikrobiol. Zhurn.*, No. 2: 95 (1995) (in Russian).
43. A. B. Tashirev, *Mikrobiol. Zhurn.*, No. 6: 76 (1994) (in Russian).
44. A. B. Tashirev, G. F. Smirnova, S. B. Yanover, and A. I. Samchuk, *Mikrobiol. Zhurn.*, No. 3: 70 (1997) (in Russian).
45. H.-C. Flemming, *Water Sci. Tech.*, **32**, Iss. 8: 27 (1995).
46. B. Volesky, *Hydrometallurgy*, **59**, Iss. 2–3: 203 (2001).
47. M. V. Ivanov and G. I. Karavayko, *Mikrobiologiya*, **73**: 581 (2004).
48. A. Blayda, *Energotehnologii i Resursosberezhenie*, No. 6: 39 (2010) (in Russian).
49. I. A. Blayda, T. V. Vasileva, L. I. Slyusarenko, V. F. Khitrich, and I. N. Barba, *Kompleksnoe Ispolzovanie Mineralnogo Syr'ya*, No. 3: 59 (2010) (in Russian).
50. B. L. Gabriel, J. Gold, A. G. Gristina, B. Kasemo, J. Lausmaa, C. Harrer, and Q. N. Myrvik, *Biomaterials*, **15**, Iss. 8: 628 (1994).
51. M. Ask, J. Lausmaa, and B. Kasemo, *Appl. Surf. Sci.*, **35**, Iss. 3: 283 (1988).
52. Baikun Li and Bruce E. Logan, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **36**, Iss. 2: 81 (2004).
53. Carla Renata Arciola, Davide Campoccia, Pietro Speciale, Lucio Montanaro, and John William Costerton, *Biomaterials*, **33**, Iss. 26: 5967 (2012).
54. A. Fan, H. Zhang, Y. Ma, X. Zhang, J. Zhang, and B. Tang, *J. Wuhan Univ. Technol.-Mat. Sci. Ed.*, **28**, Iss. 6: 1223 (2013).
55. Suganthan Veerachamy, Tejasri Yarlagadda, Geetha Manivasagam, and Prasad KDV Yarlagadda, *J. Eng. Medicine*, **228**, Iss. 10: 1083 (2014).
56. H. O. Gbejuade, A. M. Lovering, and J. C. Webb, *Acta Orthopaedica*, **86**, Iss. 2: 147 (2015).
57. W. M. Dunne, Jr., *Clinical Microbiology Rev.*, **15**, Iss. 2: 155 (2002).
58. M. Ask, J. Lausmaa, and B. Kasemo, *Appl. Surf. Sci.*, **35**, Iss. 3: 283 (1988).
59. B. B. Chechulin, S. S. Ushkov, I. N. Razuvaeva, and V. N. Goldfayn, *Titanovyye Splavy v Mashinostroenii* (Leningrad: Mashinostroenie: 1977) (in Russian).
60. V. A. Zhilyaev, and E. I. Patrakov, *Tugoplavkie, Keramicheskie i Kompozitsionnyie Materialy*, No. 3: 49 (2014) (in Russian).
61. B. L. Gabriel, J. Gold, A. G. Gristina, B. Kasemo, J. Lausmaa, C. Harrer, and Q. N. Myrvik, *Biomaterials*, **15**, Iss. 8: 628 (1994).
62. A. J. R. van den Boogaard, E. Zoethout, I. A. Makhotkin, E. Louis, and F. Bijkerk, *J. Appl. Phys.*, **112**, Iss. 12: 123502 (2012).
63. S. Zuccon, E. Napolitani, E. Tessarolo, P. Zuppella, A. J. Corso, F. Gerlin, M. Nardello, and M. G. Pelizzo, *Opt. Mater. Express*, **5**, Iss. 1: 176 (2014).
64. X. Li, K.-W. Lin, H.-T. Liang, H.-F. Hsu, N. G. Galkin, Y. Wroczynskij, J. van Lierop, and P. W. T. Pong, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, **365**, Part A: 196 (2015).
65. L. Repetto, R. Lo Savio, B. Šetina Batič, G. Firpo, E. Angeli, and U. Valbusa, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, **354**: 28 (2015).
66. M. A. Vasiliev, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **30**, No. 22: 3037 (1997).