

ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКИХ ВОЗБУЖДЁННЫХ СОСТОЯНИЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ**Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Пашкевич С.Н.**

Оренбургский государственный университет

пр. Победы, 13, г. Оренбург, 460018, РФ, azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Рассматривается механизм инактивации планктонных микроорганизмов ударными акустическими волнами. Ударные волны возникают при очень быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в жидкости, локально нагретой до температуры, превышающей порог кипения. Локальный нагрев осуществлялся импульсным лазерным излучением с помощью органических фототермических сенсibilизаторов. Эффективный фототермический сенсibilизатор должен иметь очень короткое время жизни (пикосекунды) возбужденных состояний. Таким условиям удовлетворяют высоковозбужденные электронные состояния (ВВЭС) органических красителей. ВВЭС красителей заселялись путем ступенчатого поглощения молекулой двух квантов падающего излучения через нижние возбужденные уровни. Возникновение и исчезновение пузырьков пара исследовано по кинетике светорассеяния низкоинтенсивного зондирующего луча гелий-неонового лазера.

Ключевые слова: высокие электронно-возбуждённые состояния молекул, локальный нагрев, ударные волны, инактивация микроорганизмов.

Распространение штаммов микроорганизмов, устойчивых к традиционной лекарственной химиотерапии, делает актуальным поиск альтернативных способов борьбы с патогенами [1-3]. Разрабатываемые противомикробные стратегии должны быть безопасными, быстродействующими, эффективными и минимизирующими резистентность бактерий.

Известны способы воздействия на живые микроорганизмы – фотодинамическая и фототермическая обработка [1-8], предполагающие облучение бактерий светом в присутствии сенсibilизаторов. Повреждающее действие на микробы могут оказывать как фотодинамические продукты (включая активные формы кислорода), так и чисто физические факторы - гипертермия или механическое действие образуемых при нагреве ударных волн. Тепловое действие сенсibilизаторов особенно актуально в средах с ограниченным содержанием кислорода; классический пример – бактериальные плёнки, образуемые в анаэробных условиях. Даже в плёнках, образующихся при нормальном атмосферном давлении, аэрирован только поверхностный слой, в глубинных слоях плёнки активные формы кислорода малоэффективны [3, 4].

В качестве фотосенсibilизаторов (ФС), способных генерировать и фотодинамические продукты, и тепло, можно использовать органические красители. При этом тепловыделение будет эффективным только у сенсibilизаторов с очень коротким временем жизни (1-10 пс) возбужденных состояний, когда основной канал релаксации – безызлучательная внутренняя конверсия. Такими свойствами обладают высокие возбуждённые электронные состояния (ВВЭС) молекул [9, 10]. Для заселения ВВЭС молекул требуется импульсная накачка излучением высокой плотности мощности. При таком возбуждении значительная доля поглощаемой энергии неизбежно трансформируется через ВЭС молекул. Энергообмен с окружением в ходе релаксации ВВЭС красителей, в свою очередь, инициирует физико-химические процессы, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов. Некоторые результаты фотоинактивации микроорганизмов в реакциях с участием ВЭС молекул красителей представлены в настоящей статье.

Исследованы планктонные культуры грамотрицательных и грамположительных палочковидных бактерий *Escherichia coli* и *Bacillales subtilis* в физрастворе (10^7 КОЕ/мл) при нормальных условиях. В качестве теплосенсibilизаторов использовались анионные ксантоновые красители эритрозин и эозин, а также катионный краситель родамин 6Ж (концентрация 0,01-0,5 мМ). Источником возбуждения служил YAG:Nd лазер (вторая гармоника, 532 нм), работающий в импульсном режиме (длительность импульса 15 нс, плотность мощности возбуждения (0,1-30) МВт/см²). Информацию о релаксации возбужденных состояний ФС получали по кинетике их замедленной флуоресценции и фосфоресценции, которые регистрировали с помощью ФЭУ-84 через монохроматор МДР-41. Повреждения бактерий оценивали путём подсчёта колониеобразующих единиц и визуализации с использованием атомно-силового микроскопа.

Дополнительные сведения о процессах в растворах, содержащих бактерии и ФС, при воздействии на них интенсивным (свыше 10 МВт/см²) возбуждающим светом, получали по рассеянию зондирующего излучения гелий-неонового (He-Ne) лазера. С помощью цилиндрической линзы в кювете с исследуемым раствором формировалась узкая протяжённая (0,3-10 мм²) зона возбуждения. Вдоль нее пропусклся зондирующий луч He-Ne лазера диаметром 1 мм. Нерассеянная часть этого луча блокировалась 3 мм экраном в непосредственной близости от сферической линзы, собирающей рассеянное излучение на входной щели монохроматора. Кинетика изменения интенсивности рассеянного света измерялась с помощью ФЭУ.

Установлено, что эффективность сенсibilизаторов зависит от характера их взаимодействия с клеточной стенкой, в частности, грам-положительные бактерии *B. subtilis* поражались эффективнее, чем *E. coli*, что согласуется с литературными данными [11, 12].

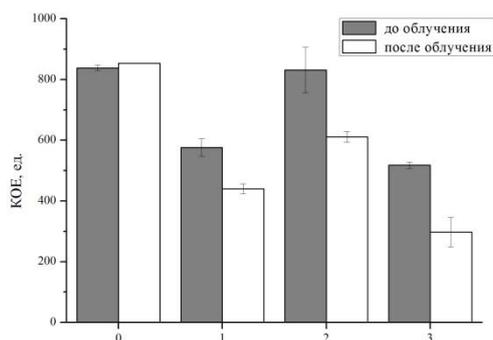


Рисунок 1. Гистограммы КОЕ клеток *Escherichia coli* до и после облучения растворов светом длины волны $\lambda = 532$ нм плотности мощности 20 МВт/см^2 без красителей (0) и в присутствии красителей концентрации $0,5 \text{ мМ}$: 1 – эритрозин, 2 – эозин, 3 – родамин 6Ж

Вместе с тем, обнаружено, что при равной дозе облучения, антимикробное действие существенно усиливалось если плотность мощности возбуждения превышала 10 МВт/см^2 . С ростом интенсивности возбуждения эффективность повреждения грам-отрицательных бактерий *E.coli* увеличивалась в присутствии как катионных, так и анионных красителей.

На рисунке 1 представлены гистограммы КОЕ *Escherichia coli* после облучения светом длины волны $\lambda = 532$ нм плотности мощности 20 МВт/см^2 .

Видно, что все исследованные красители проявляют противомикробную активность, что также подтверждается результатами, полученными с помощью атомно-силовой микроскопии.

Ксантоновые сенсibilизаторы обладают большим выходом в триплетное состояние и с высокой эффективностью генерируют активные формы кислорода [1-5]. Однако обращает на себя внимание то, что эозин, имея выход в триплетное состояние почти на 30% меньше, чем эритрозин, в условиях наших экспериментов оказывает фотодинамическое действие не меньшее, чем эритрозин. «Нефотодинамический» родамин 6Ж в физрастворе имеет выход в триплетное состояние всего около 0,01 и практически не производит активных форм кислорода, при этом его противомикробное действие выше, чем у ксантоновых красителей. Отсюда следует, что фотоинактивация бактерий осуществляется не только через фотодинамическое действие, но и по другому механизму. Мы полагаем, что гибель микроорганизмов связана с генерацией ударных акустических волн при релаксации ВВЭС молекул красителей.

На рисунке 2 представлена зависимость интенсивности фосфоресценции эозина ($c = 0,1 \text{ мМ}$) в физрастворе от плотности мощности возбуждающего излучения длины волны $\lambda = 532$ нм. При увеличении мощности падающего света интенсивность фосфоресценции красителя очень быстро нарастает (участок в диапазоне $1 \div 5 \text{ МВт/см}^2$), достигая насыщения, что связано с выходом на насыщение заселенности T_1 состояний молекул, образовавшихся в результате интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$. При дальнейшем повышении плотности мощности возбуждающего излучения интенсивность фосфоресценции эозина начинает вновь заметно увеличиваться. Это указывает на двухквантовый характер образования триплетных состояний молекул в результате последовательных переходов $S_1 \rightarrow S_n \rightarrow T_m \rightarrow T_1$, т.е. с ростом плотности мощности возбуждения эффективно заселяются ВВЭС молекул.

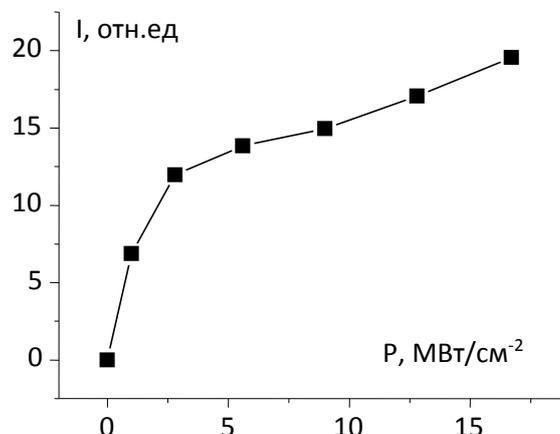


Рисунок 2. Зависимость интенсивности фосфоресценции эозина ($c = 0,1 \text{ мМ}$) в физрастворе от плотности мощности возбуждающего излучения длины волны $\lambda = 532$ нм

Релаксация ВВЭС молекул возможна по одному из следующих каналов [9]: излучение (флуоресценция); интеркомбинационная синглет-триплетная $S_n \rightarrow T_m$ или обратная триплет-синглетная $T_m \rightarrow S_k$ конверсия; безызлучательная внутренняя конверсия; фотохимическая реакция; перенос энергии на молекулы окружения.

Безызлучательная релаксация ВВЭС состояний молекул в среде сопровождается выделением тепла. Учитывая крайне малое время жизни таких состояний молекул, их можно рассматривать как мгновенные точечные источники. Ввиду большой удельной теплоемкости среды маловероятно ожидать, что при релаксации ВВЭС одной молекулы локальная температура растворителя заметно изменится. Однако в растворе с бактериями распределение молекул красителя неравномерно: в пространстве между бактериями или непосредственно на поверхности клеточных стенок могут сосредоточиться группы молекул. Если одиночная молекула не способна произвести ощутимого количества тепла, то конгломераты тесно расположенных молекул уже могут вызвать нагрев микроскопических областей, достаточный для воздействия на микроорганизмы.

В результате безызлучательной релаксации ВВЭС каждый ФС при однократном поглощении кванта света длиной волны 532 нм будет выделять количество теплоты, равное энергии $h\nu$ этого кванта. Если принять, что это тепло мгновенно усваивается сферой среды радиуса r , то можно оценить изменение температуры этой сферы:

$$h\nu = \frac{4}{3}\pi r^3 C\rho\Delta T$$

В наших экспериментах использовались растворы концентрацией $C = (0,1-0,5)$ мМ. Поскольку количество квантов возбуждающего излучения примерно в 10^6 раз больше, чем количество молекул красителя в облучаемом объеме, можно считать, что возбуждаются *все* молекулы в растворе. При плотности мощности выше 15 МВт/см² ВВЭС заселяются с высокой эффективностью. Кроме того, следует учитывать и длительность возбуждающего импульса. Поскольку длительность возбуждающего импульса составляла около 15 нс, акты поглощения квантов возбуждения и последующей релаксации могут происходить в молекулах неоднократно, каждый раз сопровождаясь тепловыделением.

Реальный размер зоны нагрева зависит от термодинамических свойств среды. Используя типичные значения термодинамических параметров $C \sim 4 \cdot 10^3$ Дж/(кг·К) и $\rho \sim 10^3$ кг/м³, можно приблизительно оценить уровень такого нагрева. Если принять радиус разогреваемой сферы 10 нм, то одиночные молекулы красителя «остывают» за около 10^{-8} с. Для сферы радиуса 10 нм величина ΔT не выше 10 К, однако уже для радиуса 1 нм ΔT превышает 100 К. Оценки времени остывания локально разогретых областей среды приведены в [9, 10]. Выделяющегося за короткое время тепла вполне достаточно для испарения воды и возникновения в растворе пузырьков. Образование и схлопывание пузырьков порождает ударные волны, которые, распространяясь в среде, могут механически повреждать компоненты клеточных мембран [6-8].

Кинетика возникновения и исчезновения пузырьков в растворах исследована по рассеянию света гелий-неонового лазера. На рисунке 3 представлены типичные кинетические кривые изменения интенсивности зондирующего луча, проходящего через кювету с эритрозином концентрацией 0.1 мМ в физрастворе при различной интенсивности возбуждения красителя. При малой плотности мощности возбуждения (до 5 МВт/см²) интенсивность рассеянного света после возбуждения ФС убывает, а затем восстанавливается за несколько микросекунд. Это обусловлено тем, что при одноквантовом возбуждении в результате $S_1 \rightarrow T_1$ процесса образуются возбужденные триплетные состояния и появляется наведенное триплет-триплетное $T_1 \rightarrow T_m$ поглощение. Этот сигнал убывает за несколько микросекунд, что соответствует времени жизни T_1 состояний красителя в растворах при нормальных условиях.

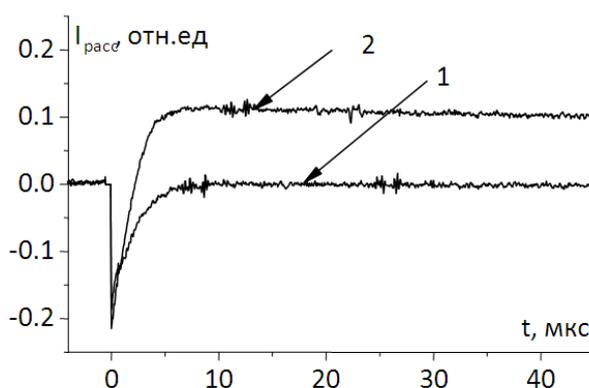


Рисунок 3. Кинетические кривые изменения интенсивности рассеянного света от луча He-Ne лазера, проходящего через кювету с эритрозином концентрацией 0.1 мМ в физрастворе при различной интенсивности возбуждения красителя: 1 – 5 МВт/см²; 2 – 30 МВт/см²

При высокой плотности мощности возбуждения (выше 15 МВт/см²) характер рассеяния существенно меняется: интенсивность рассеянного света растёт, а время релаксации увеличивается вплоть до нескольких миллисекунд, что значительно превышает время тепловой релаксации. Увеличение интенсивности рассеяния, по нашему мнению, обусловлено возникновением пузырьков в локально разогретых областях среды, при релаксации ВВЭС молекул красителей.

Наряду с разрушением бактерий ударными волнами возможны и другие механизмы деструкции микроорганизмов. Так возможна прямая гипертермия бактерий в результате тепловыделения при релаксации ВВЭС красителя. Необходимым условием для данного механизма является локализация сенсibilизатора в критически уязвимых локусах бактериальных клеток.

В основе другого механизма фотодеструкции микроорганизмов лежит безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения с ВВЭС красителя на молекулы мембраны. При заселении ВВЭС молекул путем ступенчатого возбуждения двумя квантами света через нижнее синглетное состояние достигается энергия около 5 эВ. Такой энергии достаточно для разрыва любой химической связи.

Наконец, еще один возможный канал фотоинактивации бактерий – фотохимические реакции с участием ВВЭС молекул. Такие реакции должны сопровождаться изменениями кинетики затухания люминесценции красителя, а также появлением новых полос в спектрах люминесценции и поглощения, так как имеют место структурные изменения молекулы. Нам не удалось обнаружить новых полос в спектрах люминесценции и поглощения, а также изменений кинетики затухания длительной люминесценции ФС, в связи с чем, можно утверждать, что вклад фотохимических реакций в наблюдаемые процессы пренебрежимо мал.

Обнаруженное повреждение бактерий ударными волнами, генерируемыми в среде тепловыми источниками указывает, что предварительное связывание сенсibilизатора с бактериальными стенками или их проникновение внутрь бактериальных клеток, не являются обязательным условием для их фотоинактивации. Органические красители можно использовать *in vivo*, где применение других теплосенсibilизаторов (например, наночастиц) ограничено из-за их токсичности. Полученные результаты могут быть полезны при разработке фотодинамических методов инактивации микроорганизмов.

Список литературы / References:

1. Baptista P.V. et al. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria – “A Battle of the Titans”. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, p. 1441. DOI: fmicb.2018.01441.
2. Kashef N., Huang Y., Hamblin M.R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. Review article. *Nanophotonics*, 2017, vol. 6(5), pp. 853-879. DOI: 10.1515/nanoph-2016-0189.
3. Ghorbani J., Rahban D., Aghamiri Sh., Teymouri A., Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.*, 2018, vol. 27(4), pp. 293-302. DOI: 10.5978/islsm.27_18-RA-01.
4. Yao Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J Clin Transl Res*, 2015, vol. 1(3), pp. 140-167.
5. Hessling M., Spellerberg B., Hoenes K. Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths - a review on existing data. *FEMS Microbiol Lett.*, 2017, vol. 364(2). DOI: 10.1093/femsle/fnw270.
6. Budimir M. [et al.] Efficient capture and photothermal ablation of planktonic bacteria and biofilms using reduced graphene oxide-polyethyleneimine flexible nanoheaters. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, vol. 7, pp. 2771-2781.
7. Lapotko D. Pulsed photothermal heating of the media during bubble generation around gold nanoparticles. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2009, vol. 52, pp. 1540-1543. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2008.08.010.
8. Rout B., Liu C., Wu W. Photosensitizer in lipid nanoparticle: a nano-scaled approach to antibacterial function. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-07444-w.
9. Летуца С.Н., Лантух Ю.Д., Пашкевич С.Н. Релаксация высоких электронно-возбужденных состояний многоатомных молекул. Оренбург: изд-во ОГУ, 2016, 164 с. [Letuta S.N. *Relaxation of high-energy excited electronic states of polyatomic molecules*. Orenburg: OSU print., 2016, 164 p. (In Russ.)]
10. Кучеренко М.Г. Кинетика нелинейных фотопроцессов в конденсированных молекулярных системах. Оренбург: Изд-во ОГУ, 1997. [Kucherenko M.G. *Kinetics of non-linear photoprocesses in condensed molecular systems*. Orenburg: OSU print., 1997. (In Russ.)]
11. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B Biol.*, 1992, vol. 14(3), pp. 262-266. DOI: 10.1016/1011-1344(92)85104-3.
12. Jori G., Fabris C., Soncin M.S., Coppellotti O., Dei D. [et al.] Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.*, 2006, vol. 38(5), pp. 468-481. DOI: 10.1002/lsm.20361.

THERMAL INACTIVATION OF MICROORGANISMS USING HIGH EXCITED ELECTRONIC STATES OF PHOTSENSITIZERS

Ishemgulov A.T., Letuta S.N., Pashkevich S.N.

Orenburg State University

Pobedy av., 13, Orenburg, 460018, Russia, e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Abstract. Mechanism of inactivation of plankton microorganisms by acoustic shock waves is discussed. Shock waves occur at very rapid formation and collapse of vapor bubbles in a liquid locally point heated to a temperature exceeding the boiling. Local heating was provided by pulsed laser excitation of organic photothermal sensitizers. An effective photothermal sensitizer should have a very short lifetime (picoseconds) of excited states. High excited electronic states (HEES) of organic dyes follow this requirement. HEES are produced as a result the stepwise absorption of two photons by the molecule through the lower excited states. The formation and disappearance of vapor bubbles in the solution was detected as a change in the light scattering of a low-intensity helium-neon laser beam passing through the cuvette.

Key words: *high excited electronic states of molecules, local heating, shock waves, inactivation of microorganisms.*