

УДК 577.34

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ БАКТЕРИЙ *Salmonella typhimurium* И *Staphylococcus aureus* ПРИ ИМПУЛЬСНОМ ФОТОВОЗБУЖДЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

© 2022 г. С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян, Д.А. Раздобреев, Л.В. Галактионова, Д.В. Дорофеев, Д.Е. Цюрко

Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург, просп. Победы, 13

E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 01.04.2022 г.

Принята к публикации 05.04.2022 г.

Обсуждаются механизмы инактивации планктонных культур бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* при возбуждении сенсibilизаторов мощными импульсами лазерного излучения длительностью 10 нс. Показано, что в зависимости от типа сенсibilизаторов и характера их взаимодействия с бактериями в растворах имеют место фотодинамическая инактивация активными формами кислорода и локальная гипертермия клеток. При высокой плотности мощности возбуждающего излучения (выше 10 МВт/см²) доминирующим механизмом повреждения бактерий становится деструкция клеток ударными акустическими волнами, возникающими в результате быстрого локального нагрева среды при трансформации сенсibilизаторами световой энергии в тепловую.

Ключевые слова: молекулярные сенсibilизаторы, бактериальная инактивация, фотодинамическое действие, гипертермия, ударные волны.

DOI: 10.31857/S0006302922030115, EDN: AOCQTJ

Непрерывное увеличение количества штаммов, устойчивых к традиционным антимикробным препаратам, рискует обернуться значительными гуманитарными и экономическими последствиями. Способность патогенных бактерий вырабатывать устойчивость к антибиотикам инициирует поиск новых способов инактивации, к которым они не смогут выработать иммунитет [1–3].

Таким требованиям воздействия на живые микроорганизмы удовлетворяет фотодинамическая обработка с участием активных форм кислорода (АФК) [4–13]. Однако фотодинамическое действие эффективно только в высоко аэрированных прозрачных средах, в которых возбуждающий свет проникает в глубокие слои. Среда, содержащая микроорганизмы, как правило, мутные и сильно рассеивающие. В таких средах фотосенсibilизаторы (ФС) эффективны только в периферийных приповерхностных слоях.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ФС – фотосенсibilизаторы, ВЭС – высокие электронно-возбужденные состояния (молекул), КОЕ – колониеобразующие единицы, ДРС – динамическое рассеяние света, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

Для воздействия на микроорганизмы в глубоких слоях непрозрачных сред можно использовать ударные волны [11, 14, 15]. Воздействие будет эффективным, если ударная волна создает достаточный для разрушения клеток перепад давления в масштабе, сравнимом с размерами микроорганизма. Если ударную волну возбуждать путем быстрого локального нагрева среды за время ~1 нс, то протяженность фронта волны составит ~1.5 мкм, что соизмеримо с размерами бактерий (порядка 1–5 мкм) и при достаточной амплитуде окажется губительным для микроорганизмов.

Ударные волны могут образовываться при участии ФС, если возбуждение будет осуществляться короткими, но мощными импульсами лазерного излучения [15]. В задаче инактивации микроорганизмов можно сформулировать следующие требования к ФС:

- высокий коэффициент поглощения на длине волны возбуждающего света;
- хорошая растворимость в среде с микроорганизмами;
- эффективное превращение лучистой энергии в тепло.

Таким требованиям удовлетворяют молекулы органических красителей. Для обеспечения се-

лективности локального нагрева возбуждение молекул красителей целесообразно производить видимым светом в основной полосе $S_0 \rightarrow S_1$ поглощения. Показано [14–19], что при высокой плотности мощности возбуждения (больше чем $8\text{--}10\text{ МВт/см}^2$) молекулы способны поглощать два и более кванта падающего излучения и ступенчато переходить через нижние синглетные S_1 - или триплетные T_1 -уровни в высокие электронно-возбужденные состояния (ВЭВС) S_n и T_m . Время жизни ВЭВС практически всех многоатомных молекул не превышает несколько пикосекунд, а релаксация их ВЭВС осуществляется посредством безызлучательной внутренней конверсии. Таким образом, фактически вся запасенная энергия ВЭВС трансформируется в нагрев среды [20, 21]. Если в красителе термосенсибилизаторов использовать красители с высоким квантовым выходом в триплетное состояние, то одновременно с нагревом такие молекулы могут обеспечивать эффективную генерацию АФК. В случае связывания молекул красителей со стенками бактерий или их проникновения внутрь клеток, возможна гипертермия клеток. В настоящей работе представлены результаты исследований различных механизмов повреждения бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* в присутствии анионных и катионных сенсibilizаторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили штаммы *Salmonella typhimurium* LT2 и *Staphylococcus aureus*. Бактерии *S. typhimurium* предварительно культивировали в течение суток на висмут-сульфитном агаре при 37°C . Затем клетки суспендировали в 0.9%-м стерильном растворе NaCl до значения оптической плотности 0.1 на длине волны 625 нм, которую измеряли на спектрофотометре ImmunoChem-2100 (High Technology Inc., США). Культуру *S. aureus* выращивали на LB-агаре (Sigma-Aldrich, США) в течение 18–24 ч при 30°C . Полученную бактериальную массу суспендировали в 0.9%-м растворе NaCl и доводили оптическую плотность до 0.015 на длине волны 450 нм.

Суспензию в объеме 200 мкл помещали в кварцевую кювету сечением $5 \cdot 24\text{ мм}^2$ и высотой 37 мм, добавляли от 0.2 до 0.5 мл красителя-сенсibilizатора в исходной концентрации (1 мМ) и доливали 0.9%-й раствор NaCl до общего объема 2 мл. Красители растворяли в том же физиологическом растворе, что и бактерии.

В качестве сенсibilizаторов использовали красители эритрозин и родамин С. Ксантоновый анионный краситель эритрозин обладает высоким (близким к единице) квантовым выходом в триплетное состояние и является очень эффек-

тивным генератором АФК. Родамин С является катионным красителем. Его квантовый выход в триплетное состояние низкий (близок к нулю), и он не является генератором АФК. Заметим, что вместо этой пары красителей можно было использовать любые другие соединения. Настоящая статья посвящена не конкретным сенсibilizаторам процессов, а различным механизмам фотоповреждения бактерий.

Для фотоинактивации бактерий суспензию с красителем через торцевую стенку кюветы (5 мм) возбуждали импульсами сфокусированного лазерного излучения. Источником возбуждения служил импульсно-периодический YAG:Nd лазер LQ-215 (SolarLS, Беларусь). Параметры возбуждения: длина волны $\lambda = 532\text{ нм}$, длительность импульса 10 нс, частота следования импульсов 10 Гц. С помощью цилиндрической собирающей линзы в кювете создавали зону возбуждения с апертурой $3.5 \times 0.35\text{ мм}^2$. Плотность мощности возбуждения была максимальной в фокусе линзы и регулировалась в пределах $0.1\text{--}30\text{ МВт/см}^2$. Часть света за фокусом линзы проникала в раствор. В зависимости от концентрации красителей и интенсивности накачки возбуждающее излучение проникало вглубь раствора на расстояние не более 5–6 мм. Перемешивание образцов в кювете во время облучения, а также после облучения не проводилось.

Выбранные красители очень эффективно поглощают излучение длины волны $\lambda = 532\text{ нм}$. Безызлучательная релаксация электронно-возбужденных состояний молекул красителей сопровождается локальным нагревом среды. В результате в зоне фокусировки возникают ударные волны аксиальной симметрии. Распространение волн по объему кюветы фиксировалось по рассеянию зондирующего луча сечением менее 1 мм от невозмущающего He-Ne-лазера. Зондирующий луч пересекал кювету в направлении перпендикулярном возбуждающему лучу на регулируемом расстоянии от фокуса линзы. Детально экспериментальная установка и методика регистрации ударных волн представлены в работе [22].

Инактивирующее действие лазерного излучения на *S. typhimurium* оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). До и после облучения из кюветы отбирали 0.3 мл суспензии и проводили серию разведений в растворе NaCl с последующим высевом из двух параллельных разведений (10^{-2} и 10^{-3}) на висмут-сульфитный агар (для получения достоверно значимых результатов исследования проводили в пятикратной повторности). Полученную среду инкубировали при 37°C в течение 24 ч с последующим подсчетом КОЕ.

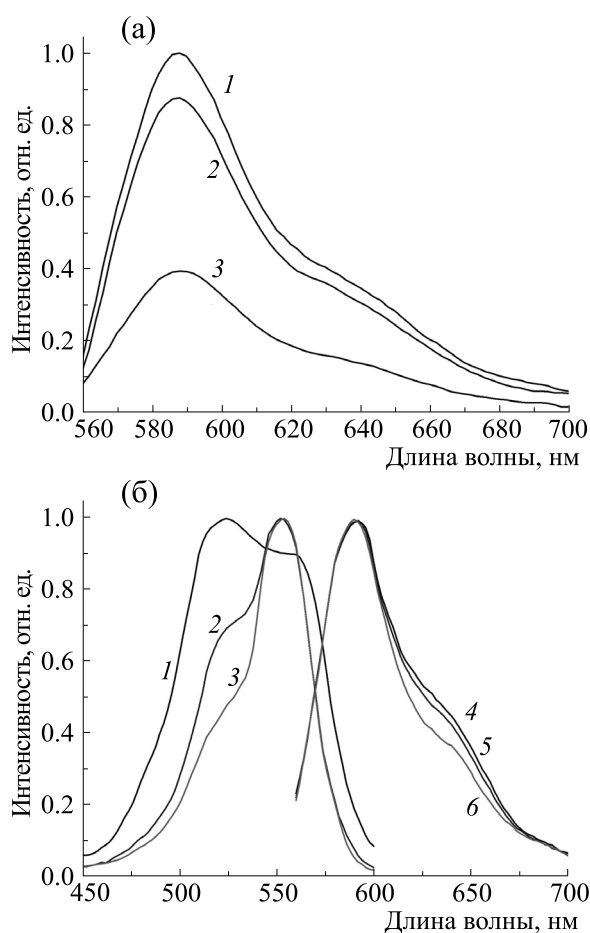


Рис. 1. (а) – Спектры флуоресценции родамина С в физиологическом растворе (0.25 мМ) при различном содержании *S. typhimurium*: $0.25 \cdot 10^6$ КОЕ/мл (1); $0.5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл (2), и 10^7 КОЕ/мл (3). (б) – Спектры поглощения (1, 2, 3) и люминесценции (4, 5, 6) родамина С в физиологическом растворе. Концентрация красителя: 1 ммоль/л (1, 4), 0.5 ммоль/л (2, 5) и 0.1 ммоль/л (3, 6).

Для оценки повреждения *S. aureus* пробы суспензии бактерий с красителями до и после облучения вносили в 1 мл ЛВ-бульона, и инкубировали при 30°C в течение 16–18 ч, после чего переносили в лунки прозрачного планшета и измеряли оптическую плотность на длинах волн 450 и 630 нм.

Размеры частиц и их распределения по размерам определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью наносайзера Photocor (ООО «Фотокор», Москва) и программы DynaLS. Подвижность частиц и их среднее число в объеме рассеяния оценивали визуально с помощью микроскопа Altami (ООО «Альтами», Санкт-Петербург).

Для установления характера повреждения бактерий и изменения их топографии использовали зондовый сканирующий микроскоп ССМ-2000

(ОАО «Завод ПРОТОН-МИЭТ», Зеленоград), работающий в атомно-силовом режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие красителей с бактериями. Известно [23], что на поверхности бактерий распределен отрицательный заряд, сформированный анионными полимерами клеточных стенок, в первую очередь, пептидогликаном со встроенными карбоксильными группами γ -глутаминовой и мезо-диаминопимелиновой кислот, а также терминальные остатки D-Ala пептидных субъединиц. Наличие отрицательного заряда у бактерий приводит к тому, что в растворах за счет электростатического взаимодействия молекулы-катионы связываются с клетками, что сопровождается изменениями их спектрально-люминесцентных свойств. Поэтому взаимодействие родамина С и эритрозина с бактериями исследовано методами электронной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.

В электронных спектрах поглощения и флуоресценции эритрозина в физиологическом растворе при добавлении бактерий *S. typhimurium* существенные изменения не зафиксированы. Незначительное уменьшение пропускания света растворами и падение интенсивности флуоресценции обусловлено рассеянием зондирующего (возбуждающего) света микроорганизмами.

Напротив, родамин С активно взаимодействует с бактериями. На рис. 1а представлены спектры флуоресценции родамина С (0.25 мМ) в физиологическом растворе при различной концентрации бактерий *S. typhimurium*. С ростом концентрации бактерий интенсивность флуоресценции красителя уменьшается. Это обусловлено связыванием молекул красителя со стенками клеток. При этом катионы красителя восстанавливаются, а отрицательный заряд стенки *S. typhimurium* частично нейтрализуется.

Анализ спектров поглощения и флуоресценции родамина С (рис. 1б) указывает на присутствие в растворе (даже без бактерий) ассоциатов красителя уже при концентрации молекул выше 10^{-4} моль/л. В спектрах поглощения и флуоресценции красителя появляются максимумы в области 510 нм и 640 нм соответственно. Это важно потому, что при образовании ассоциатов тепловыделение в растворе после фотовозбуждения увеличивается, поскольку квантовый выход флуоресценции ассоциатов красителя ниже, чем мономеров [24]. Однако в бактериальных растворах ни в спектрах поглощения, ни в спектрах флуоресценции не обнаружены новые максимумы, свидетельствующие об образовании ассоциатов красителя. Момеры родамина С относительно равномерно распределяются по поверхности бак-

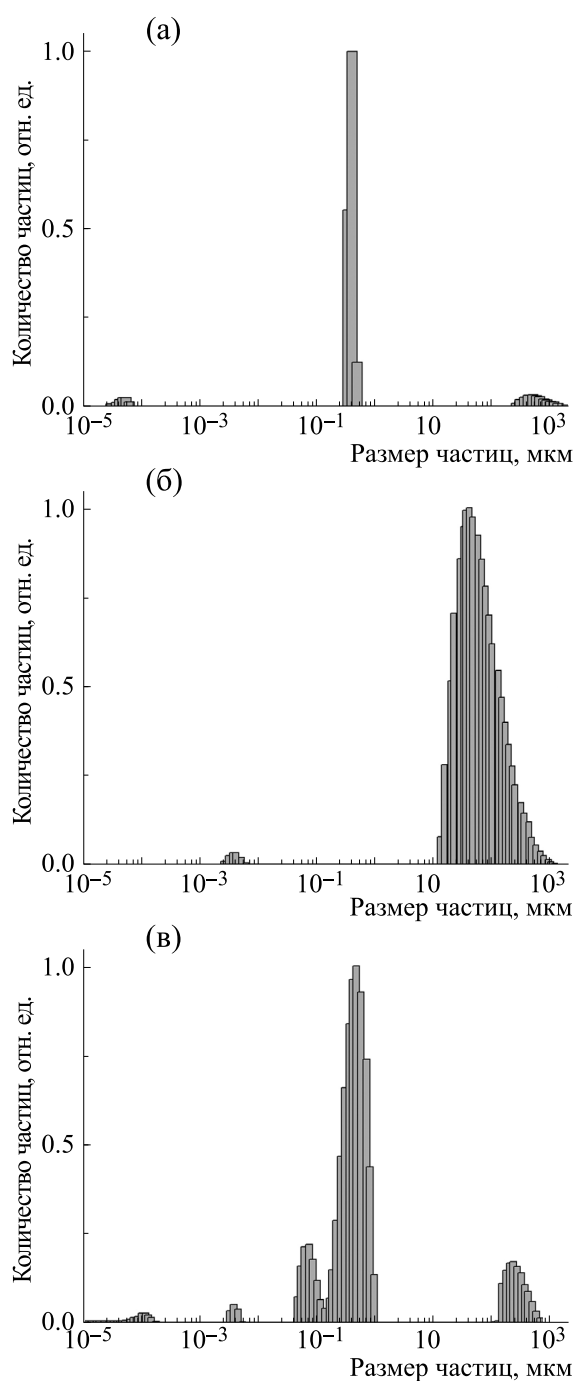


Рис. 2. Распределение частиц в бактериальной суспензии *S. typhimurium* по размерам, полученное методом ДРС: (а) — бактерии в чистом физрастворе; (б) — бактерии в растворе родамина С (0.1 ммоль/л в физрастворе); (в) — то же после облучения.

терий, то есть при связывании красителя со стенками клеток не проявляется кооперативный эффект.

Связывание родамина С микроорганизмами оказывает существенное влияние на взаимодей-

ствии бактерий друг с другом. Нейтрализация заряда внешней стенки клеток приводит к тому, что они «слипаются» в крупные агрегаты размером около 5–10 мкм. Такие крупные объекты нетрудно наблюдать в оптический микроскоп. Для оценки распределения частиц по размерам построены гистограммы ДРС растворами бактерий до и после добавления родамина С, представленные на рис. 2а,б. В растворах без красителя эффективный гидродинамический радиус у 85.4% бактерий составлял 0.594 мкм, а у 11.6% — 6.4 мкм (рис. 2а). После добавления родамина С одиночных бактерий в растворе практически не остается. Эффективный радиус образующихся скоплений микроорганизмов на порядок больше (рис. 2б).

Обоснованием достоверности определения размеров частиц методом ДРС служит достаточно большая концентрация частиц в объеме рассеяния (не менее 200 бактерий) и незначительная доля (около 5% от общего числа) активно движущихся бактерий (можно надежно считать, что основная масса бактерий совершает броуновское движение). Время корреляции, связанное с релаксацией флуктуаций концентрации бактерий за счет их собственного перемещения, более быстрого, чем тепловое броуновское движение, можно оценить по левому пику на рис. 2а.

Форму и размеры образующихся агрегатов клеток *S. typhimurium* определяли с помощью сканирующей зондовой микроскопии. Форма бактериальных агрегатов, образующихся после добавления родамина С (рис. 3а), не обязательно сферическая. При этом размеры агрегатов совпадают с размерами, полученными методом ДРС (рис. 2б). Следует обратить внимание, что при добавлении в суспензию с бактериями эритрозина крупные агрегаты клеток не наблюдаются (рис. 3б).

Фотоинаktivация бактерий связанными и несвязанными красителями. На рис. 4а показаны значения КОЕ *S. aureus* до и после облучения в присутствии родамина С и эритрозина при облучении растворов импульсным излучением различной плотности мощности.

На рис. 4б представлены результаты измерения оптической плотности необлученных и облученных суспензий со стафилококками.

Из рис. 4 видно, что жизнеспособность бактериальных клеток, помещенных в раствор красителя, существенно снижается после облучения. При этом в присутствии эритрозина это снижение наблюдается уже при плотности мощности возбуждения $P \leq 1$ МВт/см², в то время как в растворах родамина заметная инаktivация наблюдается при P около 8–10 МВт/см². Это может быть связано с вкладом либо фотодинамических процессов, либо ударных волн.

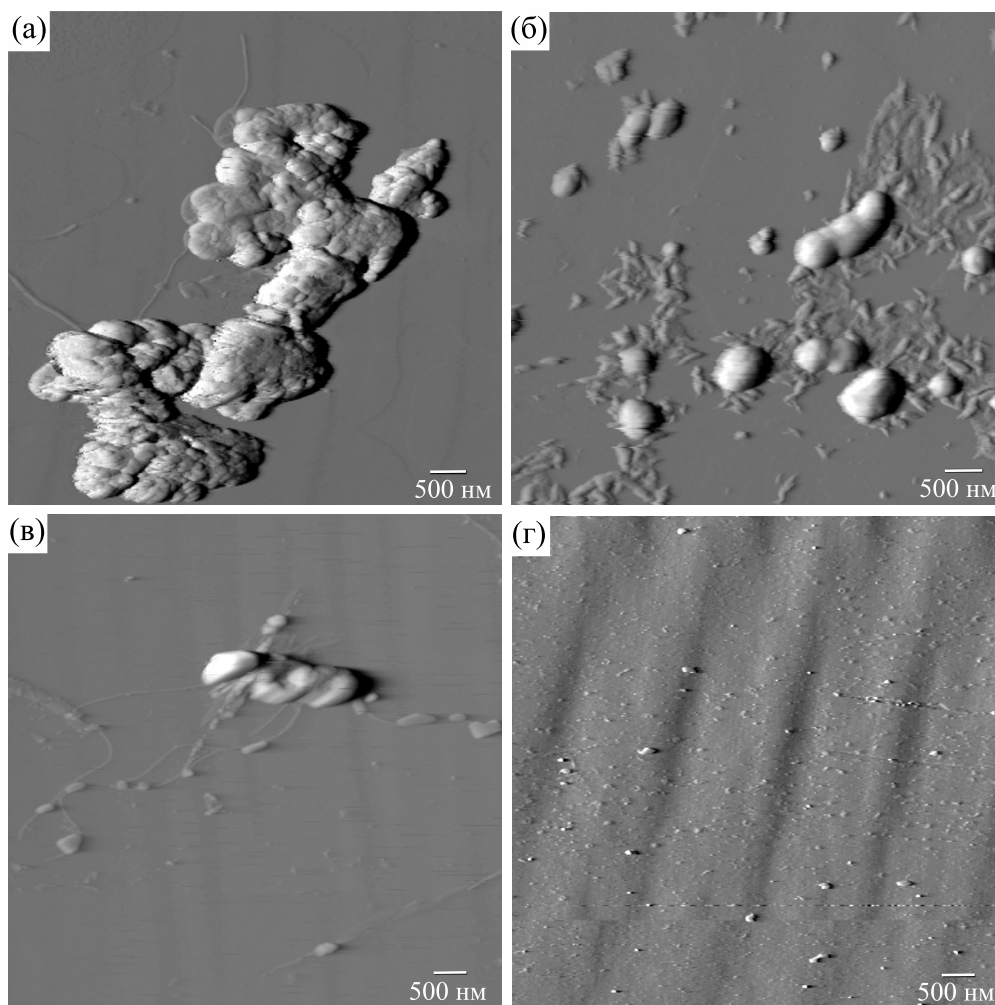


Рис. 3. АСМ-изображения клеток *S. typhimurium*. Бактерии в растворе родамина С (а) и эритрозина (б) (0,1 ммоль/л в физрастворе). То же после облучения для раствора родамина С (в) и эритрозина (г).

Для оценки вклада фотодинамических процессов в повреждение микроорганизмов сравнивались КОЕ бактерий, взятых из растворов, содержащих кислород, и из бескислородных растворов. Для вытеснения кислорода суспензию с красителем продували газобразным азотом. Уменьшение содержания кислорода в растворе контролировали по увеличению времени жизни триплетных состояний эритрозина, измеряемого по кинетике фосфоресценции. После продувания раствора азотом в течение 10 мин время жизни фосфоресценции эритрозина увеличивалось с 5 до 600 мкс. Посев бактерий из обескислороженных растворов и определение КОЕ до облучения показало, что анаэробные *S. typhimurium* и *S. aureus* хорошо переносят эту процедуру.

В кислородных растворах, содержащих эритрозин, выживаемость бактерий после облучения оказалась на 10–20% ниже, чем в дезаэрированных растворах при тех же условиях облуче-

ния. Это указывает на то, что фотодинамическое повреждение бактерий имеет место, но данный механизм не является доминирующим. В основном инактивация микроорганизмов происходит под действием ударных волн.

Квантовый выход в триплетное состояние у эритрозина в физрастворе ~ 0.99 , а константа скорости $S_1 \rightarrow T_1$ интеркомбинационной конверсии $\sim 10^9 \text{ с}^{-1}$ [24]. Поэтому даже при плотности мощности возбуждающего света 1.0 МВт/см^2 практически каждая молекула после возбуждения в основной полосе $S_0 \rightarrow S_1$ за время примерно 1 нс переходит в долгоживущее триплетное T_1 состояние, и становится источником тепловыделения за счет циклических безызлучательных переходов $T_1 \leftrightarrow T_m$, или $T_1 \rightarrow T_m \rightarrow S_1 \rightarrow T_1$. У родамина С квантовый выход $S_1 \rightarrow T_1$ интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ~ 0.01 , а основной

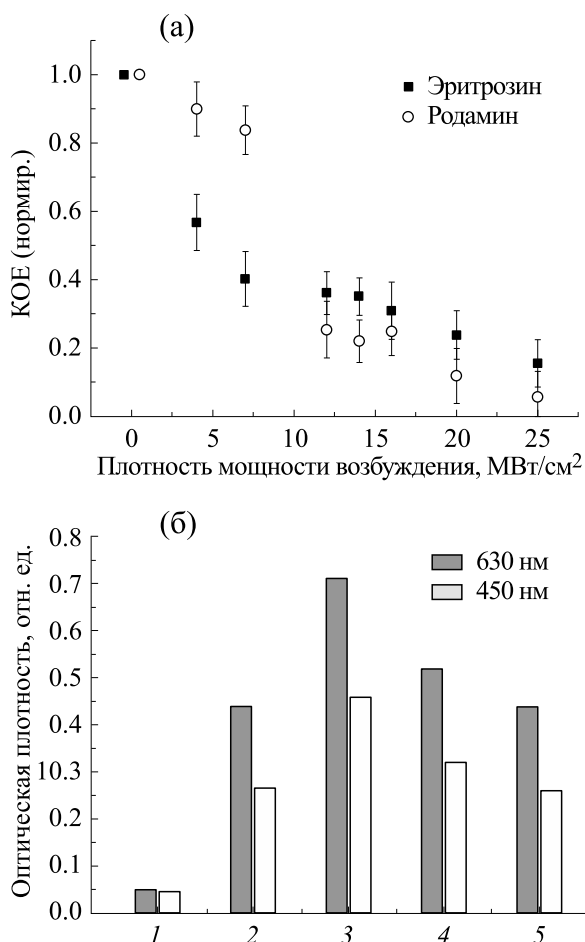


Рис. 4. (а) – КОЕ *S. aureus* после импульсного лазерного облучения при различной плотности мощности в растворах родамина С и эритрозина. Продолжительность облучения 20 с. Концентрация красителей 0.25 ммоль/л в физрастворе. (б) – Оптическая плотность растворов эритрозина (0.25 ммоль/л в физрастворе) на длине волны 450 и 630 нм: 1 – оптическая плотность пустой лунки, 2 – чистый физраствор, 3 – бактерии до облучения, 4 – бактерии после облучения (образцы взяты на расстоянии 10 мм от зоны облучения), 5 – бактерии после облучения (образцы взяты непосредственно из зоны облучения).

канал релаксации S_1 -состояний – $S_1 \rightarrow S_0$ флуоресценция [25]. Для родамина С процесс поглощения становится двухквантовым только при плотности мощности возбуждения около 8–10 МВт/см², при этом высокие S_n -состояния молекул заселяются по схеме $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$ [16–19].

Ударные волны могут распространяться в темные зоны, куда возбуждающий свет не проникает. На рис. 5 показаны гистограммы КОЕ клеток *S. typhimurium* до и после облучения лазерными импульсами растворов бактерий с разными сен-

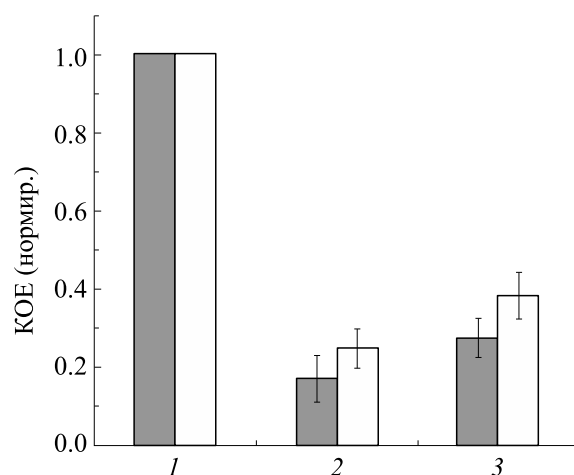


Рис. 5. Гистограммы КОЕ клеток *S. typhimurium*, взятых из растворов в присутствии эритрозина (темные столбики) и родамина С (светлые столбики): 1 – до облучения; 2 – после облучения лазерными импульсами, образцы КОЕ собраны непосредственно в зоне возбуждения; 3 – то же, образцы КОЕ собраны на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения. Параметры возбуждения: длина волны 532 нм, длительность каждого импульса 10 нс, частота следования импульсов 10 Гц, плотность мощности в фокусе линзы 15 МВт/см², продолжительность облучения 20 с.

сибилизаторами. КОЕ бактерий взятых непосредственно из зоны возбуждения (на рис. 5 обозначены цифрой 2) как в случае использования эритрозина, так и родамина С, заметно уменьшаются по сравнению с необлученным раствором. Цифрой 3 на рис. 5 обозначены КОЕ клеток, взятых из тех же растворов на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения. В эту область возбуждающий свет не проникал, и повреждение бактерий возможно исключительно ударными волнами. При увеличении дозы облучения или повышении плотности мощности излучения в фокусе линзы до 20 МВт/см² в образцах вообще не остается жизнеспособных бактерий.

Повреждение бактерий ударными волнами можно зарегистрировать методом ДРС. На рис. 2в представлены гистограммы ДРС облученных растворов *S. typhimurium* в присутствии родамина С. После облучения 73.2% частиц имеют радиус 0.414 мкм, 13.4% – 2.5 мкм и 11.1% – 0.07 мкм. Ударные волны разрушают не только большие кластеры бактерий, но и повреждают отдельные бактерии. На полученных методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изображениях бактерий после облучения (рис. 3в,г) видно, что линейный размер частиц сокращается на порядок вплоть до 0.05–0.1 мкм.

На рис. 6 показаны гистограммы ДРС растворами бактерий *S. aureus*. До облучения в присутствии эритрозина в растворе присутствуют части-

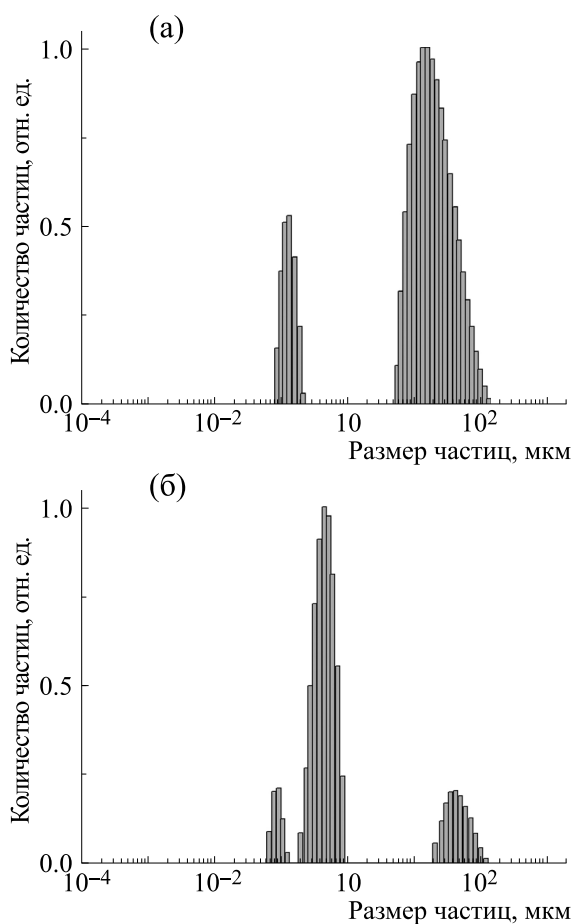


Рис. 6. Гистограмма распределения *Staphylococcus aureus* по размерам в физиологическом растворе до (а) и после (б) облучения импульсами света длины волны $\lambda = 532$ нм в присутствии эритрозина (0.25 ммоль/л).

цы в основном двух размеров – 84.1% частиц (рис. 6а) имеют размер примерно 4–5 мкм, и около 15.0% частиц – 0.9–1.0 мкм. Таким образом, до облучения в растворе стафилококки в основном объединены в гроздь, но имеются и одиночные бактерии.

После облучения растворов распределение *S. aureus* по размерам кардинально изменяется (рис. 6б). Примерно 84% частиц имеют эффективный гидродинамический радиус 0.447 мкм, около 12% рассеивающих частиц имеют радиус 2.2 мкм и около 4% – 0.09 мкм. Гроздь стафилококков в основном разрушаются, и кроме одиночных бактерий появляются мелкие рассеивающие объекты, которые, по-видимому, представляют собой фрагменты разрушенных бактерий. Эти предположения подтверждаются АСМ-изображениями. На АСМ-снимках до облучения бактерии представляли собой гроздь в основном из 12–15 единиц. После облучения гроздьев *S. aureus* в растворе практически не остается.

Чтобы выявить характер повреждений отдельных бактерий ударными волнами анализировались УФ спектры поглощения растворов до и после облучения. Обнаружено увеличение оптической плотности растворов на длине волны $\lambda = 260$ нм (максимум поглощения ДНК) от 0.01 до 0.20 и на длине волны $\lambda = 280$ нм (максимум поглощения белков) от 0.01 до 0.18, что свидетельствует о присутствии внутриклеточных компонентов в среде. Таким образом, в результате облучения стафилококков в присутствии красителей в растворе не только разрушаются гроздьи бактерий, но и происходит разрушение мембран отдельных клеток.

В растворе эритрозина непосредственно в зоне возбуждения бактерии дополнительно (кроме ударных волн) повреждаются действием АФК, а в растворе родамина С свой вклад в инактивацию бактерий дает локальная гипертермия клеток. Поэтому, выживаемость бактерий, взятых из зоны возбуждения, заметно ниже, чем на расстоянии 10 мм, где клетки повреждаются только ударными волнами (рис. 5).

При повреждении стафилококков прослеживаются те же закономерности, что и для клеток *S. typhimurium*. Заметим, что выживаемость стафилококков превышает выживаемость сальмонелл. Хорошо известно, что фотодинамическое повреждение грамотрицательных бактерий анионными сенсibilizаторами малоэффективно из-за более сложной структуры клеточной стенки у таких микроорганизмов по сравнению с грамположительными бактериями [26]. Однако, как видно из рис. 2–5, успешно инактивировать грамотрицательные бактерии можно с помощью ударных волн, используя для этого как анионные, так и катионные сенсibilizаторы. При этом совершенно не важно, связан ли сенсibilizатор с бактерией или нет.

Заметим, что повреждение бактерий теоретически возможно в результате безызлучательного переноса энергии с высоких электронно-возбужденных уровней сенсibilizаторов на молекулы окружения. После поглощения двух квантов света с длиной волны 532 нм ФС накапливает энергию около 5 эВ, что превышает энергию любой химической связи. Однако в работах [27, 28] было показано, что эффективность переноса энергии с высоких электронных уровней молекул красителей на молекулы окружения в бактериальных растворах очень низкая и этот канал инактивации бактерий можно не учитывать.

Воздействие на растворы с красителями светом высокой интенсивности может сопровождаться образованием радикалов. При исследовании кинетики и спектров наведенного поглощения в диапазоне 300–800 нм не обнаружено новых полос, ответственных за появление ради-

калов. Это свидетельствует об отсутствии в растворах активных фотопродуктов, потенциально способных инактивировать микроорганизмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм повреждения бактерий зависит от типа ФС и характера его взаимодействия с микроорганизмами.

Если ФС имеет большой квантовый выход в триплетное состояние, но не связывается с бактериальными клетками (в нашем случае эритрозин), то непосредственно в зоне облучения повреждение бактерий возможно в результате фотодинамического действия. При двухквантовом поглощении и заселении ВЭВС сенсibilизатора возможна инактивация организмов ударными волнами, образующимися при быстром локальном нагреве среды в результате безызлучательной релаксации ВЭВС.

Если ФС не генерируют химически активные формы кислорода, но связываются с клеточными стенками (в нашем случае родамин С), повреждение бактерий происходит либо при прямом перегреве клеток, либо в результате действия на них ударных волн. Оба этих механизма становятся эффективными при заселении ВЭВС молекул сенсibilизаторов.

Разумеется, при одновременном соблюдении двух условий, когда ФС прикрепляется к бактериям и генерирует АФК, все перечисленные механизмы могут иметь место. Однако эффективность фотодинамического механизма будет зависеть от содержания кислорода в облучаемой среде [29].

Наиболее эффективно бактерии в суспензиях инактивируются ударными волнами, которые генерируются при заселении ВЭВС молекул. Для этого требуется плотность мощности возбуждения выше 8–10 МВт/см². Ударные волны не только разрушают естественные образования бактерий (гроздь стафилококков) и конгломераты, возникающие при «слипаниии» бактерий при нейтрализации заряда внешней стенки, но и с высокой эффективностью разрушают стенки клеток. Ударные волны в растворах могут инактивировать клетки на большом удалении от зоны возбуждения. Данный механизм уничтожения бактерий в растворах может быть эффективным в случае недостаточного проникновения света или кислорода в среду. Полученные результаты могут быть полезны при разработке новых антибактериальных методов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации (проект № FSGU-2020-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. O'Neill (chair). *Review on antimicrobial resistance*. <http://amr-review.org/> (accessed 15 January 2015).
2. P. W. Taylor, P. D. Stapleton, and J. Luzio, *Drug Discov. Today*, **7**, 1086 (2002). DOI: 10.1016/s1359-6446(02)02498-4
3. C. A. Arias and B. E. Murray, *N. Engl. J. Med.* **360**, 439 (2009). DOI: 10.1056/NEJMp0804651
4. M. Wilson, *J. Photochem. Photobiol.* **3**, 412 (2004). DOI: 10.1039/b211266c
5. M. R. Hamblin, *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67 (2016). DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008
6. L. Huang, T. Dai, and M. R. Hamblin, *Methods Mol. Biol.* **635**, 155 (2010). DOI: 10.1007/978-1-60761-697-9_12
7. N. Kashef, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, *Nanophotonics* **6** (5), 853 (2017). DOI: 10.1515/nanoph-2016-0189
8. M.-J. Kim, *Food Control*. **82**, 205 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.040>
9. R. S. Adriele, *Antibiotics* **8** (4), 1 (2019). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040211>
10. F. Vatansever, W. de Melo, P. Avci, et al. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 955 (2013). DOI: 10.1111/1574-6976.12026
11. S. N. Letuta, U. G. Letuta, and S. N. Pashkevich, *Biophysics* **64** (4) 576 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919040092
12. O. Planas, N. Macia, M. Agut, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **138** (8), 2762 (2016). DOI: 10.1021/jacs.5b12704
13. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **163**, 232 (2016). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036
14. Y. Ito, D. Veysset, S. E. Kooi, et al., *Commun. Physics* **3**, 124 (2020). DOI: 10.1038/s42005-020-0394-3
15. A. G. Doukas and T. J. Flotte, *Ultrasound in Medicine & Biology* **22** (2), 151 (1996). DOI: 10.1016/0301-5629(95)02026-8
16. P. Sperber and A. Penzkofer, *Opt. Quantum. Electron.*, **18**, 381 (1986). DOI: 10.1007/BF02032565
17. S. Tobita, Y. Kaisu, H. Kobayashi, and I. Tanaka, *J. Chem. Phys.* **81** (7), 2962 (1984). DOI: 10.1063/1.448046
18. G. C. Orner and M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.* **32** (3) 407 (1975). DOI: 10.1016/0009-2614(75)85204-3

19. H.-B. Lin and M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.*, **48** (2), 251 (1977). DOI: 10.1016/0009-2614(77)80309-6
20. V. L. Ermolaev, *Russ. Chem. Rev.* **70**, 471 (2001). DOI: 10.1070/RC2001v070n06aBEH000657
21. C. Nagaoka, M. Fujita, T. Takemura, and H. Baba, *Chem. Phys. Lett.* **123** (6), 489 (1986). DOI: 10.1016/0009-2614(86)80048-3
22. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, and A. N. Nikiyan, *Russ. J. Phys. Chem. A* **95** (4), 848 (2021). DOI: 10.1134/S0036024421040142.
23. B. J. Gottenbos, *Antimicrob. Chomother.* **48** (1), 7 (2001). DOI: 10.1093/jac/48.1.7
24. M. J. Snare, F. E. Treloar, K. P. Ghiggino, and P. J. Thistlethwaite, *J. Photochem.* **18** (4), 335 (1982). DOI: 10.1016/0047-2670(82)87023-8
25. K. K. Rohatgi-Mukherjee, *Fundamentals of Photochemistry* (Wiley Eastern Ltd., New Delhi, Bangalore, Bombay, 1978). DOI: 10.1002/bbpc.19790830824
26. M. R. Hamblin and G. Jori *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications* (Royal Society of Chemistry, UK, 2011). DOI: 10.1039/9781849733083
27. R. P. Steer, *Can. J. Chem.* **95** (10), 1025 (2017). DOI: 10.1139/cjc-2017-0369
28. D. V. Dorofeev, S. N. Letuta, and D. E. Tsurko, *Russ. Chem. Bull.* **70**, 427 (2021). DOI: 10.1007/s11172-021-3104-8
29. F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, et al., *Crit. Rev. Microbiol.* **44** (5), 571 (2018). DOI: 10.1080/1040841X.2018.1467876

Mechanisms of Damage in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon Pulse Photoexcitation of Molecular Sensitizers

S.N. Letuta, A.T. Ishemgulov, A.N. Nikiyan, D. A. Razdobreev, L.V. Galaktionova, D.V. Dorofeev, and D.E. Tsurko

Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

This paper is dedicated to discussing the mechanisms of inactivation of bacterial planktonic cultures *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon excitation of molecular sensitizers with high-energy pulsed laser source at 10-ns pulse duration. It was shown that depending on the types of sensitizers and the mechanisms of sensitizer-bacterial interactions in suspensions, photodynamic inactivation mediated by reactive oxygen species and local hyperthermia of cells occur. At high power density excitation light (greater than 10 MW/cm²), the dominant mechanism of cell damage is cell destruction by shock waves as the results of rapid local heating of the suspension due to the light energy being transformed into heat by the sensitizers.

Keywords: molecular sensitizers, bacterial inactivation, photodynamic action, hyperthermia, shock waves