

## Фемтосекундная лазерная ИК-спектроскопия характеристических молекулярных колебаний бактерий в области 6 мкм

В. О. Компанец<sup>+</sup>, С. И. Кудряшов<sup>\*1)</sup>, Э. Р. Толордава<sup>\*×</sup>, С. Н. Шельгина<sup>\*</sup>, В. В. Соколова<sup>\*°</sup>, И. Н. Сараева<sup>\*</sup>,  
М. С. Ковалев<sup>∇</sup>, А. А. Ионин<sup>\*</sup>, С. В. Чекалин<sup>+</sup>

<sup>+</sup> Институт спектроскопии РАН, 108840 Троицк, Россия

<sup>\*</sup> Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>×</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, 123098 Москва, Россия

<sup>°</sup> Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119899 Москва, Россия

<sup>∇</sup> Московский государственный технический университет им. Н. Э. Баумана, 105005 Москва, Россия

Поступила в редакцию 4 февраля 2021 г.

После переработки 4 февраля 2021 г.

Принята к публикации 17 февраля 2021 г.

Исследованы спектры пропускания фемтосекундных лазерных импульсов среднего ИК-диапазона (5–6.6 мкм) субмонослоем бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* на кремниевой подложке в области характеристических полос поглощения белков и липидов, а также стационарные спектры после облучения. При облучении обнаружено обратимое “просветление” образцов в области характеристических полос поглощения бактерий и “синий” сдвиг этих полос, указывающий на разрыв водородных связей. Обсуждается возможность инактивации патогенных бактерий путем селективного ИК-лазерного денатурирования функциональных белков резонансным облучением низкой средней мощности.

DOI: 10.31857/S1234567821060021

1. Излучение среднего ИК-диапазона, традиционно используемое в методах термической и УФ обработки, рассматривается также в применении к инактивации патогенных бактерий [1, 2]. Одним из возможных путей ИК-инактивации бактерий является денатурирование функциональных белков (полипептидов) в результате разрушения водородных связей, придающих белкам вторичную и третичную структуру [2, 3]. Белки в клетках осуществляют важные метаболические функции, реализующиеся через активацию биокаталитических реакций, перенос электрона и конформационные превращения [4–7]. Поэтому миграция и релаксация энергии колебательно возбуждения в структуре белков определяют направления, скорости и эффективности вышеупомянутых процессов. Для их исследования в реальном масштабе времени методами сверхбыстрой спектроскопии [6, 7], а также для многофотонного колебательного возбуждения [5] используются субпикосекундные ( $\sim 10^2$  фс)-лазерные импульсы.

Модификация спектра ИК-поглощения олигомеров аминокислот (пептидов) и простых подобных

им молекул в водных растворах под действием фемтосекундных лазерных импульсов среднего ИК-диапазона в контексте трансформации вторичной структуры исследовалась в работах [6, 7] (более широкие и общие обзоры см. в [4, 8–10]). В ИК-областях вблизи 3 и 6 мкм измерялись дифференциальное поглощение и скорость внутримолекулярной релаксации для колебаний O–H, N–H и C–H, а также амидных колебаний C=O (тип I) и C–N (тип II), связанных с ангармонизмом высших колебательно-возбужденных состояний и вызванным им “красным” спектральным сдвигом полос поглощения [6]. Однако непосредственно в бактериях, где полосы амидных колебаний белков перекрываются с полосами аналогичных колебаний в липидах и других молекулах, оптические исследования до сих пор не проводились. Между тем, воздействие ИК излучения на такие сложные биологические системы, как бактерии, может иметь свою специфику из-за наличия в них системы водородных связей. Даже в простых молекулах воды отмечался “синий” спектральный сдвиг колебательных полос поглощения в результате изменения окружения O–H фрагментов из-за разрыва водородных связей под воздействием фемтосекундного

<sup>1)</sup>e-mail: kudryashovsi@lebedev.ru

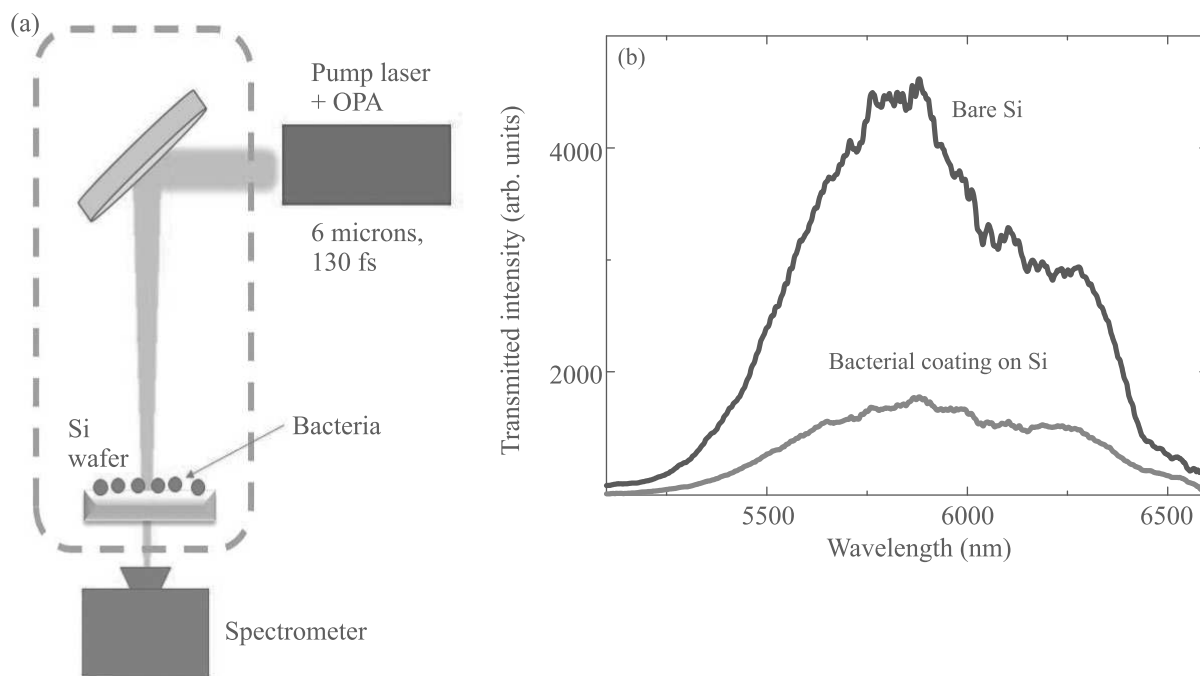


Рис. 1. (Цветной онлайн) (а) – Схематичная экспериментальная измерительная схема: ОПА – параметрический усилитель; (б) – типичные спектры прошедшего излучения ИК-УКИ для чистой кремниевой пластины и пластины с бактериальным покрытием при пиковой интенсивности на поверхности пластины  $5 \text{ ГВт/см}^2$  (режим “strong pump”)

ИК излучения [11]. Важно отметить, что в сложных белковых молекулах разрушение определенной критической доли водородных связей фактически означает их денатурацию, т.е. инактивацию их функции.

В настоящей работе для определения возможности инактивации бактерий по механизму селективного денатурирования белков экспериментально исследовано изменение ИК-поглощения образцов патогенных бактерий при их интенсивном колебательном возбуждении УКИ в области характеристических колебаний функциональных белков и липидов. Измерения проводились в ходе многоимпульсного воздействия при экспозиции в 20 с, а также в стационарном режиме после воздействия.

2. В наших экспериментах измерялись коэффициенты ИК-пропускания пластин кремния – чистой (контроль) и с нанесенными бактериями, установленными перед щелью ИК-спектрометра (рис. 1а). Бактерии изолятов культур золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*, SA) и синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*, PA), взятые из коллекции НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, в планктонной форме высаживались на p-легированных (фосфор,  $10^{17} \text{ см}^{-3}$ ) пластинах кремния толщиной 0.5 мм в неопасных следовых количествах в виде бактериального покрытия (субмонотель) с известными спек-

трами оптической плотности в ИК-диапазоне и возбуждались в области колебаний C–N и C=O колебаний амидо-групп ( $\approx 1500$  и  $1750 \text{ см}^{-1}$ , рис. 2).

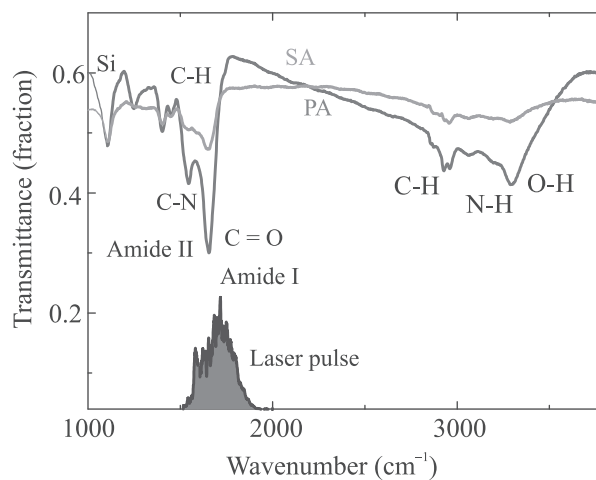


Рис. 2. (Цветной онлайн) Стационарные спектры пропускания бактериальных покрытий золотистого стафилококка (SA) и синегнойной палочки (PA). Для сравнения внизу показан спектр УКИ

Стационарные спектры оптической плотности бактериального покрытия в диапазоне 2.5–25 мкм ( $400\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ ) – за вычетом оптической плотности чи-

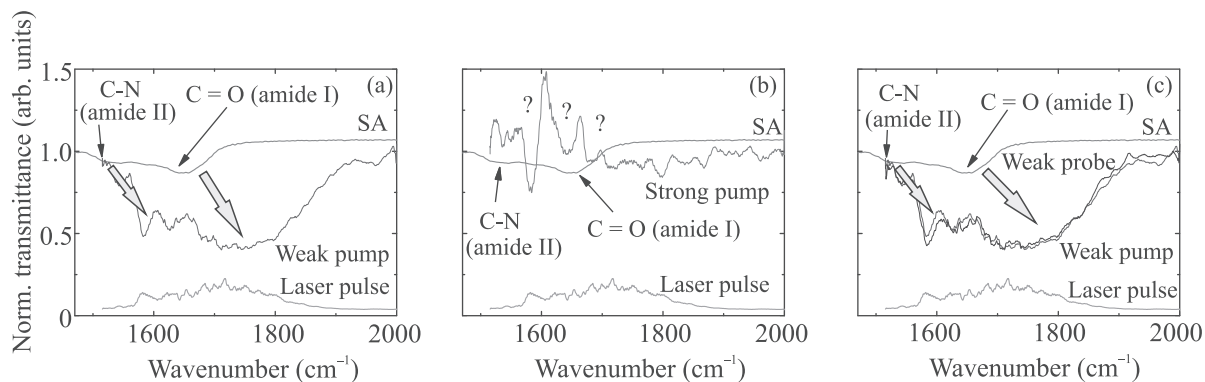


Рис. 3. (Цветной онлайн) Динамические спектры пропускания для бактериального покрытия золотистого стафилококка (SA) с характеристическими полосами (стационарный контрольный спектр для “нулевой интенсивности”) для различной пиковой интенсивности УКИ: (а) –  $0.3 \text{ ГВт/см}^2$  (свежий участок, weak pump); (б) –  $5 \text{ ГВт/см}^2$  (облучение участка в случае (а), strong pump), (с) –  $0.3 \text{ ГВт/см}^2$  (случай (а), weak pump) и  $0.3 \text{ ГВт/см}^2$  (зондирование участка в случае (б), weak probe). Для сравнения внизу показан спектр УКИ

стой кремниевой пластины – снимались с помощью фурье-ИК-спектрометра Vertex V-70 (Брукер).

При проведении экспериментов образец располагался перед входной щелью спектрометра по нормали к оптической оси излучения, сфокусированного на щель сферическим зеркалом с фокусным расстоянием  $150 \text{ мм}$ . Излучение лазерных импульсов среднего ИК-диапазона (центральная длина волны –  $5.8 \text{ мкм}$ , полуширина –  $0.6 \text{ мкм}$ ) с длительностью  $130 \text{ фс}$ , энергией в импульсе до  $2 \text{ мкДж}$  и частотой следования  $1 \text{ кГц}$  получалось преобразованием излучения титан-сапфирового лазера (Spitfire HP, Spectra-Physics, центральная длина волны –  $800 \text{ нм}$ , частота следования –  $1 \text{ кГц}$ , длительность импульса на полувысоте –  $50 \text{ фс}$ ) в параметрическом усилителе с генератором разностной частоты “OPA TOPAS-C + nDFG” (Light Conversion) [12]. Пиковая интенсивность УКИ на поверхности образца составляла  $5 \text{ ГВт/см}^2$  без фильтров и  $0.3 \text{ ГВт/см}^2$  после ослабления набором нейтральных металлизированных фильтров на подложках  $\text{BaF}_2$ . Полученные спектры прошедшего излучения УКИ для образцов с бактериями нормировались на спектр прошедшего излучения для контрольной чистой кремниевой пластины (рис. 1б), в итоге давая динамический спектр пропускания бактериального покрытия (рис. 3, 4).

**3.** Сравнение стационарных и динамических спектров пропускания бактериального покрытия золотистого стафилококка и синегнойной палочки для различных величин пиковой интенсивности падающих УКИ представлено на рис. 3, 4. На них видны характеристические полосы поглощения бактерий, связанные в области  $\approx 1650\text{--}1750 \text{ см}^{-1}$  с валентными  $\text{C}=\text{O}$  колебаниями эфирных и карбоксильных

групп жирных кислот липидного слоя мембраны бактерий, нуклеиновых кислот, амидных групп  $\alpha$ -,  $\beta$ - и антипараллельных вторичных структур белков [13]. Соседняя полоса  $\text{C-N}$  колебаний амидных групп в области около  $\approx 1520\text{--}1550 \text{ см}^{-1}$  связана преимущественно с белками. Далее в “красной” области располагаются  $\text{C-H}$  колебания углеводородного скелета ( $\approx 1450 \text{ см}^{-1}$ ), а также симметричные валентные  $\text{C}=\text{O}$  колебания свободных карбоксильных групп [13].

В случае обоих типов бактерий 20-секундное воздействие низкоинтенсивных УКИ (“weak pump”, пиковая интенсивность –  $0.3 \text{ ГВт/см}^2$ ) приводит к усилению характеристического поглощения в диапазоне  $1550\text{--}1900 \text{ см}^{-1}$  и выраженному “синему” спектральному сдвигу его полос на  $\approx 100 \text{ см}^{-1}$  (рис. 3а, 4а), который может быть связан с разрушением водородных связей и в случае воды достигать  $300 \text{ см}^{-1}$  [11]. При более интенсивной 20-секундной накачке (пиковая интенсивность –  $5 \text{ ГВт/см}^2$ ) того же участка бактериального покрытия наблюдалась сильная модификация спектра (кривые “strong pump” рис. 3б, 4б), не нашедшая пока объяснения. Однако эта модификация имеет обратимый характер, так как при повторном 20-секундном облучении того же участка бактериального покрытия наблюдалась сильная модификация спектра (кривые “weak probe”, рис. 3с, 4с, пиковая интенсивность –  $0.3 \text{ ГВт/см}^2$ ) хорошо воспроизводится спектр начальной низкоинтенсивной накачки на рис. 3а и 4а.

Последующая стационарная ИК-спектроскопия облученных образцов показывает заметную модификацию полос характеристического поглощения для покрытия золотистого стафилококка и практически отсутствие изменения для покрытия синегнойной па-

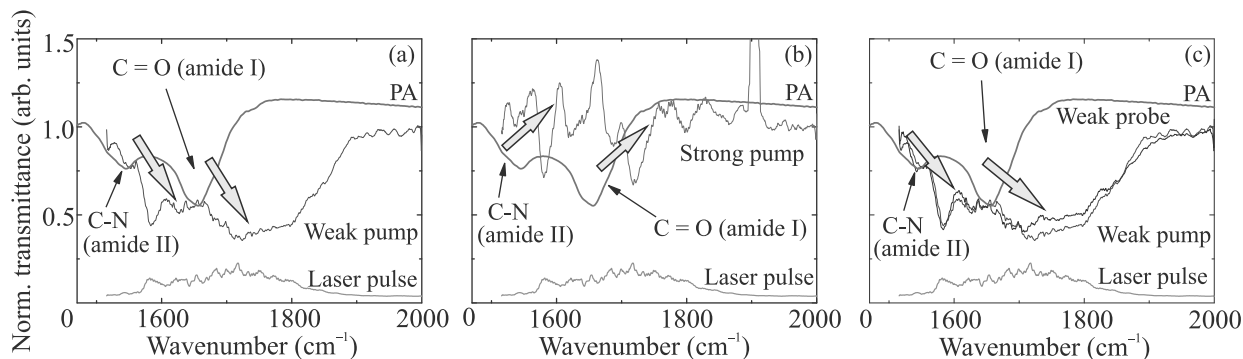


Рис. 4. (Цветной онлайн) Динамические спектры пропускания для бактериального покрытия синегнойной палочки (РА) с характеристическими полосами (стационарный контрольный спектр для “нулевой интенсивности”) для различной пиковой интенсивности УКИ: (а) – 0.3 ГВт/см<sup>2</sup> (свежий участок, weak pump); (б) – 5 ГВт/см<sup>2</sup> (после облучения в случае (а), strong pump), (с) – 0.3 ГВт/см<sup>2</sup> (случай (а), weak pump) и 0.3 ГВт/см<sup>2</sup> (после облучения в случае (б), weak probe). Для сравнения внизу показан спектр УКИ

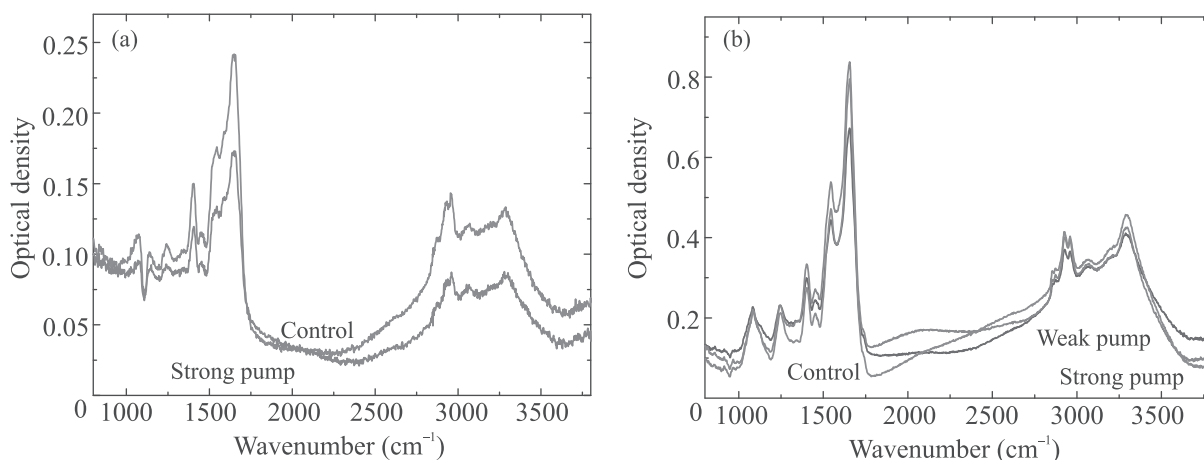


Рис. 5. (Цветной онлайн) Стационарные спектры оптической плотности для лазерно-облученных и необлученных (контрольных) бактериальных покрытий золотистого стафилококка ((а), SA) и синегнойной палочки ((б), РА) с характеристическими полосами поглощения в области 800–3800 см<sup>-1</sup>

лочки, причем в первом случае изменения имеют место в более широком диапазоне 1000–3800 см<sup>-1</sup> (рис. 5), чем относительно узкий диапазон лазерного воздействия – 1500–1900 см<sup>-1</sup> (рис. 2). Это может указывать на ожидаемый внутримолекулярный перенос энергии [4–12], пространственно расширяющий область воздействия лазерного излучения вне амидных групп. Детальные исследования причин изменений в спектрах облученных образцов и жизнеспособности облученных бактерий будут представлены в последующих работах, однако уже сейчас можно отметить, что наблюдаемая итоговая модификация химической структуры может указывать на лазерную инактивацию бактерий. Заметим, что предшествующие исследования стационарной ИК-обработки бактерий также показали значительный эффект инак-

тивации только в области 6 мкм при его отсутствии в областях 3 и 4.5 мкм [2].

Оценим характерные уровни интенсивности и средней мощности УКИ для инактивации использованных культур бактерий. Поскольку использованный в работе спектр лазерных УКИ с центральной длиной волны около 5.8 мкм (волновое число – 1700 см<sup>-1</sup>, рис. 1б) позволяет возбуждать только С=О (полоса В<sub>1</sub>) и С–N (полоса В<sub>2</sub>) колебания амидных групп белков, действующая интенсивность в каждом конкретном спектральном диапазоне отличается от пиковой интенсивности всего импульса  $I_0 \approx 5 \text{ ГВт/см}^2$  (рис. 2). В частности, действующая интенсивность  $I_{В_{1,2}}$  определяется интегрированием и нормировкой спектра УКИ в пределах соответствующих полос В<sub>1,2</sub>

$$I_{Bi} \approx I_0 \frac{\int f(\lambda) d\lambda}{\oint f(\lambda) d\lambda}. \quad (1)$$

Согласно численным оценкам, величины  $I_{B1,2}$  для золотистого стафилококка составляют 2.5 и 0.84 ГВт/см<sup>2</sup> – 50 и 17%, соответственно, а для синегнойной палочки – 2.4 и 0.35 ГВт/см<sup>2</sup> (48 и 7%, соответственно). Соответствующие средние мощности излучения при частоте следования импульсов 1 кГц лежат в диапазоне  $\sim 0.01$ –1 мВт, что позволяет говорить о воздействии лазерного излучения низкой мощности.

4. В заключение, многоимпульсное облучение субмонослойного покрытия из бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* на кремниевой подложке низкоинтенсивными ( $\sim 0.1$ –10 ГВт/см<sup>2</sup>) фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона (5–6.6 мкм) демонстрирует обратимое относительное “просветление” образцов для спектральных интервалов в области характеристических полос поглощения белков, нуклеотидов и липидов бактерий и “синий” сдвиг этих полос поглощения, потенциально указывающий на разрыв водородных связей. Значительные изменения в спектрах стационарного пропускания облученных образцов в среднем ИК-диапазоне позволяют предположить возможность инактивации патогенных бактерий путем селективного ИК-лазерного разрыва критического количества водородных связей и связанного с этим необратимого денатурирования функциональных органелл резонансным облучением низкой мощности.

1. D. Hamanaka, T. Uchino, N. Furuse, W. Han, and S. I. Tanaka, *Int. J. Food Microbiol.* **108**(2), 281 (2006).
2. A. A. Oduola, R. Bowie, S. A. Wilson, Z. Mohammadi Shad, and G. G. Atungulu, *J. Food Saf.* **40**(2), e12764 (2020).
3. В. Эллиот, Д. Эллиот, *Биохимия и молекулярная биология*, МАИК, Наука/Интерпериодика, М. (2002).
4. D. Laage, T. Elsaesser, and J. T. Hynes, *Chem. Rev.* **117**(16), 10694 (2017).
5. C. Kolano, J. Helbing, M. Kozinski, W. Sander, and P. Hamm, *Nature* **444**(7118), 469 (2006).
6. L. P. DeFlores, Z. Ganim, S. F. Ackley, H. S. Chung, and A. Tokmakoff, *J. Phys. Chem. B* **110**(38), 18973 (2006).
7. E. H. Backus, P. H. Nguyen, V. Botan, R. Pfister, A. Moretto, M. Crisma, C. Toniolo, G. Stock, and P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **112**(30), 9091 (2008).
8. V. N. Bagratashvili, V. S. Letokhov, A. A. Makarov, and E. A. Ryabov, *Multiple Photon Infrared Laser Photophysics and Photochemistry*, Harwood Acad. Publ., Chur (1985).
9. A. A. Макаров, А. Л. Малиновский, and Е. А. Рябов, *УФН* **182**(10), 1047 (2012).
10. E. T. Nibbering, H. Fidder, and E. Pines, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **56**, 337 (2005).
11. H. K. Nienhuys, S. Woutersen, R. A. van Santen, and H. J. Bakker, *J. Chem. Phys.* **111**(4), 1494 (1999).
12. В. О. Компанец, В. Н. Лохман, Д. Г. Пойдашев, С. В. Чекалин, Е. А. Рябов, *ЖЭТФ* **149**(4), 723 (2016).
13. K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, and G. J. Puppels, *Journal of Microbiological Methods* **51**(3), 255 (2002).