

## ИНФРАКРАСНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ЧЕРЕЗ ПОЛИЭТИЛЕНОВУЮ ПЛЕНКУ

С. Н. Шелыгина, И. Н. Сараева, Э. Р. Толордава,  
А. А. Настулявичус, С. И. Кудряшов

*В работе демонстрируется возможность инактивации патогенных бактерий культуры *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами среднего инфракрасного диапазона с длиной волны 6.04 мкм через полиэтиленовую пленку. Метод может быть применен в пищевой промышленности для обеззараживания упакованной продукции.*

**Ключевые слова:** инактивация бактерий, лазерное излучение среднего и дальнего ИК диапазона, упакованная продукция.

*Введение.* Инфракрасное излучение уже много десятилетий применяется в пищевой промышленности для различных целей: сушка, инактивация ферментов, пастеризация различных продуктов [1]. Инфракрасная обработка зарекомендовала себя для дезинфекции как бесконтактный и не содержащий химических реагентов метод, эффективный против бактерий, их спор, дрожжей и плесени как в жидких, так и в твердых пищевых продуктах и контактирующих с ними поверхностях [2]. Механизм инактивации патогенных микроорганизмов инфракрасным излучением обусловлен денатурацией белков бактериальной клетки, вызванной разрушением вторичной и третичной структуры белка в результате разрыва водородных связей [3, 4]. Радиационные свойства бактериальных клеток являются аддитивными свойствами входящих в их состав компонентов: белки имеют несколько полос поглощения в диапазонах 2.8–3.3 мкм, 6–9 мкм, жиры поглощают в диапазоне 3–4, 9–10 мкм, сахара – 2.7–3.7 мкм [5]. Значительное влияние на результат инактивации оказывает содержание воды в бактериальной клетке [6]. ИК-инактивация изучена в ряде работ [7–9]. В работе [8] показана эффективная инактивация микроорганизмов на поверхности зерна путем двухкратного облучения ИК

источником с широким спектром мощностью до 2 кВт по 37 секунд. В работе [9] экспериментально подтверждено, что источники ИК-излучения с несколькими выбранными длинами волн в области максимального поглощения жизненно важных компонентов клетки (5.8, 4.5, 3.2 мкм) эффективнее широкополосного ИК излучателя, излучающего в диапазоне 3–7 мкм, для инактивации патогенных микроорганизмов. Времена воздействия при этом составляли от 10 до 30 секунд.

В предыдущих работах нами была показана возможность инактивации патогенных бактерий лазерным излучением среднего ИК диапазона с длинами волн 3 и 6 мкм [10, 11]. В [10] продемонстрирована высокая эффективность инактивации бактерий культуры *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами с интенсивностями 1.1 ТВт/см<sup>2</sup> и 0.2 ТВт/см<sup>2</sup> для длин волн 3 и 6 мкм, соответственно. В работе [11] ИК-инактивация бактерий культуры *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами ИК диапазона с длинами волн 3 и 6 мкм изучена методами ИК фурье-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии. Электронная микроскопия показала целостность мембраны бактериальной клетки. При этом ИК фурье-спектры бактерий до и после облучения имеют различия по ширине и сдвиги по волновому числу у спектральных линий, соответствующим жизненно важным структурным элементам бактериальной клетки, свидетельствующие о изменениях конформаций белков, повреждений компонентов мембраны и нуклеиновых кислот. В обеих статьях показано более выраженное воздействие на бактерии излучения с длиной волны 6 мкм.

В настоящей работе изучена возможность инактивации патогенных бактерий *P. aeruginosa* ИК-излучением через полиэтиленовую пленку, что может выступать в качестве модели дезинфекции упакованной продукции или особо опасных бактерий. *P. aeruginosa* грамм-отрицательная аэробная палочковидная бактерия, возбудитель инфекций у человека. Данные исследования имеют практический интерес, так как не существует физических антибактериальных методов, за исключением стерилизации проникающей радиацией, позволяющих проводить обработку упакованной продукции.

*Экспериментальная часть.* Штаммы бактерий *P. aeruginosa* были получены из коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи. Ночную культуру (1 мл) центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость, затем добавляли 1 мл дистиллированной воды и полученный раствор встряхивали в течение 15 минут. Полученную суспензию разбавляли последовательными десятичными разведениями до 10<sup>5</sup> КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на миллилитр).

Капли полученной суспензии объемом 6 мкл наносили на подложки  $\text{CaF}_2$  толщиной 2 мм (коэффициент пропускания 90% в диапазоне 0.15–9.0 мкм).

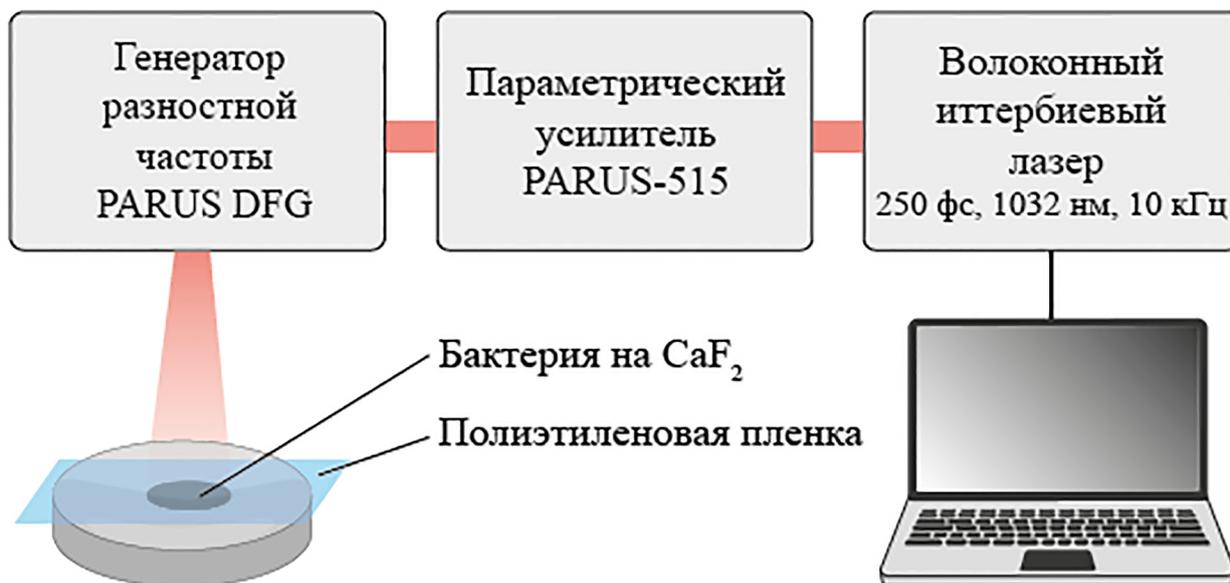


Рис. 1: Схема экспериментальной установки.

Штаммы *P. aeruginosa*, помещенные на подложки  $\text{CaF}_2$  и высушенные при комнатной температуре, подвергали воздействию фемтосекундных ( $\tau = 250$  фс) лазерных импульсов в ИК диапазоне с центральной длиной волны 6.04 мкм в течение  $t = 3, 5$  и 7 мин. ИК-импульсы были получены в результате генерации разностной частоты импульсами параметрической генерации, с накачкой лазером ТЕТА с активной средой на ионах иттербия (ООО «Авеста Проект», Москва, Россия) с центральной длиной волны 1032 нм и частотой  $f = 10$  кГц (рис. 1). Интенсивность лазерных импульсов для длины волны 6.04 мкм составила  $8 \cdot 10^6$  Вт/см<sup>2</sup>. Облучение проводилось несфокусированным лазерным пучком, диаметр которого на поверхности образца составлял 5 мм. Обработка проводилась для двух типов образцов: накрытых упаковочной полиэтиленовой пленкой и образцов без пленки. Была использована неокрашенная, нестабилизированная, неармированная полиэтиленовая пленка толщиной 15 мкм (Россия, ГОСТ 10354-82). В спектре пленки отсутствуют полосы поглощения в районе 6 мкм, что позволяет избежать влияния пленки на инактивацию бактерий (рис. 2). По причине наличия полос поглощения в районе 3 мкм лазерное излучение с длиной волны 3 мкм не было использовано. Температуру образцов контролировали с помощью тепловизора UTi120S (Uni-T, Дунгуань, Китай), диапазон температур  $-20$  °С – 400 °С, разре-

ние дисплея  $320 \times 240$  пикселей, пиксели тепловизионного изображения  $120 \times 90$ , размер пикселя 17 мкм. Средняя температура образцов не превышала комнатной температуры ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ), что исключает возможные тепловые эффекты при инактивации бактерий.

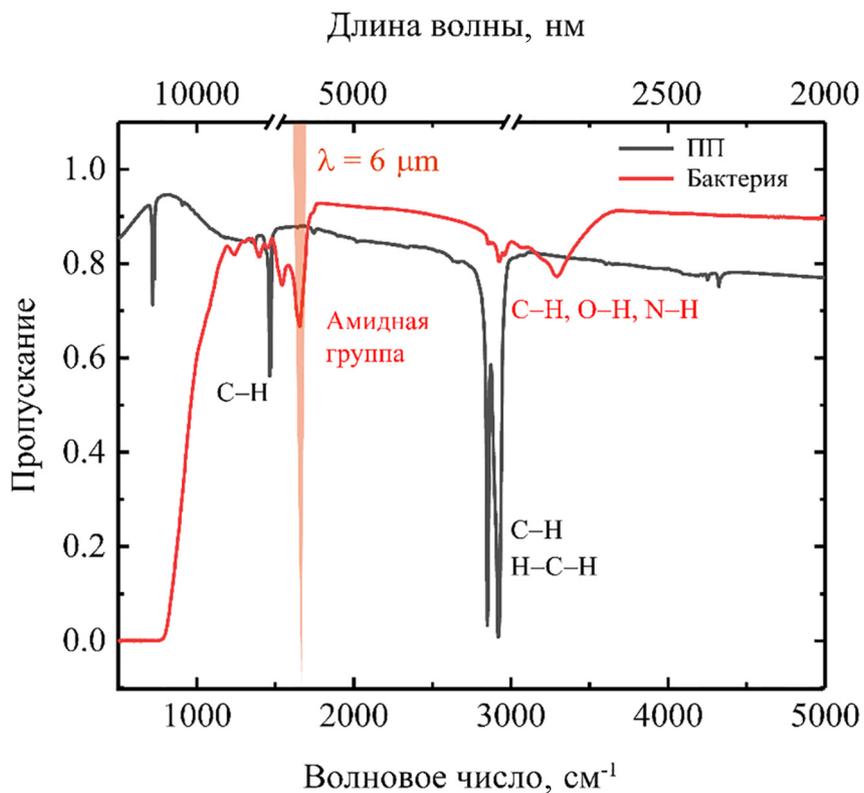


Рис. 2: ИК фурье-спектры пропускания полиэтиленовой пленки (ПП) и бактерий, высаженных на пластинку из  $\text{CaF}_2$ . Схематически показана линия лазера с длиной волны 6 мкм.

После лазерного воздействия все обработанные и контрольные образцы помещали в отдельные стерильные пробирки с физиологическим раствором и энергично встряхивали в течение 30 минут. Полученную суспензию помещали на твердую питательную среду и выдерживали в термостате в течение 24 часов при температуре  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Через 24 часа подсчитывали бактериальные колонии для определения количества КОЕ, которое затем пересчитывали в значения КОЕ/мл. Полученные значения сравнивались с контрольными образцами, которые не подвергались воздействию лазерного излучения.

Измерения спектральных характеристик методом ИК фурье-спектроскопии проводились с использованием 2-миллиметровой диафрагмы в диапазоне  $800\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  с использованием спектрометра Vertex V-70 (Bruker).

*Результаты и их обсуждение.* ИК-инактивация привела к частичной инактивации бактерий *P. aeruginosa*. Результаты анализа жизнеспособности данных бактерий показали зависящее от интенсивности снижение количества КОЕ/мл в образцах культуры, подвергнутых воздействию лазерного излучения с длиной волны 6.04 мкм (табл. 1). Наблюдаемое снижение значения КОЕ/мл показывает разницу примерно на один-два порядка для всех времен воздействия. Из табл. 1 видно, что количество КОЕ/мл растет с увеличением времени обработки. Данный удивительный результат наблюдается при многократном повторении эксперимента и является предметом наших дальнейших исследований. Аналогичный порядок инактивации наблюдается и для образцов, накрытых в процессе облучения полиэтиленовой пленкой.

Т а б л и ц а 1

*КОЕ/мл для бактерии *P. aeruginosa*: контроль (необработанные бактерии), после облучения лазерными импульсами с длиной волны 6.04 мкм под полиэтиленовой пленкой (ПП) и в ее отсутствии*

	Время экспозиции, мин	<i>P. aeruginosa</i> под ПП, КОЕ/мл	<i>P. aeruginosa</i> , КОЕ/мл
Контроль	–	$5 \cdot 10^4 \pm 3$	$5 \cdot 10^4 \pm 3$
После излучения с длиной волны 6.04 $\mu\text{m}$	3	$5 \cdot 10^2 \pm 3$	$1 \cdot 10^2 \pm 3$
	5	$1 \cdot 10^3 \pm 3$	$5 \cdot 10^3 \pm 3$
	7	$3 \cdot 10^3 \pm 3$	$4 \cdot 10^3 \pm 3$

Пищевая полиэтиленовая пленка (спектр представлен на рис. 2) в спектральном диапазоне от 5.8 мкм до 6.7 мкм, соответствующем полосам поглощения амидных групп белков бактериальной клетки, имеет пропускание  $\sim 90\%$ . На основании данного факта и результатов микробиологического исследования можно сделать вывод, что отстоящая от фокуса полиэтиленовая пленка не препятствует распространению несфокусированного фемтосекундного ИК-излучения с длиной волны 6.04 мкм и не влияет на результат инактивации. В то же время в спектральном диапазоне от 3.1 мкм до 3.7 мкм полиэтиленовая пленка имеет поглощение порядка 98%, что исключает использование для данного метода лазерных импульсов с длиной волны 3 мкм, которые являются эффективными для инактивации микроорганизмов за счет высокого поглощения C–H связями молекул бактериальной клетки.

*Заключение.* В настоящей работе продемонстрирована возможность бесконтактной инактивации патогенных бактерий несфокусированным фемтосекундным лазерным из-

лучением с длиной волны 6.04 мкм через полиэтиленовую пленку. Полиэтиленовая пленка обладает пропусканием порядка 90% в спектральном диапазоне 5.8–6.7 мкм и не препятствует распространению излучения с длиной волны 6.04 мкм. Инактивация патогенных бактерий осуществляется за счет поглощения излучения амидными группами белков бактериальной клетки, сопровождающегося разрывом водородных связей и разрушением вторичной и третичной структуры белка. Данный метод инактивации имеет потенциал применения в пищевой промышленности для обеззараживания упакованной продукции, а в медицине – для инактивации особо опасных бактерий. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию параметров облучения для увеличения скорости процесса.

Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2022-1205).

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] L. Tyagi, G. P. Sharma, R. C. Verma, et al., *Int. J. Chem. Stud.* **8**(3), 327 (2020). DOI: 10.22271/chemi.2020.v8.i3e.9248.
- [2] C. Sandu, *Biotechnology progress* **2**(3), 109 (1986). DOI: 10.1002/btpr.5420020305.
- [3] D. C. Elliott and E. W. Elliott, *Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. (Oxford University Press, 2001).
- [4] K. Krishnamurthy, J. C. Tewari, J. Irudayaraj, A. Demirci, *Food and Bioprocess Technol.* **3**, 93 (2010). DOI: 10.1007/s11947-008-0084-8.
- [5] G. Yadav, N. Gupta, M. Sood, et al., *The Pharma Innovation Journal* **9**(2), 142 (2020).
- [6] D. Hamanaka, T. Uchino, N. Furuse, et al., *Int. J. Food Microbiol.* **108**(2), 281 (2006). DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.019.
- [7] V. Trivittayasil, F. Tanaka, T. Uchino, *Journal of Food Engineering* **104**, 565 (2011). DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.01.018.
- [8] T. Uchino, D. Hamanaka, W. Hu, *Proceedings of Intl. Workshop Agricultural Engineering and Agro-Products Processing Toward Mechanization and Modernization in Agriculture and Rural areas* (2000).
- [9] A. A. Oduola, R. Bowie, S. A. Wilson, et al., *Journal of Food Safety* **40**(2), e12764 (2020). DOI: 10.1111/jfs.12764.

- [10] V. Kompanets, S. Shelygina, E. Tolordava, et al., Biomedical Optics Express **12**(10), 6317 (2021). DOI: 10.1364/BOE.434969.
- [11] I. Saraeva, E. Tolordava, S. Sheligyna, et al., International Journal of Molecular Sciences **24**(6), 5119 (2023). DOI: 10.3390/ijms24065119.

Поступила в редакцию 22 декабря 2022 г.

После доработки 30 августа 2023 г.

Принята к публикации 31 августа 2023 г.