Письма в ЖЭТФ, том 113, вып. 6, с. 365 – 369 © 2021 г. 25 марта

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

В. О. Компанец[+], *С. И. Кудряшов*[*1)], *Э. Р. Толордава*[*×], *С. Н. Шелыгина*[*], *В. В. Соколова*[*○], *И. Н. Сараева*[*], *М. С. Ковалев*[∇], *А. А. Ионин*[*], *С. В. Чекалин*[+]

[+]*Институт спектроскопии РАН, 108840 Троицк, Россия*

[*]*Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН, 119991 Москва, Россия*

[×]*Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, 123098 Москва, Россия*

[○]*Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119899 Москва, Россия*

[∇]*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 колебательного 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 подобным 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

1)e-mail: kudryashovsi@lebedev.ru

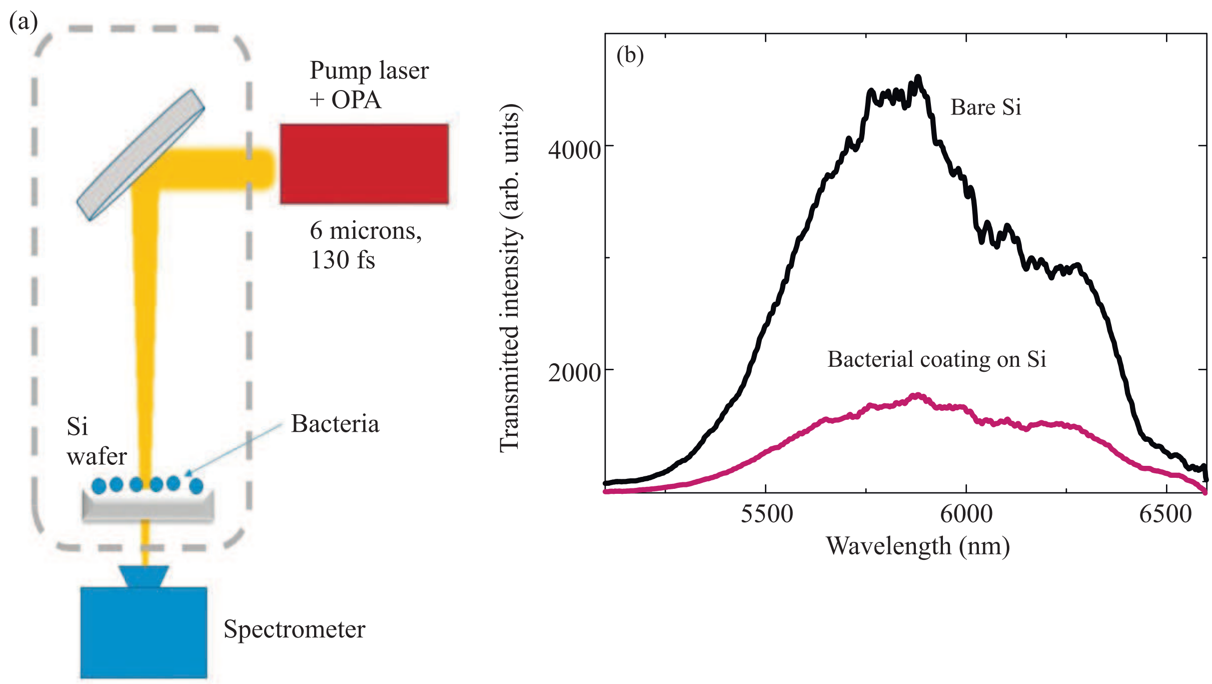

Рис. 1. (Цветной онлайн) (a) – Схематичная экспериментальная измерительная схема: OPA – параметрический усилитель; (b) – типичные спектры прошедшего излучения ИК-УКИ для чистой кремниевой пластины и пластины с бактериальным покрытием при пиковой интенсивности на поверхности пластины 5 ГВт/см^2 (режим “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, установленных перед щелью ИК-спектрометра (рис. 1a). 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 n-легированных (фосфор, 10^{17} см$^{-3}$) пластинах кремния толщиной 0.5 мм в неопасных следовых количествах в виде бактериального покрытия (субмонослоя) с известными спектрами оптической плотности в ИК-диапазоне и возбуждались в области колебаний C–N и C = O колебаний амидо-групп (≈ 1500 и 1750 см$^{-1}$, рис. 2).

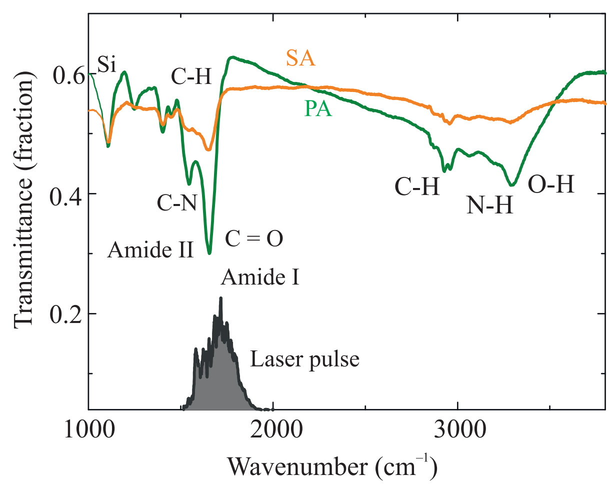

Рис. 2. (Цветной онлайн) Стационарные спектры пропускания бактериальных покрытий золотистого стафилококка (SA) и синегнойной палочки (PA). Для сравнения внизу показан спектр УКИ

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

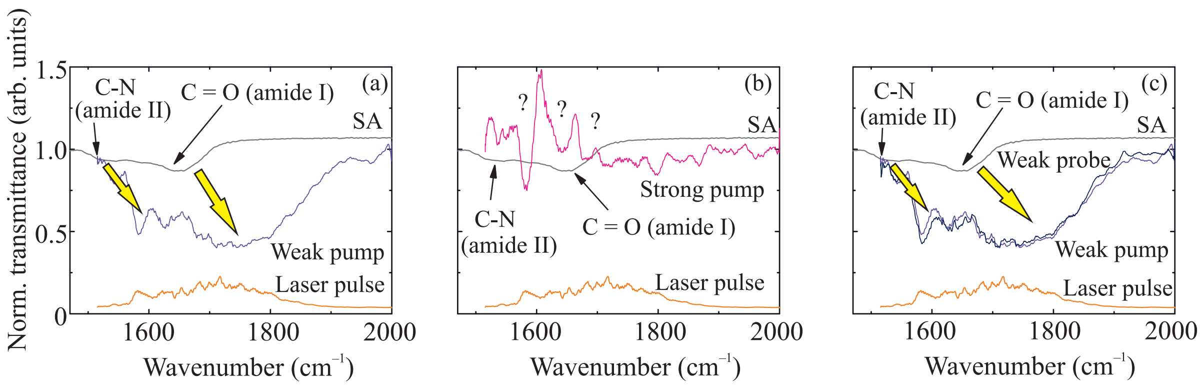

Рис. 3. (Цветной онлайн) Динамические спектры пропускания для бактериального покрытия золотистого стафилококка (SA) с характеристическими полосами (стационарный контрольный спектр для "нулевой интенсивности") для различной пиковой интенсивности УКИ: (a) – 0.3 ГВт/см^2 (свежий участок, weak pump); (b) – 5 ГВт/см^2 (облучение участка в случае (a), strong pump), (c) – 0.3 ГВт/см^2 (случай (a), weak pump) и 0.3 ГВт/см^2 (зондирование участка в случае (b), 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 мм. Излучение лазерных импульсов среднего ИК-диапазона (центральная длина волны – 5.8 мкм, полуширина – 0.6 мкм) с длительностью 130 фс, энергией в импульсе до 2 мкДж и частотой следования 1 кГц получалось преобразованием излучения титан-сапфирового лазера (Spitfire HP, Spectra-Physics, центральная длина волны – 800 нм, частота следования – 1 кГц, длительность импульса на полувысоте – 50 фс) в параметрическом усилителе с генератором разностной частоты "OPA TOPAS-C + nDFG" (Light Conversion) [12]. Пиковая интенсивность УКИ на поверхности образца составляла 5 ГВт/см^2 без фильтров и 0.3 ГВт/см^2 после ослабления набором нейтральных металлизированных фильтров на подложках BaF_2. Полученные спектры прошедшего излучения УКИ для образцов с бактериями нормировались на спектр прошедшего излучения для контрольной чистой кремниевой пластины (рис. 1b), 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 $\approx 1650-1750$ см$^{-1}$ с валентными C = O колебаниями эфирных и карбоксильных групп жирных кислот липидного слоя мембраны бактерий, нуклеиновых кислот, амидных групп α-, β- и антипараллельных вторичных структур белков [13]. Соседняя полоса C-N колебаний амидных групп в области около $\approx 1520-1550$ см$^{-1}$ связана преимущественно с белками. Далее в "красной" области располагаются C–H колебания углеводородного скелета (≈ 1450 см$^{-1}$), а также симметричные валентные C = O колебания свободных карбоксильных групп [13].

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

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

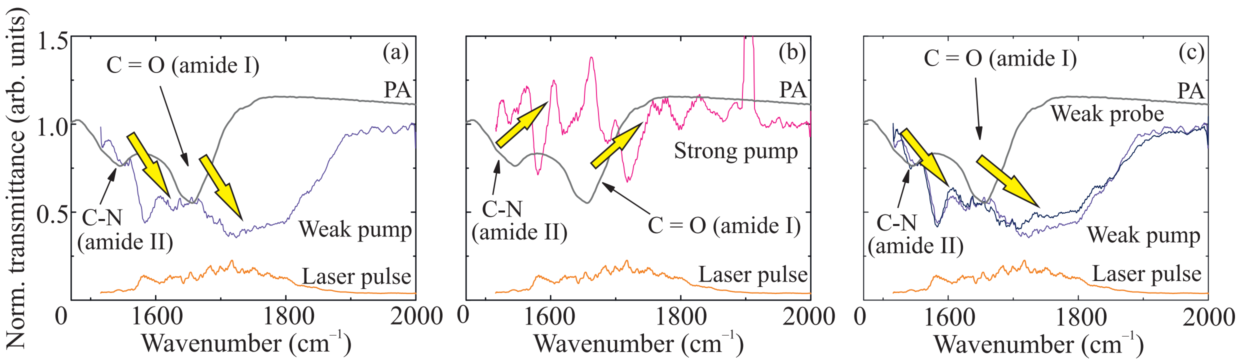

Рис. 4. (Цветной онлайн) Динамические спектры пропускания для бактериального покрытия синегнойной палочки (PA) с характеристическими полосами (стационарный контрольный спектр для "нулевой интенсивности") для различной пиковой интенсивности УКИ: (a) – 0.3 ГВт/см^2 (свежий участок, weak pump); (b) – 5 ГВт/см^2 (после облучения в случае (a), strong pump), (c) – 0.3 ГВт/см^2 (случай (a), weak pump) и 0.3 ГВт/см^2 (после облучения в случае (b), weak probe). Для сравнения внизу показан спектр УКИ

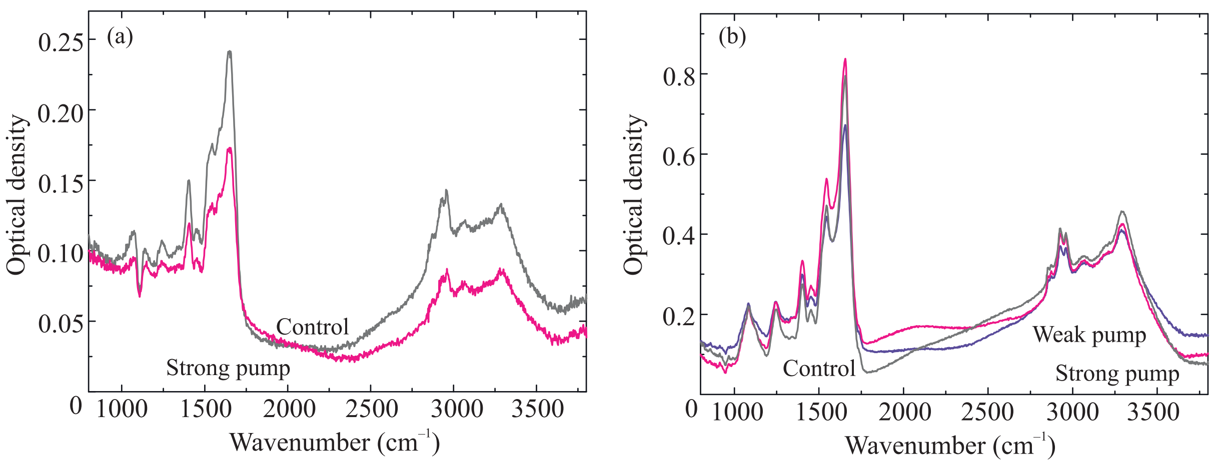

Рис. 5. (Цветной онлайн) Стационарные спектры оптической плотности для лазерно-облученных и необлученных (контрольных) бактериальных покрытий золотистого стафилококка ((a), SA) и синегнойной палочки ((b), PA) с характеристическими полосами поглощения в области 800–3800 см$^{-1}$

лочки, причем в первом случае изменения имеют место в более широком диапазоне 1000–3800 см$^{-1}$ (рис. 5), чем относительно узкий диапазон лазерного воздействия – 1500–1900 см$^{-1}$ (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 инактивации 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$^{-1}$, рис. 1b) позволяет возбуждать только C = O (полоса B_1) и C–N (полоса B_2) колебания амидных групп белков, действующая интенсивность в каждом конкретном спектральном диапазоне отличается от пиковой интенсивности всего импульса $I_0 \approx 5$ ГВт/см^2 (рис. 2). В частности, действующая интенсивность $I_{B_{1,2}}$ определяется интегрированием и нормировкой спектра УКИ в пределах соответствующих полос $B_{1,2}$

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

Согласно численным оценкам, величины $I_{\mathrm{B}_{1,2}}$ для золотистого стафилококка составляют 2.5 и 0.84 ГВт/см^2 – 50 и 17 %, соответственно, а для синегнойной палочки – 2.4 и 0.35 ГВт/см^2 (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^2) 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. А. А. 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).