

ИНАКТИВАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НАНОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ МОЩНОСТИ

© 2019 г. С.Н. Летуа, У.Г. Летуа, С.Н. Пашкевич

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

E-mail: ppsnya@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.04.2019 г.

После доработки 26.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Представлены результаты исследования фотоинактивации бактерий при возбуждении сенсibilизаторов наносекундными лазерными импульсами плотностью мощности 1–30 МВт/см². Обсуждается необратимое повреждение живых клеток ударными волнами, образующимися при возникновении и схлопывании пузырьков пара в локально разогретых микрообластях среды. Локальный нагрев среды осуществлялся за счет тепловыделения при безызлучательной релаксации высоких электронных состояний молекул сенсibilизаторов.

Ключевые слова: фотоинактивация бактерий, высоковозбужденные электронные состояния молекул, локальный нагрев, акустические волны.

DOI: 10.1134/S0006302919040112

Количество штаммов, вырабатывающих устойчивость к действию традиционных антимикробных препаратов, ежегодно увеличивается (см. обзор [1] и приведенные там ссылки). Поэтому требуется непрерывно разрабатывать новые или модернизировать существующие неинвазивные и нетоксичные противомикробные стратегии.

Эффективный способ воздействия на живые микроорганизмы – фотодинамическая обработка [2–6]. В настоящее время установлены основные механизмы фотодинамического действия и определена роль в них активных форм кислорода [7–10]. Однако поиск путей модификации фотодинамического воздействия на микроорганизмы продолжается. Одна из возможных модификаций фотодинамического действия – переход от непрерывного низкоинтенсивного возбуждения фотосенсibilизаторов (ФС) к их возбуждению мощными импульсами наносекундной длительности. Перспективы повышения эффективности инактивации микроорганизмов при таком возбуждении связаны с физико-химическими процессами в среде, инициированными релаксацией высоковозбужденных электронных состояний (ВВЭС) молекул ФС. В перечне таких процессов – безызлуча-

тельный перенос энергии с ВВЭС фотосенсibilизаторов на окружение, фотохимические реакции и фототермическая сенсibilизация [11–16].

В настоящей работе представлены результаты исследования фототермически сенсibilизированной инактивации бактерий при безызлучательной релаксации ВВЭС ФС. Высоковольтные состояния ФС заселялись методом двухквантового ступенчатого возбуждения через нижние электронно-возбужденные уровни. Обсуждается механизм необратимого механического повреждения живых клеток ударными волнами, возникающими при формировании и схлопывании пузырьков пара в локально разогретых микрообластях среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали суточные агаровые (LB-agar, Sigma Aldrich, США) культуры клеток *Escherichia coli* (штамм K12TG1) и *Bacillus subtilis* (штамм 534). Для облучения бактерии переносили в физиологический раствор (0,85%-й водный раствор NaCl). Плотность полученной суспензии стандартизировали фотометрически на спектрофлуориметре CM2203 (SOLAR, Минск, Белоруссия), длина волны 620 нм; оптическая плотность составляла $D = 0,61 \pm 0,01$ отн. ед. Для оценки выживаемости бактерий до и по-

Сокращения: ФС – фотосенсibilизатор, ВВЭС – высоковозбужденные электронные состояния, КОЕ – колониеобразующие единицы.

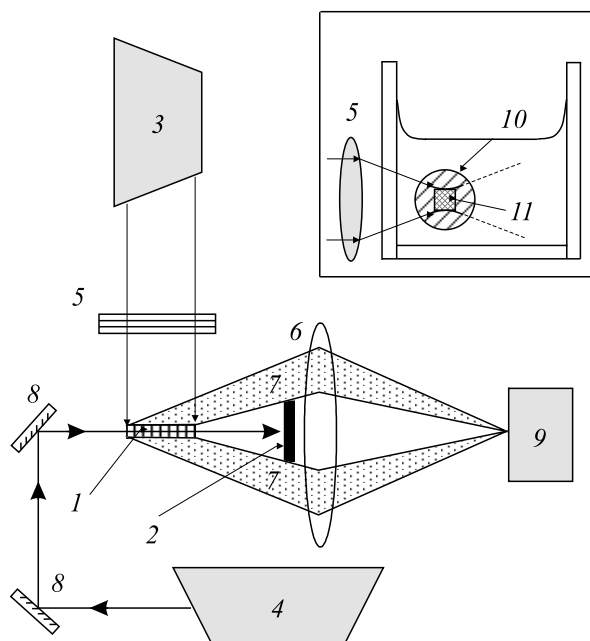


Рис. 1. Оптическая схема установки: 1 – зона возбуждения и зондирования в образце (кювета не показана); 2 – непрозрачный экран; 3 – импульсный YAG-Nd лазер, 4 – непрерывный He-Ne-лазер, 5 – цилиндрическая линза, 6 – сферическая линза, 7 – рассеянный образцом свет; 8 – поворотное зеркало, 9 – монохроматор. На врезке – кювета и лучи в сечении, перпендикулярном зондирующему лучу: 5 – цилиндрическая линза; 10 – зондирующий луч; 11 – зона возбуждения.

сле облучения видимым светом в присутствии ФС применяли метод подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) [17]. Количество КОЕ определяли через 16 ч роста на LB-агаре при температуре 37°C. КОЕ до облучения и добавления красителя составляло $(25,0 \pm 4,4) \cdot 10^6/\text{мл}$ для *E. coli* и $(21,0 \pm 2,3) \cdot 10^6/\text{мл}$ для *B. subtilis*.

В качестве ФС использовали органические красители-анионы эритрозин и эозин, а также краситель-катион родамин 6Ж.

Для инактивации бактерий, изучения кинетики светорассеяния, флуоресценции и замедленной флуоресценции в растворах использовали оптическую схему, показанную на рис. 1.

Молекулы ФС возбуждали излучением второй гармоники твердотельного лазера на YAG:Nd (рис. 1а, 3) на длине волны $\lambda = 532$ нм при длительности импульсов 15 нс. При регистрации кривых светорассеяния, флуоресценции и замедленной флуоресценции применяли режим одиночных импульсов, а для инактивации микроорганизмов – импульсно-периодический режим на частоте 10 Гц.

С помощью цилиндрической линзы (рис. 1, 5) в кювете 10×10 мм с исследуемым раствором в перетяжке лазерного пучка формировали узкую протяженную ($0,3 \times 10$ мм²) зону возбуждения (1 на рис. 1 и 11 на врезке). Площадь пятна в фокусе предварительно определяли по следу на тер-

мочувствительной бумаге. Вдоль перетяжки пропускали зондирующий луч маломощного (менее 1 мВт) He-Ne-лазера (4 на рис. 1 и 10 на врезке) с сечением ~ 1 мм. Нерассеянную часть этого луча блокировали трехмиллиметровым экраном (рис. 1, 2) в непосредственной близости от линзы (рис. 1, 6), с помощью которой рассеянное излучение собиралось на входной щели монохроматора (рис. 1, 9).

Энергию возбуждающих лазерных импульсов измеряли дозиметром FieldMaster (Coherent, США), она менялась в диапазоне 0,5–22,5 мДж, что при указанных длительности импульса и площади пятна соответствует диапазонам плотности мощности 1–50 МВт/см² и флюенсу 0,02–0,75 Дж/см².

Для фотоинактивации бактерий зондирующий луч выключали и раствор с микроорганизмами при непрерывном перемешивании импульсно-периодически облучали в течение заданного времени (от 1 до 20 мин) с плотностью мощности в перетяжке свыше 10 МВт/см².

В контрольных экспериментах исследуемые растворы бактерий с красителями облучали импульсами с $P < 1$ МВт/см², а эквивалентность дозы, приходящейся на объем кюветы, обеспечивали соответствующим увеличением времени облучения.

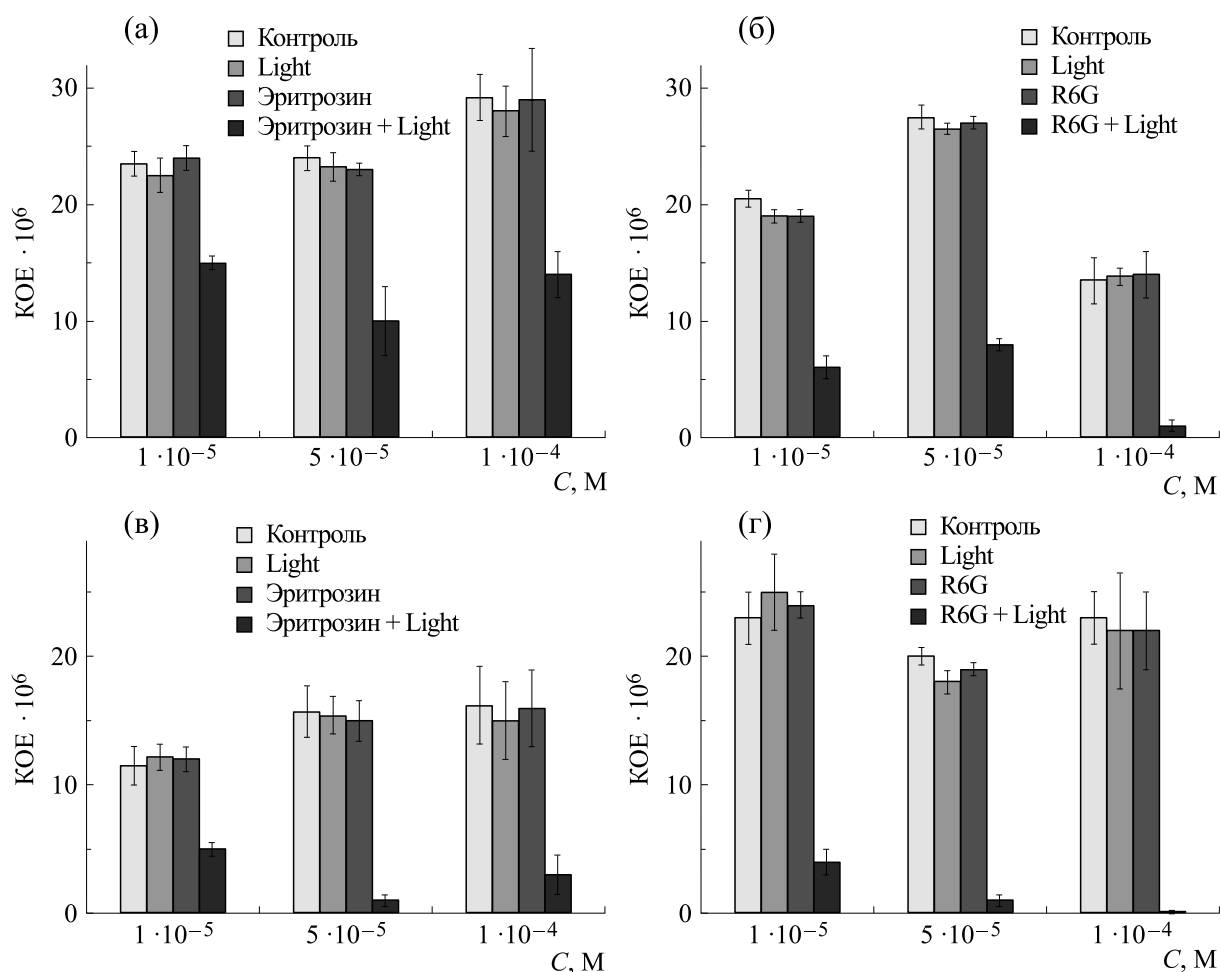


Рис. 2. Гистограммы КОЕ клеток *Escherichia coli* (а, б) и *Bacillus subtilis* (в, г) до и после облучения растворов светом длины волны $\lambda = 532$ нм и плотности мощности 20 МВт/см² при разных концентрациях красителей — эритрозина (а, в) и родамина 6Ж (б, г).

Информацию о релаксации возбужденных состояний ФС получали по кинетике их замедленной флуоресценции и фосфоресценции на соответствующих длинах волн. При этом зондирующий луч выключали, а блокирующий экран удаляли.

Кинетику светорассеяния изучали в моноимпульсном режиме работы возбуждающего лазера и плотности мощности свыше 20–30 МВт/см² (флюенс 0,30–0,45 Дж/см²).

Эксперименты проводили при нормальном атмосферном давлении и комнатной температуре.

Кинетические кривые рассеянного света и длительной люминесценции измеряли с помощью фотоэлектронного умножителя (не показан) через монохроматор МДР-41 (рис. 1, 9). Синхронизацию запуска лазера и регистрирующей системы, а также сбор, накопление и обработку сигналов проводили в автоматическом режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фотоинактивация бактерий. Для каждой концентрации ФС существует определенное значение плотности мощности возбуждающего света, при которой насыщается заселенность их триплетных состояний, достигается предельно возможный уровень генерации активных форм кислорода в среде и, следовательно, максимальная эффективность фотодинамического действия. Однако экспериментально установлено, что при дальнейшем увеличении интенсивности возбуждающего света эффективность инактивации бактерий заметно возрастает.

На рис. 2 представлены гистограммы КОЕ клеток *Escherichia coli* (рис. 2а, 2б) и *Bacillus subtilis* (рис. 2в, 2г) до и после импульсного облучения ФС светом с длиной волны $\lambda = 532$ нм и плотностью мощности 20 МВт/см² при различной концентрации красителей в растворе. Видно, что при облучении растворов импульсами большой плот-

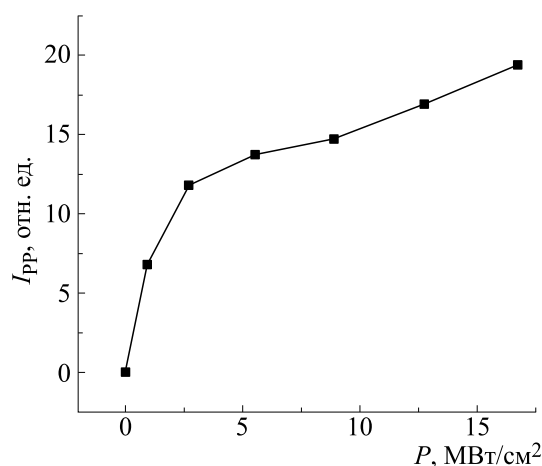


Рис. 3. Зависимость интенсивности фосфоресценции эозина ($C = 0,1$ мМ) в физиологическом растворе от плотности мощности возбуждающего излучения с длиной волны $\lambda = 532$ нм.

ности мощности и в присутствии фотодинамически активных ксантовых красителей (показано на примере эритрозина), и «нефотодинамического» красителя родамина 6Ж, бактерии инактивируются очень эффективно. В контрольных экспериментах при облучении этих же растворов равной дозой импульсного лазерного излучения низкой интенсивности ($P < 1$ МВт/см²) в присутствии ксантовых красителей снижение выживаемости бактерий не превышало 10%, а родамин 6Ж не оказывал влияния на жизнеспособность бактерий. Облучение бактерий без ФС в условиях наших экспериментов не сказывалось на их жизнеспособности.

Использованные красители по-разному взаимодействуют с бактериями. Известно, что при фотодинамических процессах основная функция ФС — генерация активных форм кислорода, индуцирующих окислительные деструктивные процессы в среде [18–20]. Ксантовые сенситизаторы обладают большим квантовым выходом в триплетное состояние и с высокой эффективностью генерируют синглетный кислород [21–26]. При этом экспериментально обнаружено, что в растворах с эозином, который имеет выход в триплетное состояние почти на 30% меньше, чем эритрозин, повреждение бактерий не меньше, чем в растворах с эритрозином. Еще менее вероятно фотодинамическое действие родамина 6Ж. В физиологическом растворе этот краситель имеет выход в триплетное состояние, равный всего 0,01, и практически не производит активные формы кислорода, но его инактивирующее действие оказалось не меньше, чем у ксантовых красителей.

Из представленных гистограмм видно, что с ростом концентрации красителей в растворе эффективность повреждения бактерий возрастает.

Следует отметить, что среднеобъемное повышение температуры раствора с бактериями при выбранных условиях облучения не превышает 3°C, и полученные результаты нельзя объяснить гипертермией микроорганизмов.

Таким образом, фотоинактивация клеток *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* при большой плотности мощности возбуждения ФС не может быть объяснена только фотодинамическим действием, токсичностью ФС или повышением среднеобъемной температуры раствора.

Заселение ВВЭС молекул. Для интерпретации представленных результатов необходимо принять во внимание особенности взаимодействия ФС с полем внешнего излучения высокой плотности мощности. При таком воздействии на молекулы за счет ступенчатого двухквантового поглощения через нижние электронно-возбужденные уровни заселяются их ВВЭС. В ходе энергообмена с окружением при дезактивации ВВЭС молекул «включаются» физико-химические процессы, которые не проявляются при низкоинтенсивном возбуждении ФС. Так, при интенсивной диссипации энергии в поле мощной волны имеет место локальный нагрев среды [27]. Если температура локального разогрева превышает температуру кипения растворителя, то возможно образование микропузырьков пара, формирование и схлопывание которых, подобно процессу кавитации, порождает ударные волны, повреждающие бактерии.

Эффективность заселения ВВЭС молекул красителей в наших экспериментах подтверждается зависимостью (рис. 3) интегральной интенсивности фосфоресценции эозина ($C = 0,1$ мМ) в физиологическом растворе от плотности мощности возбуждающего излучения длины волны $\lambda = 532$ нм. При увеличении мощности возбужда-

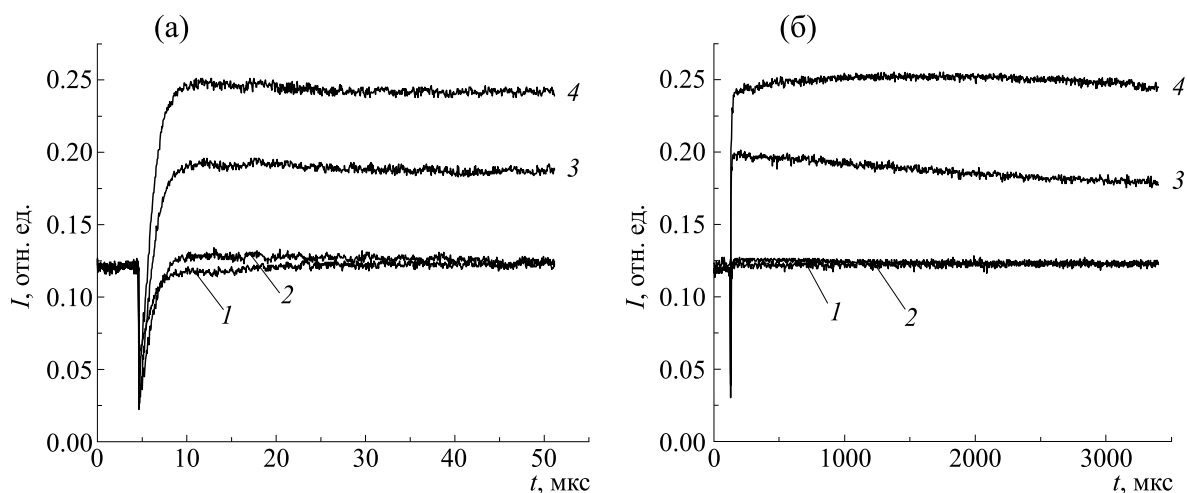


Рис. 4. Кинетические кривые рассеяния луча He–Ne-лазера, проходящего через физиологический раствор, окрашенный эритрозин, при разных плотностях мощности излучения лазера на *YAG:Nd*, возбуждающего молекулы красителя: 1 – 5 МВт/см², 2 – 20 МВт/см², 3 – 25 МВт/см², 4 – 30 МВт/см².

ющего света интенсивность флуоресценции красителя очень быстро нарастает, достигая насыщения (участок 1–5 МВт/см² на рис. 3), 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 флуоресценции эозина вновь заметно увеличивается.

Экспериментально и теоретически показано [28,29], что это вызвано более эффективным заселением триплетных состояний через высокие синглетные уровни и указывает на двухквантовый характер образования триплетных состояний молекул в результате последовательных переходов $S_1 \rightarrow S_n \rightarrow T_m \rightarrow T_1$. Заселение ВВЭС молекул красителей при возбуждении лазерным излучением плотности мощности 10–30 МВт/см² продемонстрировано также в работах [30,31].

Релаксация ВВЭС молекул. Релаксация высоковозбужденных синглетных состояний молекул возможна по следующим каналам:

- излучение (флуоресценция $S_n \rightarrow S_i$ или $T_m \rightarrow T_j$);
- фотохимическая реакция;
- перенос энергии на молекулы окружения;
- интеркомбинационная синглет-триплетная конверсия $S_n \rightarrow T_m$ или обратная триплет-синглетная конверсия $T_m \rightarrow S_k$;
- безызлучательная внутренняя конверсия.

Любой из перечисленных релаксационных процессов, кроме первого, потенциально может

сопровождаться повреждением микроорганизмов.

Фотохимические реакции обычно сопровождаются изменениями кинетики затухания длительной люминесценции и наведенного поглощения ФС, а также появлением новых полос в спектрах люминесценции и поглощения. Ни того, ни другого в наших экспериментах обнаружено не было.

Фотодеструкция микроорганизмов может быть вызвана безызлучательным переносом энергии электронного возбуждения с ВВЭС красителя на молекулы мембраны, т.к. при заселении ВВЭС достигается энергия около 5 эВ, и такой энергии вполне достаточно для разрыва любой химической связи. Вклад этого канала релаксации ВВЭС в фотодеструкцию микроорганизмов нами не оценивался и требует дополнительных исследований.

Безызлучательная релаксация ВВЭС молекул приводит к локальному нагреву среды. Учитывая крайне малое время жизни ($\ll 1$ нс) ВВЭС молекул, ФС можно рассматривать как мгновенные точечные источники. Ввиду большой удельной теплоемкости среды маловероятно ожидать, что релаксация S_n (или T_m) состояния одной молекулы ФС заметно изменит локальную температуру среды. Однако не исключено образование в растворах микрообластей с повышенной концентрацией молекул красителей или сосредоточение ФС на поверхности клеточных стенок. В этих условиях можно ожидать существенного локального разогрева растворов вблизи микроорганизмов. Это особенно актуально для ФС, локализо-

ванных на стенках бактерий, например, в системе родамин 6Ж – *E. coli*.

При наличии локального разогрева среды возможны два основных механизма деструкции бактерий:

– гибель клеток в результате локальной гипертермии;

– разрушение мембран клеток или внутриклеточных объектов ударными волнами, возникающими при образовании и схлопывании пузырьков при испарении воды в локально разогретых микрообластях.

В результате безызлучательной релаксации ВВЭС каждая молекула ФС при однократном поглощении кванта света будет выделять количество теплоты, равное энергии этого кванта. Если принять, что это тепло мгновенно усваивается средой в сфере определенного радиуса, то можно оценить изменение температуры этой сферы.

Мы использовали растворы концентрацией $C = 0,01–0,5$ мМ. Поскольку количество квантов возбуждающего излучения было примерно в 10^7 раз больше, чем количество молекул красителей в единице облучаемого объема, то можно считать, что возбуждались все молекулы ФС. Кроме того, каждая молекула ФС за время длительности возбуждающего импульса ($\tau = 15$ нс) может неоднократно повторно поглотить возбуждающий квант, совершая переходы $S_1 \leftrightarrow S_n$ (а также $S_1 \rightarrow S_n \rightarrow T_m \rightarrow S_1$, или $T_1 \leftrightarrow T_m$, или $T_1 \rightarrow T_m \rightarrow S_1 \rightarrow T_1$), каждый из которых сопровождается выделением тепла. Поскольку в исследованных нами красителях сильно перекрываются полосы поглощения $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_n$ и $T_1 \rightarrow T_m$, то при воздействии на вещество интенсивным излучением возбуждаются все перечисленные переходы.

Оценка времени остывания локально разогретых областей и величины «температурного скачка» ΔT для сфер различного радиуса проведена в работах [27,32]. Реальный физический размер зоны разогрева зависит от конкретных каналов релаксации энергии, присущих данной среде. Используя типичные значения термодинамических параметров (например, для физиологического раствора удельная теплоемкость и плотность соответственно равны $C \sim 4 \cdot 10^3$ Дж/(кг·К) и $\rho \sim 10^3$ кг/м³), можно оценить уровень локального нагрева среды. Если принять радиус разогреваемой сферы равным 10 нм, то время остывания составляет около 10^{-8} с. При этом величина ΔT не выше 1 К. Однако уже для радиуса 0,5 нм величина ΔT превышает 150 К. Выделившегося тепла вполне достаточно для испарения воды и возникновения

пузырьков, образование и схлопывание которых порождает ударные волны. Распространяясь в среде, ударные волны могут механически повреждать белки, нуклеиновые кислоты или мембраны клеток. Мы полагаем, что именно этот процесс приводит к гибели микроорганизмов в условиях наших экспериментов, в связи с чем отдельно была исследована генерация микропузырьков в растворах ФС под действием короткого лазерного импульса.

Генерация пузырьков в растворах ФС. Пузырьки, как известно, являются сильными рассеивателями света [33]. Поэтому их возникновение и исчезновение должны сопровождаться изменением эффективности светорассеяния в среде. Для экспериментальной проверки предположения об образовании пузырьков в жидкостях мы исследовали светорассеяние в тех же средах и с теми же ФС, которые использовались для фотоинактивации бактерий. Процесс возникновения и последующего исчезновения пузырьков в растворах регистрировался по изменению во времени интенсивности светорассеяния в образце после воздействия коротким лазерным импульсом. Изучены особенности светорассеяния в зависимости от плотности мощности возбуждения и концентрации ФС в растворе.

В качестве зондирующего света использовали луч маломощного He–Ne-лазера с длиной волны 632,8 нм, которая лежит вне спектра поглощения ФС $S_0 \rightarrow S_1$. Для этой длины волны невозбужденные образцы практически прозрачны, а их светорассеяние обусловлено лишь естественным наличием неоднородностей в виде микропузырьков атмосферных газов. Наведенное поглощение среды (нерассеивающего характера) в возбужденных образцах возникает из-за триплет-триплетного поглощения света $T_1 \rightarrow T_m$ молекулами красителей и проявляется только в течение времени жизни триплетных состояний.

На рис. 4 представлена зависимость интенсивности рассеяния луча He–Ne-лазера в окрашенном ФС физиологическом растворе от времени при разных плотностях мощности возбуждения.

Участок кинетической кривой светорассеяния в диапазоне времени 0–50 мкс представлен на рис. 4а. Характерной особенностью всех кривых на рис. 4а является резкий провал интенсивности сразу после окончания лазерной вспышки с последующим возрастанием до некоторого максимального уровня. Этот провал связан с наведенным триплет-триплетным поглощением $T_1 \rightarrow T_m$ молекул красителя. Сигнал восстанавливается за время несколько микросекунд, что соответствует времени жизни триплетных состояний красителя в физиологическом растворе при нормальных условиях.

Максимальное значение интенсивности рассеяния сильно зависит от плотности мощности возбуждающего света. Если она меньше 5 МВт/см^2 , то наблюдается только поглощение $T_1 \rightarrow T_m$, а рассеяние практически не изменяется. Но при плотности мощности возбуждения $20\text{--}30 \text{ МВт/см}^2$ светорассеяние становится большим и надежно регистрируется. Пороговый характер возрастания рассеяния мы связываем с пороговым характером генерации рассеивающих центров в растворе, которыми, по нашему мнению, и являются пузырьки газа и/или пара.

На рис. 4б показано рассеяние света при тех же условиях возбуждения в диапазоне времен $0\text{--}3500 \text{ мкс}$. Как видно, длительность существования рассеивающих центров много больше, чем время жизни возбужденных триплетных состояний ФС. Кроме того, при мощной накачке интенсивность светорассеяния может увеличиваться и после окончания возбуждающего импульса, т.е. процесс формирования пузырьков продолжается после импульса накачки. Интенсивность светорассеяния сильно зависит от концентрации красителя в растворе. Если концентрация ФС меньше $0,01 \text{ мМ}$, изменение рассеяния света после накачки практически не наблюдается вплоть до плотности мощности 50 МВт/см^2 .

В процессе формирования пузырьков и быстрого схлопывания части из них образуются ударные волны, которые могут повреждать микроорганизмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Деструкция микроорганизмов при фототермических процессах, инициированных релаксацией высоковозбужденных электронных состояний сенсibilизаторов, представляет интерес как для понимания фундаментальных явлений, происходящих в биосистемах при воздействии на них мощным лазерным излучением, так и для практического применения. Практическое использование способа повреждения клеток короткими импульсами лазерного излучения с применением термосенсibilизаторов целесообразно не только для борьбы с бактериями, но и в фототерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, проект № 3.6358.2017/БЧ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Kashef, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, *Nanophotonics* **6** (5), 853 (2017).
2. R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, *Photochem. Photobiol.* **74**, 656 (2001).
3. M. R. Hamblin, *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67 (2016).
4. F. F. Sperandio, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **8**, 108 (2013).
5. K. Szocs, F. Gabor, G. Csik, and J. Fidy, *J. Photochem. Photobiol. B* **50**, 8 (1999).
6. I. G. Tiganova, E. A. Makarova, G. A. Meerovich, et al., *Biomed. Photonics* **6** (4), 27 (2017).
7. Z. Luksiene, *Medicina* **39**, 1137 (2003).
8. M. Ochsner, *J. Photochem. Photobiol. B* **39**, 1 (1997).
9. A. A. Krasnovsky Jr., *Biochemistry* **72** (10), 1065 (2007).
10. J. Chena, Th. C. Cesarioc, and M. Peter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (1), 33 (2014).
11. G. Ara, R. Anderson, K. Mandel, and A. R. Oseroff, *Photochem. Photobiol.* **47**, 37 (1988).
12. J. A. Parrish, R. R. Anderson, T. Harrist, et al., *J. Invest. Dermatol.* **80**, 75 (1983).
13. R. R. Anderson, R. J. Margolis, S. Watanabe, et al., *J. Invest. Dermatol.* **93**, 28 (1989).
14. J. Greenwald, S. Rosen, R. R. Anderson, et al., *J. Invest. Dermatol.* **77** (3), 305 (1981).
15. J. G. Morelli, O. T. Tan, J. Garden, et al., *Lasers Surg. Med.* **6** (1), 94 (1986).
16. M. Soncin, A. Busetti, F. Fusi, et al., *Photochem. Photobiol.* **69** (6), 708 (1999).
17. E. Goldman and L. H. Green in *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition* (Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008), p. 864.
18. V. B. Loschenov, V. I. Konov, and A. M. Prokhorov, *Laser Physics* **6** (10), 1188 (2000).
19. G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, et al., *Lasers Surg. Med.* **38** (5), 468 (2006).
20. С. Д. Захаров и А. В. Иванов, *Квантовая электроника* **3** (29), 192 (1999).
21. H. Noguchi, *J. Exp. Med.* **8** (2), 252 (1906).
22. А. Т. Ишемгулов, С. Н. Летута, С. Н. Пашкевич и др., *Оптика и спектроскопия* **123** (5), 818 (2017).
23. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **163**, 232 (2016).
24. С. Н. Летута, А. Т. Ишемгулов, У. Г. Летута и С. Н. Пашкевич, *Биофизика* **63** (5), 997 (2018).
25. S. Wood, D. Metcalf, D. Devine and C. Robinson, *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 680 (2006).
26. R. D. Rossoni, J. C. Junqueira, E. L. S. Santos, et al., *Lasers Med. Sci.* **25**, 581 (2010).
27. С. Н. Летута, Автореферат дис. ... докт. физ.-мат. наук (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2003).
28. В. В. Рыльков и Е. А. Чешев, *Оптика и спектроскопия* **63** (5), 1030 (1987).
29. А. В. Аристов и В. С. Шевандин, *Оптика и спектроскопия* **44** (3), 473 (1978).
30. В. В. Рыльков и Е. А. Чешев, *ДАН СССР* **281** (3), 648 (1985).
31. В. Л. Ермолаев и В. А. Любимцев, *Оптика и спектроскопия* **56** (6), 1026 (1984).
32. М.Г. Кучеренко, *Кинетика нелинейных фотопроцессов в конденсированных молекулярных системах* (Изд-во ОГУ, Оренбург, 1997).
33. Е. А. Анненкова, С. А. Цысарь и О. А. Сапожников, *Акустич. журн.* **62** (2), 167 (2016).

Inactivation of Bacteria with Photosensitizers Activated with a High Powered Nanosecond Pulsed Laser

S.N. Letuta, U.G. Letuta, and S.N. Pashkevich

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

This paper presents the results of the study that explored photoinactivation of bacteria with photosensitizers activated with a nanosecond pulsed laser. The power density of laser beam was 1–30 MW/cm². The irreversible damage of living cells by shock waves arising at the nucleation and collapse of vapor bubbles in locally heated microregions of the medium is discussed. The local heating of the medium was realized due to heat generation during nonradiative relaxation of high electronic states of sensitizer molecules.

Keywords: photoinactivation of bacteria, highly excited electronic states of molecules, local heating, acoustic waves