

## ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РЕЛАКСАЦИИ ВЫСОКОВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

© 2020 г. С.Н. Летуга, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян

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

E-mail: ppsnya@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 08.11.2019 г.

Принята к публикации 22.05.2020 г.

Обсуждается инактивация планктонных бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* ударными акустическими волнами, возникающими при быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в среде, локально нагретой до температуры кипения. Локальный нагрев среды осуществлялся за счет тепла, выделяемого в ходе релаксации высоких электронно-возбужденных состояний экзогенных молекул органических красителей. Красители возбуждались наносекундными импульсами лазерного излучения видимого диапазона. Высокие электронно-возбужденные состояния заселялись в результате ступенчатого поглощения молекулами двух квантов лазерного излучения. Исследована зависимость эффективности инактивации микроорганизмов от концентрации красителей в растворах, плотности мощности возбуждающего излучения и расстояния до источника генерации ударных волн.

*Ключевые слова:* экзогенные термосенсибилизаторы, ударные акустические волны, инактивация микроорганизмов.

DOI: 10.31857/S0006302920040109

Альтернативные стратегии борьбы с патогенными микроорганизмами становятся все более востребованными в связи с увеличением количества штаммов, резистентных к действию традиционных антимикробных препаратов [1]. Среди перспективных способов немедикаментозного воздействия на бактерии и грибы, к которому микробы не могут выработать иммунитет, выделяют фотодинамическую обработку – совместное деструктивное действие света и фотосенсибилизаторов на клетки. Механизм фотодинамического действия основан на селективном окислении субстрата активным кислородом, генерируемым фотосенсибилизаторами [2–5]. В качестве фотосенсибилизаторов обычно используют молекулы органических красителей с большим квантовым выходом в триплетное состояние [6, 7].

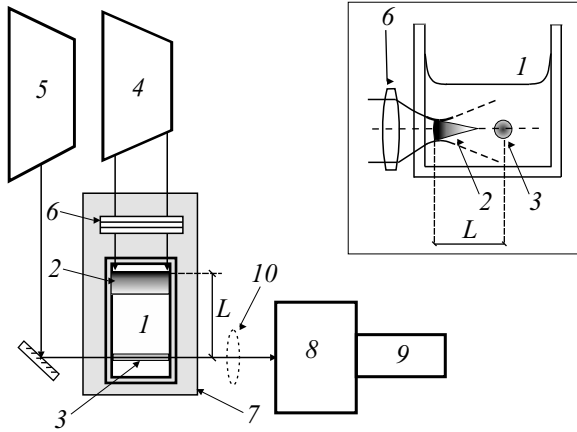
Основные ограничения фотодинамического действия связаны с малой глубиной проникновения фотосенсибилизаторов и света в биологические среды. В некоторых из них, например в биопленках, практически нет кислорода [8, 9], и фотодинамическое действие проявляется только

в тонком периферийном слое. Для инактивации бактерий в более глубоких слоях необходимо «включить» другие физические процессы.

В настоящей работе представлены результаты исследования повреждений планктонных бактерий ударными акустическими волнами. Такие волны возникают в среде при быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в локально нагретых областях. Быстрый локальный нагрев среды происходит при безызлучательной релаксации короткоживущих высоковозбужденных электронных состояний (ВВЭС) молекул-сенсибилизаторов.

ВВЭС красителей эффективно заселяются при облучении молекул наносекундными лазерными импульсами плотности мощности  $P \geq 5$  МВт/см<sup>2</sup> в результате ступенчатого поглощения двух квантов возбуждающего излучения [10, 11]. Релаксация ВВЭС молекул преимущественно безызлучательная, и поглощенная энергия очень быстро трансформируется в тепло. Если термосенсибилизатор локализован непосредственно в клетке или ее мембране, тепловыделение может инициировать ее гибель за счет гипертермии. Когда термосенсибилизатор находится вне клетки, тепло передается растворителю с последующим образо-

*Сокращение:* ВВЭС – высоковозбужденные электронные состояния.



**Рис. 1.** Экспериментальная установка для инактивации микроорганизмов и изучения ударных волн: 1 – кювета с раствором; 2 – область возбуждения раствора; 3 – область зондирования; 4 – твердотельный лазер, 532 нм; 5 – He-Ne-лазер, 628 нм; 6 – цилиндрическая линза; 7 – подвижная платформа; 8 – монохроматор; 9 – фотоприемник; 10 – фокусирующая линза. Показано расстояние  $L$  между зонами возбуждения и зондирования. На врезке – конфигурация установки в плоскости, перпендикулярной зондирующему лучу.

ванием и схлопыванием пузырьков пара, в результате чего образуются акустические волны, способные повредить микроорганизм. Заметим, что если в результате каскадной релаксации ВВЭС [12, 13] заселяются нижние триплетные уровни молекул, то они по-прежнему могут выполнять функции фотосенсибилизаторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы суточные агаровые культуры клеток *Escherichia coli* (штамм K12TG1) и *Bacillus subtilis* (штамм 534). Перед облучением бактерии перенесли в физиологический раствор. Плотность полученной суспензии стандартизировали фотометрически (длина волны 620 нм, оптическая плотность  $D = 0.61 \pm 0.01$ ). Для оценки выживаемости бактерий после облучения видимым светом в присутствии термосенсибилизатора применяли метод подсчета колониеобразующих единиц, количество которых определялось через 16 ч роста на LB-агаре при температуре 37°C. До облучения и добавления красителя оно составляло  $(4.50 \pm 0.44) \cdot 10^7$ /мл для *E. coli* и  $(32.0 \pm 2.3) \cdot 10^7$ /мл для *B. subtilis*.

Термосенсибилизаторами служили анионные ксантеновые красители эритрозин и эозин, а также катионный краситель родамин 6G, которые различаются фотодинамической активностью и по-разному взаимодействуют с клеточными стенками грамположительных и грамотрицательных бактерий. Концентрация красителей в растворах составляла 0.01–0.5 мМ.

Для фотоинактивации микроорганизмов и изучения ударных волн в растворах красителей использовали экспериментальную установку, схема которой показана на рис. 1. Растворы помещали в прямоугольную кварцевую кювету 1 сечением  $5 \times 10$  мм и облучали через ее торцевую стенку. Источником возбуждения служил импульсный YAG:Nd-лазер 4 (вторая гармоника  $\lambda = 532$  нм, длительность импульса 15 нс).

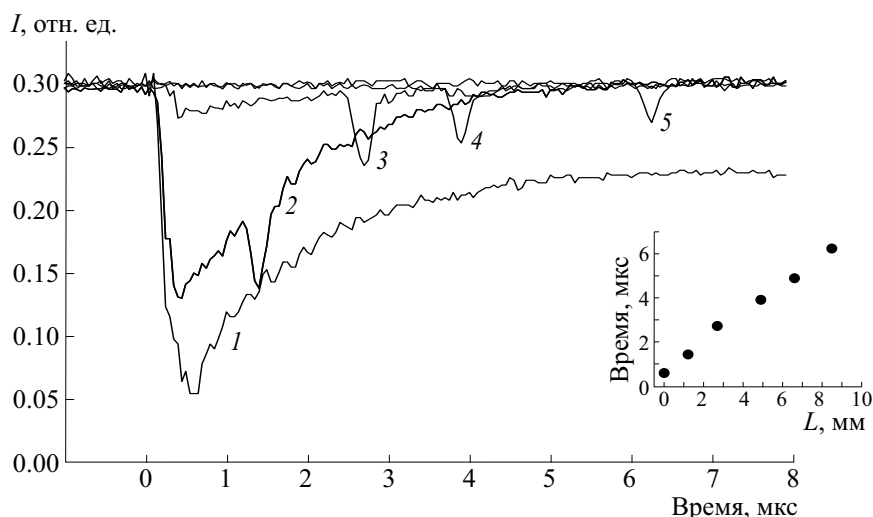
Для обеспечения эффективного нагрева среды и формирования пузырьков пара в кювете вблизи границы «стекло–раствор» с помощью собирающей цилиндрической линзы 6 создавали зону возбуждения 2 с поперечным сечением  $3.2 \times 0.5$  мм, в которой плотность мощности максимальна в перетяжке и могла достигать  $50$  МВт/см<sup>2</sup>. Протяженность этой зоны вдоль луча возбуждения уменьшается с ростом концентрации красителя и увеличивается вместе с плотностью мощности. В наших экспериментах излучение накачки полностью поглощалось на пути менее 5 мм.

Вдоль перетяжки линзы 6 (или параллельно ей на расстоянии  $L$ ) пропускали зондирующий луч 3 сечением менее 1 мм от маломощного (менее 1 мВт) He-Ne-лазера 5. Измеряя интенсивность нерассеянной части этого луча, можно судить о наведенном поглощении в зоне возбуждения или о наличии рассеивающих центров в виде пузырьков пара на его пути, а по рефракции луча – о прохождении ударной волны в растворе. Линза 6 и кювета 1 с раствором располагались на одной платформе 7, которая могла смещаться перпендикулярно зондирующему лучу 3. Перемещая платформу, можно, не изменяя геометрии возбуждения, зондировать раствор в кювете на контролируемом расстоянии  $L$  от перетяжки. При  $L = 0$  и выключенном He-Ne-лазере свечение зоны возбуждения 2 могло быть собрано на щели монохроматора 8 (МДР-41, ООО «ОКБ Спектр», Санкт-Петербург) с помощью дополнительной линзы 10, что позволяло получать информацию о релаксации возбужденных состояний сенсибилизаторов.

Синхронизация запуска лазера и регистрирующей системы, а также сбор, накопление и обработка сигналов производились в автоматизированном режиме.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Генерация ударных акустических волн.** На рис. 2 представлены кинетические кривые интенсивности зондирующего луча при импульсном возбуждении эритрозина концентрации 0.25 мМ в физиологическом растворе на разных расстояниях от перетяжки возбуждающего пучка: кривая 1 – непосредственно в перетяжке; кривые 2 и 3 –



**Рис. 2.** Временные зависимости интенсивности нерассеянной части зондирующего луча в физиологическом растворе с эритрозином ( $C = 0.25 \text{ мМ}$ ) на разных расстояниях  $L$  от перетяжки возбуждающего пучка ( $P = 20 \text{ МВт/см}^2$ ): 1 –  $L = 0 \text{ мм}$ ; 2 –  $L = 1.2 \text{ мм}$ ; 3 –  $L = 2.7 \text{ мм}$ ; 4 –  $L = 4.9 \text{ мм}$ ; 5 –  $L = 8.5 \text{ мм}$ . На врезке – зависимость времени прихода волны от расстояния до перетяжки.

в зоне возбуждения на некотором расстоянии от перетяжки, кривые 4 и 5 – вне зоны возбуждения.

На интенсивность нерассеянной части зондирующего луча оказывают влияние три явления – рассеяние света на долгоживущих пузырьках, наведенное поглощение возбужденными молекулами красителя и пересечение луча ударной волной. Рассеяние на пузырьках проявляется только для луча, зондирующего перетяжку: в этой позиции (кривая 1,  $L = 0$ ) ступенчатое изменение интенсивности сохраняется вплоть до нескольких миллисекунд (не показано на рисунке). Вместе с долгоживущим рассеянием на пузырьках в точке  $L = 0$  имеет место короткоживущее наведенное триплет-триплетное поглощение света возбужденными молекулами красителя, которое характерно для кривых 1 и 2 ( $L = 0, 1.2 \text{ мм}$ ) и в значительно меньшей степени для кривой 3 ( $L = 2.7 \text{ мм}$ ). Отметим, что наличие триплетных состояний красителя в присутствии молекулярного кислорода в этих областях может повлечь генерацию активных форм кислорода. Кривая 3, очевидно, соответствует дальнему краю зоны возбуждения. На расстояниях  $L \geq 5 \text{ мм}$  триплет-триплетное по-

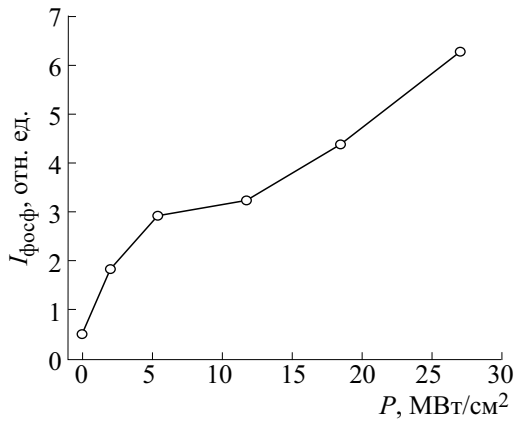
глощение уже не проявляется, что видно из кривых 4 и 5 ( $L = 4.9$  и  $8.5 \text{ мм}$  соответственно).

На всех кривых присутствуют острые провалы, которые, по нашему мнению, соответствуют моментам пересечения зондирующего луча фронтом ударной волны, источником которой являются родившиеся в перетяжке пузырьки. Косвенным доказательством этому является график зависимости времени появления провала от расстояния  $L$  от точки зондирования до перетяжки. Обратный наклон этой прямой соответствует скорости звука в среде, которая измерена нами при температурах раствора 0, 26 и 80°C. Полученные значения вместе со справочными данными для дистиллированной воды при атмосферном давлении приведены в таблице.

Таким образом, при указанных выше диапазонах концентраций красителей и плотности мощности возбуждающего излучения в кювете с красителем можно выделить три зоны, в которых возможны различные воздействия на микроорганизмы. В области перетяжки возможна гипертермия бактерий, воздействие на них ударной волной, повреждение активными формами кислоро-

Зависимость скорости волны от температуры раствора

| Температура, °C | Скорость волны, м/с | Скорость волны в дистиллированной воде, м/с [21] |
|-----------------|---------------------|--|
| 0               | 1410                | 1402   |
| 26              | 1505                | 1499   |
| 80              | 1555                | 1554   |



**Рис. 3.** Зависимость интенсивности фосфоресценции эозина ( $C = 0.25$  мМ) в физиологическом растворе от плотности мощности возбуждающего излучения ( $\lambda_{\text{возб}} = 532$  нм).

да и перенос энергии с ВВЭС связанных молекул красителей на мембраны или внутриклеточные структуры. В промежуточной области зоны возбуждения, где присутствуют молекулы сенсibilизаторов в триплетном состоянии, гипертермия и перенос энергии маловероятны, но возможно химическое повреждение бактерий активными формами кислорода и действие ударной волны. Наконец, вне зоны возбуждения единственным потенциально опасным фактором повреждения микроорганизмов выступает ударная волна.

Пузырьки пара возникают из-за локального разогрева среды при безызлучательной релаксации возбужденных состояний молекул красителей. Следует подчеркнуть, что при использованных нами плотностях мощности возбуждения существенный (а в случае родамина 6G — основной) вклад в разогрев растворителя вносит релаксация ВВЭС. Заселение ВВЭС молекул в наших экспериментах подтверждается зависимостью интенсивности фосфоресценции от плотности мощности накачки, измеренная у эозина (рис. 3).

На начальном участке интенсивность свечения очень быстро нарастает, достигая насыщения примерно при  $5 \text{ МВт/см}^2$ , что связано с выходом на насыщение заселенности  $S_1$ -уровней молекул и, как следствие, заселенности нижних триплетных  $T_1$ -состояний, образующихся в результате интеркомбинационной конверсии  $S_1 \rightarrow T_1$ .

При дальнейшем увеличении плотности мощности накачки интенсивность фосфоресценции эозина вновь начинает заметно расти. Это объясняется тем, что при мощном возбуждении молекулы красителей, находящиеся в  $S_1$ -состоянии,

поглощают второй квант и по схеме  $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$  переходят на более высокие  $S_n$ -уровни, эффективность интеркомбинационной конверсии

из которых в триплетное состояние выше, чем с  $S_1$ -уровня [15–17].

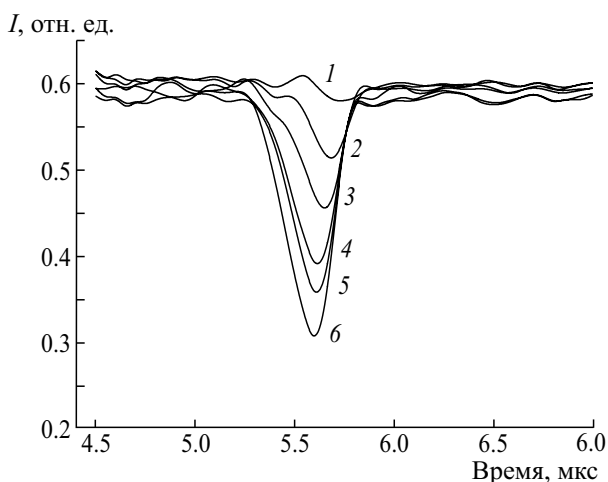
В результате баланс концентраций молекул в синглетной и триплетной подсистемах молекул смещается в сторону увеличения доли триплетов из-за включения последовательности переходов  $S_1 \rightarrow S_n \rightarrow T_m$  при большой плотности мощности. В свою очередь, к переходам  $S_1 \rightarrow T_1$  добавляются переходы  $T_m \rightarrow T_1$ , что и приводит к росту концентрации  $T_1$ -состояний и увеличению интенсивности фосфоресценции.

При плотности мощности возбуждающего излучения  $P < 0.5 \text{ МВт/см}^2$  ударные волны в растворах с ксантоновыми красителями имеют очень низкую интенсивность, и их экспериментальная регистрация затруднена. Поскольку квантовый выход  $\phi_T$  интеркомбинационной конверсии  $S_1 \rightarrow T_1$  в триплетное состояние в воде у ксантоновых красителей большой (от 0.71 у эозина до 0.98 у эритрозина [18]), то при длительности импульса 15 нс значительная часть молекул успевает не только перейти в  $T_1$ -состояние, но и многократно совершить безызлучательные переходы  $T_1 \leftrightarrow T_m$ , каждый из которых дает свой вклад в нагрев среды. Однако при общей малой энергии накачки интенсивность акустических волн невелика.

В растворах с родамином 6G при слабой накачке акустические волны вообще не обнаружены. У родамина 6G квантовый выход  $\phi_T$  интеркомбинационной конверсии  $S_1 \rightarrow T_1$  в триплетное состояние  $\phi_T \sim 0.01$ , а квантовый выход флуоресценции перехода  $S_1 \rightarrow S_0$   $\phi_{\text{фл}} \sim 0.99$  [19], поэтому при релаксации  $S_1$ -состояний молекул раствор не нагревается. Только когда плотность мощности накачки  $P$  достигает примерно  $5 \text{ МВт/см}^2$  и процесс поглощения становится двухквантовым ( $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$ ), эффективно заселяются высокие  $S_n$ -состояния молекул, при релаксации которых возникает локальный нагрев, образуются пузырьки пара и появляется ударная волна.

На рис. 4 показана эволюция сигнала от ударной волны при увеличении плотности мощности накачки родамина 6G в физиологическом растворе. Видно, что амплитуда провала на кривой пропускания становится заметной при  $P > 5.7 \text{ МВт/см}^2$ .

Как видно, если  $P$  превышает  $10 \text{ МВт/см}^2$ , акустические волны эффективно формируются и уверенно регистрируются как в растворах с ксантоновыми красителями, так и в растворах с родамином 6G. Заметим, что в отсутствие термосенсibilизатора в растворе даже при плотности мощности возбуждающего света  $40 \text{ МВт/см}^2$  ударные волны не обнаружены.



**Рис. 4.** Эволюция сигнала от ударной волны в растворе родамина 6G ( $C = 0.25$  мМ) с ростом плотности мощности накачки; 1 – 5.7 МВт/см<sup>2</sup>, 2 – 11.1 МВт/см<sup>2</sup>, 3 – 18.7 МВт/см<sup>2</sup>, 4 – 27.0 МВт/см<sup>2</sup>, 5 – 35.1 МВт/см<sup>2</sup>, 6 – 41.6 МВт/см<sup>2</sup>.

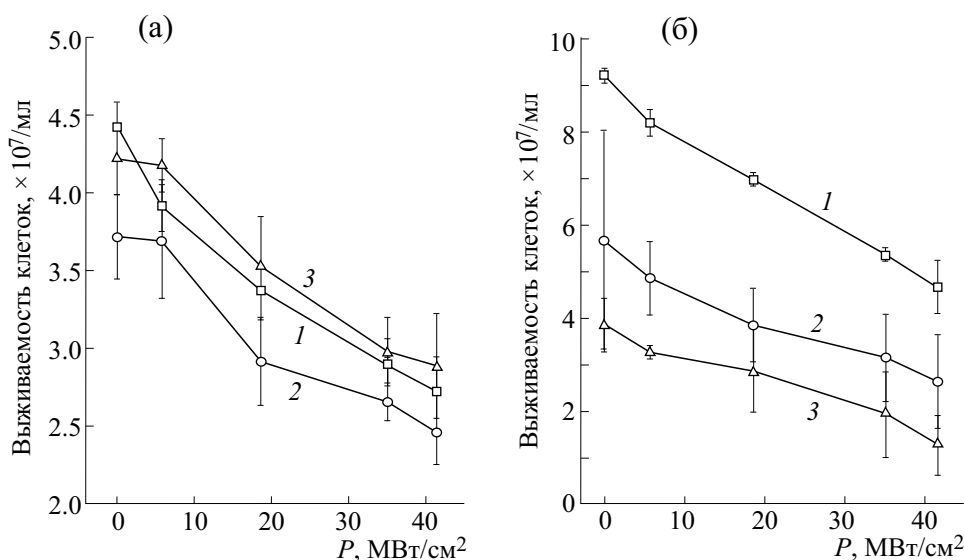
**Повреждение бактерий ударными волнами.** Для оценки повреждения бактерий ударными волнами использовали установку, фрагмент оптической части которой показан на рис. 1. Отбор бактерий для определения количества колониеобразующих единиц до и после возбуждения производили непосредственно в области возбуждения, а также на расстояниях 5 и 10 мм от зоны возбуждения. В контрольных экспериментах исследуемые растворы бактерий с красителями облучали импульсами с  $P < 0.5$  МВт/см<sup>2</sup>, а эквивалентность дозы облучения обеспечивалась соот-

ветствующим увеличением количества возбуждающих импульсов (времени облучения).

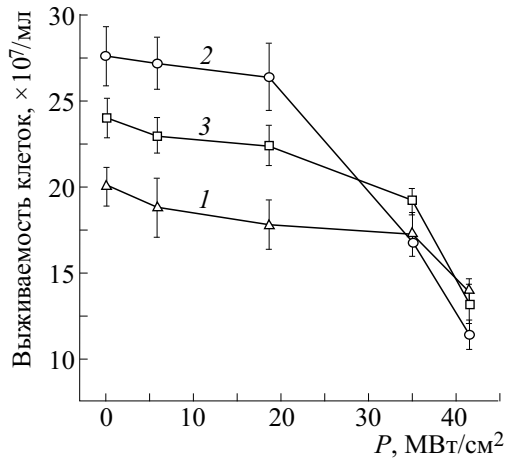
Непосредственно в зоне возбуждения возможно повреждение бактерий в результате фотодинамического действия; гибель клеток за счет гипертермии при безызлучательной релаксации ВВЭС-сенситизаторов, связанных со стенками бактерий или находящихся внутри клеток; разрывы химических связей биологически важных макромолекул при безызлучательном переносе энергии с ВВЭС-красителей, а также разрушение клеток ударными волнами. На расстояниях же более 5 мм от зоны возбуждения уже не проявляются тепловые эффекты, нет фотодинамического действия и переноса энергии. Если имеет место повреждение бактерий, то оно происходит исключительно под действием ударных волн, возникающих при быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в зоне облучения.

На рис. 5 показаны зависимости выживаемости клеток *E. coli* и *B. subtilis* в физиологических растворах с ксантовыми красителями (0.25 мМ) до и после их облучения импульсами различной плотности мощности  $P$  при разных расстояниях до зоны возбуждения.

Видно, что непосредственно в перетяжке повреждение бактерий *E. coli* происходит даже при малых плотностях мощности возбуждающего излучения. По-видимому, это обусловлено фотодинамическим действием. Для гипертермии клеток и безызлучательного переноса энергии необходимо взаимодействие красителя со стенками бактерий или его проникновение внутрь клеток. Ксантоновые красители-анионы не взаимо-



**Рис. 5.** Зависимости выживаемости клеток *Escherichia coli* в растворе с эритрозином (а) и *Bacillus subtilis* в растворе с эозином (б) от плотности мощности накачки на разном расстоянии от перетяжки при постоянной концентрации красителей (0.25 мМ) в физиологическом растворе: 1 – 0 мм, 2 – 2.5 мм, 3 – 10 мм.



**Рис. 6.** Зависимости выживаемости клеток *Bacillus subtilis* от плотности мощности накачки на расстоянии 10 мм от перетяжки при различной концентрации родамина 6G в физиологическом растворе: 1 — 0.1 мМ, 2 — 0.25 мМ, 3 — 0.5 мМ.

действуют с клетками *E. coli*, стенки которых имеют отрицательный заряд [20]. На расстояниях 5 и 10 мм от зоны возбуждения повреждения клеток *E. coli* становятся заметными только при  $P > 10$  МВт/см², когда за счет двухквантового поглощения возрастает эффективность генерации ударных волн.

Клетки *B. subtilis* оказались более чувствительными к воздействию ударных волн. Их чувствительность даже к малым дозам облучения, по-видимому, связана с взаимодействием эозина с бактериями.

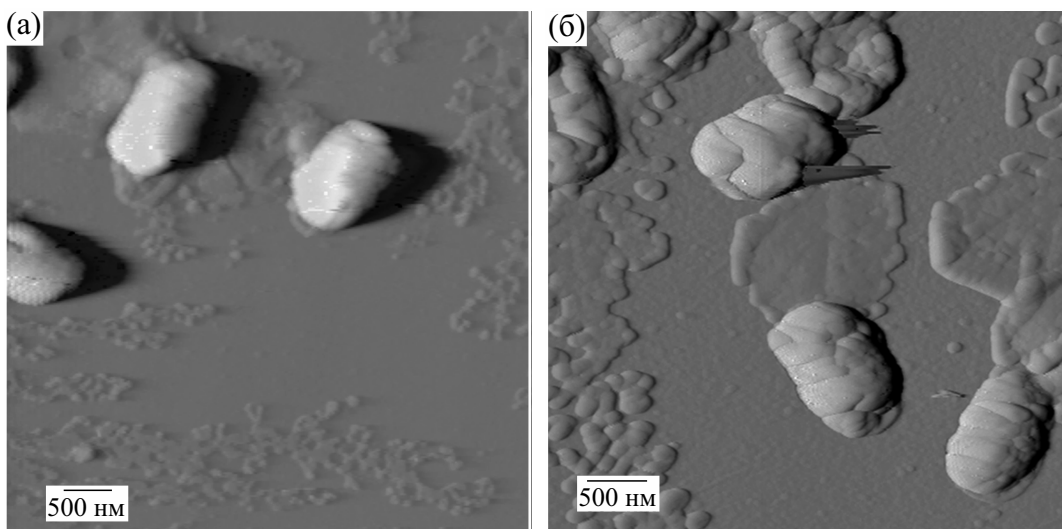
Зависимость выживаемости бактерий *B. subtilis* от плотности мощности накачки при разной кон-

центрации родамина 6G в растворе на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения представлена на рис. 6. Видно, что с ростом концентрации термосенсибилизатора эффективность повреждения микроорганизмов возрастает.

Особенно заметными повреждения становятся при  $P > 20$  МВт/см². С ростом концентрации красителя в растворе увеличивается плотность тепловых источников. Это повышает эффективность генерации ударных волн и, соответственно, увеличивает вероятность повреждения бактерий. Кроме того, при большой концентрации красителей образуются ассоциаты, квантовый выход флуоресценции у которых ниже, чем у мономеров [19]. Ассоциаты красителей могут быть дополнительными источниками тепловыделения в растворах.

Изображения бактерий до и после облучения в присутствии эритрозина, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии, показаны на рис. 7. При исследовании образцов, содержащих бактериальные клетки *E. coli*, до воздействия акустических волн на поверхности подложки обнаружены неоднородные по внешним признакам структуры, среди которых можно выделить продолговатые объекты высотой более 600 нм и объекты разнообразной формы, высотой менее 100 нм (рис. 7а).

Первые объекты были идентифицированы как бактериальные клетки со средними размерами 1.76 мкм в длину, 950 нм в ширину и 680 нм в высоту. Более мелкие структуры, очевидно, являются остатками питательной среды и физиологического раствора, используемого в качестве буфера.



**Рис. 7.** Изображения бактерий до и после облучения в присутствии эритрозина, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии.

Результаты визуализации клеток *E. coli* после облучения ( $\lambda_{\text{возб}} = 532 \text{ нм}$ ,  $P = 35 \text{ МВт/см}^2$ ) в растворе с эритрозином (0.5 мМ), отобранных на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения, показаны на рис. 7б. Отличительной особенностью представленных изображений является наличие на подложке клеток с нарушенной целостностью клеточной стенки. При этом высота клеток уменьшилась и составила в среднем 580 нм. Для количественного описания изменений клеточной стенки оценена ее шероховатость до и после воздействия. Среднеквадратичная шероховатость увеличилась в среднем на 40%, составляя до и после облучения в среднем 23 и 32 нм соответственно.

Аналогичные изменения наблюдаются в клетках *B. subtilis*: в контрольных образцах, помимо интактных, обнаруживаются также деформированные клетки с разной степенью поражения вплоть до полностью дефрагментированных микроорганизмов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ударные волны, возникающие при образовании и схлопывании пузырьков пара в физиологическом растворе, эффективно повреждают бактерии на расстояниях, многократно превышающих радиус фотодинамического действия. Эффективность повреждения микроорганизмов возрастает с увеличением концентрации красителей в растворах и, естественно, зависит от плотности мощности возбуждающего света. Это явление можно использовать для разработки практического способа борьбы с патогенными микроорганизмами в глубоких слоях тканей. Такой способ воздействия на микроорганизмы перспективен в средах, где малоэффективны традиционные способы – антибиотикотерапия или фотодинамическое воздействие на патогены.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, проект FSGU-2020-0003.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. O'Neill, *Review on Antimicrobial Resistance. Tackling a Global Health Crisis: Initial Steps* (Wellcome Trust, London, 2015).
2. С. Д. Захаров и А. В. Иванов, Квантовая электроника **29** (3), 192 (1999).
3. А. А. Красновский (мл.), Биофизика **49** (2), 305 (2004).
4. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **163**, 232 (2016).
5. M. Scholz and R. Dëdic, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Ed. by S. Nonell and C. Flors (Roy. Soc. of Chemistry, 2016), Vol. 2, Chapt. 28, pp. 63–81.
6. A. A. Krasnovsky Jr., *Biochemistry* **72** (10), 1065 (2007).
7. M. R. Hamblin, *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67 (2016).
8. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, *Science* **284**, 1318 (1999).
9. G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, and R. Kolter, *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49, (2000).
10. А. П. Ведута, М. Д. Галанин, Б. П. Кирсанов и З. А. Чижикова, Письма в ЖЭТФ **11** (1), 157 (1970).
11. H.-B. Lin and M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.* **47** (3), 442 (1977).
12. В. Л. Ермолаев и В. А. Любимцев, Оптика и спектроскопия **60** (1), 74 (1986).
13. H. Fukumura, K. Kikuchi, K. Koike, and H. Kokubun, *J. Photochem. Photobiol.* **42** (2–3), 283 (1988).
14. С. Н. Летута, У. Г. Летута и С. Н. Пашкевич, Биофизика **64** (4), 726 (2019).
15. В. В. Рыльков и Е. А. Чешев, Докл. АН СССР **281** (3), 648 (1985).
16. В. В. Рыльков и Е. А. Чешев, Оптика и спектроскопия **63** (5), 1030 (1987).
17. С. Н. Летута, Вестник ОГУ **5**, 88 (2002).
18. K. K. Rohatgi-Mukherjee and A. K. Mukhopadhyay, *Indian J. Pure Appl. Phys.* **14** (6), 481 (1976).
19. Л. В. Левшин и А. М. Салецкий, *Люминесценция и ее измерения* (Изд-во МГУ, М., 1989).
20. N. Kashef, Y.-Y. Huang, M. R. Hamblin, *Nanophotonics* **6** (5), 853 (2017).
21. А. А. Александров, В. А. Белогольский, В. И. Левцов и др., *ГСССД 190–2000. Таблицы стандартных справочных данных. Вода. Скорость звука при температурах 0...100 градусов Цельсия и давлениях 0,101325...100 МПа*, (Издательство стандартов, М., 2000).

## **Photothermic Inactivation of Microorganisms at Relaxation of Highly Excited States of Sensitizers**

**S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, and A.N. Nikiyan**

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

This study demonstrates the susceptibility of planktonic bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to inactivation by shock acoustic waves arising from the rapid formation and collapse of vapor bubbles in the medium locally heated to boiling point. Local heating of the medium occurred due to heat release through relaxation of highly excited electronic states of exogenous molecules of organic dyes. Dyes molecules were excited by nanosecond laser pulses. Highly excited electronic states were formed as a result of stepwise absorption of two quanta of laser radiation. The dependency of the efficiency of microorganism inactivation on dye concentration, the excitation power density and the distance from the shock wave source was studied.

*Keywords: exogenous thermosensitizers, shock acoustic waves, inactivation of microorganisms*