

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук

На правах рукописи

Шелыгина Светлана Николаевна

**Спектрально-селективная инактивация бактерий
инфракрасным излучением фемтосекундного лазера**

Специальность 1.3.19 –

Лазерная физика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, доцент

Кудряшов Сергей Иванович

Москва – 2026

Оглавление

Введение	5
Актуальность темы исследования и степень ее разработанности	5
Цели и задачи диссертационной работы	8
Научная новизна	8
Практическая значимость работы	9
Положения, выносимые на защиту	10
Достоверность результатов работы	10
Личный вклад автора	11
Апробация результатов работы	11
Публикации	12
Структура и объём диссертации	12
Глава 1. Физические методы борьбы с патогенными микроорганизмами (литературный обзор)	13
1.1 Ионизирующее излучение	14
1.2 Ультрафиолетовое излучение, коротковолновое излучение видимого диапазона	18
1.3 Фотодинамическая инактивация	24
1.4 Импульсное излучение высокой интенсивности	26
1.5 Низкотемпературная плазма	28
1.6 Высоко- и сверхвысокочастотный электромагнитный нагрев	31
1.7 Инфракрасное излучение	34
1.7.1 Биологические мишени инфракрасного излучения	34
1.7.2 Широкополосные источники инфракрасного излучения	37

1.7.3 Селективные (узкоспектральные) источники инфракрасного излучения.....	40
1.8 Лазерное излучение	42
1.8.1 Лазеры, обеспечивающие электронное возбуждение	43
1.8.2 Лазеры, обеспечивающие колебательное возбуждение.....	47
Заключение по главе 1	51
Глава 2. Экспериментальные методы и объекты исследования	56
2.1 Экспериментальные установки	56
2.2 Материалы исследования	58
2.2.1 Микробиологические культуры	58
2.2.2 Подложки для нанесения биологических образцов	59
2.3 Применяемые методики	60
2.3.1 Воздействие лазерных импульсов на микроорганизмы	60
2.3.2 Микробиологический анализ	65
2.3.3 Оптическая и структурная характеристика образцов	68
2.3.4 Квантово-механическое моделирование	69
Заключение по главе 2	70
Глава 3. Инактивация патогенных бактерий путем селективного фемтосекундного возбуждения в среднем ИК-диапазоне.....	72
3.1 Селективная инактивация бактерии <i>P. aeruginosa</i> фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона (3,4 и 6 мкм)	72
3.2 Спектральная зависимость порога инактивации бактерий <i>S. aureus</i> фемтосекундными импульсами среднего ИК-диапазона (3,4–6 мкм)	75
3.3 Инактивация патогенных бактерий под полиэтиленовой пленкой.....	76
3.4 Обсуждение результатов.....	78

Выводы по главе 3.....	83
Глава 4. Исследование механизмов инактивации патогенных бактерий методом спектроскопии пропускания фемтосекундных лазерных ИК-импульсов	85
4.1 Спектральная динамика при накачке фемтосекундным излучением с длиной волны 6 мкм.....	85
4.2 Спектральная динамика при накачке фемтосекундным излучением с длиной волны 3,4 мкм.....	88
4.3 Обсуждение результатов	89
Заключение по главе 4	98
Заключение.....	100
Благодарности.....	102
Публикации автора по теме диссертации	103
Список сокращений.....	106
Список литературы.....	108

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рост устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам (антибиотикорезистентность), обусловленный их адаптивностью и нерациональным применением антибиотиков, представляет серьёзную проблему для здравоохранения и пищевой промышленности. Резистентность снижает эффективность антибактериальной терапии и со временем делает лечение инфекции невозможным. Ситуацию усугубляет замедление разработки новых антибиотиков (с 2017 года были одобрены только 12 новых препаратов) [1]. По данным *The Lancet (2022)*, в 2019 году 1,27 млн человек умерли напрямую от инфекций, вызванных резистентными бактериями, а 4,95 млн случаев смерти были с ними связаны. При отсутствии эффективных мер к 2050 году прогнозируется до 10 млн смертей ежегодно [2]. В пищевой промышленности, помимо болезней пищевого происхождения, проблемами являются уничтожение или отзыв зараженной продукции, что приводит к экономическим потерям [3]. На этом фоне здравоохранение и пищевая промышленность нуждаются в разработке физических методов воздействия на патогенные микроорганизмы, которые бесконтактно, неинвазивно и экономично обеспечивали бы необходимый уровень обеззараживания или стерилизации *in situ* без индукции мультирезистентных штаммов.

В этом контексте наиболее перспективны физические методы инактивации. Традиционно для обеззараживания используют ультрафиолетовое (УФ) излучение, однако оно имеет существенные ограничения: мутагенное действие на клетки млекопитающих и способность вызывать деградацию полимеров [4]. Другой достаточно распространенный тип излучения – излучение среднего инфракрасного (ИК) диапазона. Излучение среднего ИК-диапазона относится к неионизирующему излучению, его биологические эффекты обусловлены преимущественно тепловыми и/или колебательными механизмами. Широкополосные тепловые

источники излучения среднего ИК-диапазона (3–30 мкм) десятилетиями применяются в пищевой промышленности для выпечки, сушки, инактивации ферментов и подавления роста микроорганизмов (бактерий, спор, дрожжей, плесени) как в жидких, так и в твёрдых матрицах, и на контактных поверхностях [5]. Их распространение обусловлено рядом преимуществ: высокой теплопередачей, радиационным переносом энергии к объекту и хорошей управляемостью нагревом при сохранении качества продукта [6]. Антибактериальные свойства широкополосных тепловых ИК-источников излучения подробно описаны в литературе в контексте пищевых технологий [7, 8]. Однако, они демонстрируют низкую энергоэффективность из-за избыточно широкого спектра с неселективным нагревом, радиационных потерь неиспользованного излучения и потерь на теплопроводность из зоны нагрева. Напротив, ряд работ указывает на большую эффективность селективного ИК-облучения в спектральных диапазонах максимального поглощения бактериальной клетки, прежде всего около 3 и 6 мкм, выделенного из спектрального диапазона широкополосного источника [9, 10].

Поэтому эффективность инактивации может быть существенно повышена путем перехода к лазерным источникам среднего ИК-диапазона, обладающим высокой степенью монохроматичности и позволяющих селективно возбуждать колебательные моды целевых молекулярных групп (например, C–H связи на длине волны ~3,4 мкм и амидные группы на длине волны ~6 мкм). Лазерные источники среднего ИК-диапазона используются в биофотонике: CO₂-лазеры ($\lambda = 10,6$ мкм) применяют в хирургии для удаления тканей [11], а источники в области 6–8 мкм рассматриваются как перспективные для прецизионной лазерной абляции с минимальными термическими повреждениями окружающих тканей, например при лазерной кератотомии и в нейрохирургии [12–14]. При воздействии излучения среднего ИК-диапазона на биоткань она остается в основном электронном состоянии, а ее модификация обусловлена преимущественно колебательными переходами. Модификация материалов под действием CO₂-лазера ($\lambda = 10,6$ мкм)

главным образом связана с поглощением излучения водой и ассоциированными с этим термическими процессами, при которых тепловая диффузия приводит к значительным побочным повреждениям окружающих тканей. Соответственно, энергия излучения с длиной волны ~ 6 мкм, соответствующей максимальному поглощению амидных связей белков, передается напрямую белковой матрице, вызывая конформационные изменения. Такое воздействие приводит к разрушению белка с меньшими коллатеральными повреждениями по сравнению с другими длинами волн [15].

В свою очередь, воздействие фемтосекундных лазерных импульсов на вещество принципиально отличается от воздействия непрерывного излучения и импульсов большей длительности, в том числе – в плане некумулятивного нагрева. За счет сверхкороткой длительности, широкого спектра генерации и высокой пиковой интенсивности путем резонансных каскадных оптических переходов с сверхбыстрой нелинейной динамикой практически в одноимпульсном режиме можно реализовывать возбуждение материала, достаточное для его модификации. В частности, при воздействии фемтосекундных импульсов среднего ИК-диапазона с длинами волн резонансного поглощения 3,4 и ~ 6 мкм на биоматериал возможно многоступенчатое (каскадное) селективное возбуждение высоких колебательных уровней мод С–Н и амида I и II. Селективность ограничена спектральной шириной импульса и ангармоническим сдвигом высоких колебательных уровней. В связи с этим представляет интерес исследование воздействия фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона с длинами волн, соответствующими максимальному поглощению клеток патогенных бактерий, в контексте их инактивации, а также исследование механизмов, лежащих в основе этого процесса. Данное исследование может стать основой для разработки нового физического метода борьбы с патогенной микрофлорой в различных условиях, а также способствовать более глубокому пониманию механизмов, лежащих в основе активно разрабатываемой технологии кератотомии роговицы с использованием

фемтосекундного лазерного излучения с резонансной длиной волны, исследования которой в данный момент находятся на прикладном уровне [13].

Цели и задачи диссертационной работы

Целью работы является инактивация бактериальных культур фемтосекундными лазерными импульсами с длинами волн, соответствующими инфракрасным полосам селективного поглощения, а также исследование физического механизма, ответственного за процесс инактивации.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Выявить спектральные области поглощения бактериальных культур в среднем ИК-диапазоне, соответствующие характеристическим колебаниям функциональных групп органелл, перспективные для лазерного воздействия.
2. Осуществить воздействие фемтосекундными лазерными импульсами в диапазонах, соответствующих выявленным спектральным областям.
3. Определить эффективность ИК-лазерной инактивации бактерий путем сравнения жизнеспособности облученных и контрольных образцов.
4. Исследовать спектральную динамику поглощения характеристических колебаний бактерий при воздействии фемтосекундного ИК-лазерного излучения и связанные с ней структурные превращения.

Научная новизна

1. Впервые экспериментально продемонстрирована возможность и установлены условия термической инактивации грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*P. aeruginosa*) патогенных бактерий в некумулятивном режиме фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона с длинами волн 3,4 и 6 мкм, соответствующими поглощению С–Н колебаний и колебаний амидных групп белков.

2. Впервые продемонстрирована спектральная селективность инактивации патогенных бактерий, выражаяющаяся в корреляции пороговых значений интенсивности инактивации и оптической плотности бактерий на длинах волн 3,4 и 6 мкм.

3. Впервые проведено детальное исследование молекулярных механизмов инактивации патогенных бактерий при воздействии фемтосекундных лазерных импульсов среднего ИК-диапазона с длиной волны 6 мкм методом динамической спектроскопии пропускания.

4. Некумулятивная термическая инактивация патогенных бактерий фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм впервые реализована через полиэтиленовую пленку, прозрачную в данном диапазоне.

Практическая значимость работы

Полученные результаты обладают прикладной ценностью для медицины, пищевой промышленности и биотехнологий и могут послужить основой для создания физических методов дезинфекции, не вызывающих развития резистентности микроорганизмов:

- Установлены режимы некумулятивной термической высокоэффективной и энергосберегающей инактивации патогенных бактерий фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона с длиами волн 3,4 и 6 мкм.

- Продемонстрирована возможность некумулятивной термической инактивации бактерий при воздействии фемтосекундных лазерных импульсов среднего ИК-диапазона с длиной волны 6 мкм через полиэтиленовую пленку. Данный подход в перспективе применим для обработки герметично упакованных объектов: медицинских инструментов, упакованной пищевой продукции, штаммов особо опасных микроорганизмов, изолированных для предотвращения прямого контакта с оператором. В медицине метод может быть использован для

обеззараживания или предотвращения микробного обрастания поверхностей медицинских катетеров, где традиционные методы оказываются малоэффективными, что сокращает срок безопасного использования медицинских изделий и эффективность лечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Инактивация грамположительных *S. aureus* и грамотрицательных *P. aeruginosa* патогенных бактерий под действием фемтосекундных лазерных импульсов с длинами волн 3,4 и 6 мкм, соответствующими резонансному поглощению С–Н колебаний и колебаний амидных групп белков и нуклеиновых кислот, происходит в некумулятивном режиме.

2. Пороговая интенсивность некумулятивной селективной инактивации грамположительных *S. aureus* и грамотрицательных *P. aeruginosa* патогенных бактерий фемтосекундными лазерными импульсами определяется коэффициентом поглощения колебательных переходов амидных групп белков и нуклеиновых кислот и углеводородного скелета органических молекул на длинах волн 3,4 и 6 мкм.

3. Некумулятивный локальный нагрев фрагментов белка под действием фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны 6 мкм в диапазоне интенсивностей $(0,03–1) \times 10^2$ ГВт/см² реализуется по мере роста интенсивности через следующие стадии: i) просветление сильной полосы амида I (C=O, ~ 1650 см⁻¹), ii) её «синий» сдвиг ~ 200 см⁻¹ (признак разрыва водородных связей) и iii) насыщающийся ангармонический «красный» сдвиг на 300 см⁻¹ с достижением режима некумулятивной инактивации бактерий.

Достоверность результатов работы

Достоверность результатов диссертационного исследования обусловлена применением сертифицированного оборудования, воспроизводимостью экспериментальных данных. Она подтверждается аprobацией результатов на

международных научных конференциях и их публикацией в рецензируемых научных журналах.

Личный вклад автора

Автором выполнены экспериментальные исследования, составляющие основу диссертационной работы, а именно: исследование возможности инактивации микроорганизмов путём облучения фемтосекундными лазерными импульсами с длинами волн 3,4; 5,2 и 6 мкм. Работа включала выбор и реализацию режимов облучения, а также анализ зависимостей эффективности инактивации от параметров лазерного воздействия. Автором выполнена характеризация контрольных и облучённых образцов с использованием просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии, энергодисперсионной спектроскопии, ИК-Фурье-спектроскопии, а также обработка полученных экспериментальных данных. Формулировка цели и постановка задач диссертационной работы проведены автором совместно с научным руководителем. Автор выступал на научных конференциях и осуществлял подготовку публикаций по материалам исследования совместно с соавторами.

Апробация результатов работы

Результаты работы представлены на 7 научных всероссийских и международных конференциях:

1. V международная конференция «UltrafastLight-2021», 04–08 октября 2021, Москва, Россия;
2. Международная конференция «FLAMN-22», 27–30 июня 2022, Санкт-Петербург, Россия;
3. VI международная конференция «UltrafastLight-2022», 03–07 октября 2022, Москва, Россия;

4. VII международная конференция «UltrafastLight-2023», 02–04 октября 2023, Москва, Россия;

5. Международная конференция «Saratov Fall Meeting-22», 26–30 сентября 2022, Саратов, Россия;

6. Международная конференция «Saratov Fall Meeting-23», 25–28 сентября 2023, Саратов, Россия;

7. IX международная конференция «UltrafastLight-2025», 29 сентября – 02 октября 2025, Москва, Россия.

Публикации

Основные результаты диссертации опубликованы в 6 статьях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, 7 материалах конференций. По материалам диссертации получен 1 патент. Список публикаций приведён на страницах 103–105 диссертации.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка цитированной литературы из 201 наименования. Объём диссертации составляет 131 страницу, включая 32 рисунка и 4 таблицы.

Глава 1. Физические методы борьбы с патогенными микроорганизмами (литературный обзор)

Обеспечение микробиологической безопасности в пищевой промышленности и медицинских учреждениях остается актуальной задачей даже для развитых стран. Болезни пищевого происхождения, вызываемые зараженными продуктами, продолжают занимать одно из ведущих мест среди причин заболеваемости в мире. Одновременно растет угроза антибиотикорезистентности – способности микроорганизмов противостоять действию препаратов, ранее эффективно подавлявших их рост. Этот феномен формируется вследствие чрезмерного и неконтролируемого применения антимикробных средств [16]. Сегодня антибиотикорезистентность признана одной из главных причин смертности. Проблема усугубляется широким использованием антибиотиков в сельском хозяйстве, в том числе для профилактики инфекций в животноводстве, где до сих пор отсутствует строгий контроль. В результате резистентные штаммы, сформированные в этой сфере, вовлечены в госпитальные вспышки инфекций. Последствия очевидны: удлинение сроков госпитализации, рост затрат на здравоохранение, увеличение летальности и снижение эффективности хирургических и трансплантационных процедур.

Современные технологии инактивации патогенных микроорганизмов должны соответствовать ряду критериев, продиктованных медицинскими и санитарно-эпидемиологическими требованиями: эффективность в отношении широкого спектра патогенов (бактерии, вирусы, плесневые грибы, включая резистентные штаммы), безопасность для человека и животных и отсутствие повреждений обрабатываемых материалов. Также ключевым принципом является исключение индукции резистентности: инактивация должна происходить без механизмов отбора устойчивых форм микроорганизмов.

В этой связи особый интерес представляют физические методы инактивации патогенов, в частности инактивация излучением. Ее ключевое преимущество

заключается в отсутствии вмешательства в метаболизм клетки. Воздействие направлено на разрушение структур, критически важных для жизнеспособности микроорганизмов – клеточной стенки, мембран, белков или ДНК за счет прямого физического эффекта (резонансное поглощение, термическое или фотохимическое повреждение), что минимизирует вероятность адаптации. Важным преимуществом является бесконтактность воздействия, что исключает риск перекрёстной контаминации и позволяет обрабатывать труднодоступные объекты. Локальность воздействия обеспечивает инактивацию микроорганизмов при минимальном воздействии на окружающий материал или биологические ткани. Излучение не требует использования химических реагентов, что важно для медицины, фармацевтики и пищевой промышленности. Другой значимый аспект – возможность гибкой настройки параметров (длина волны, мощность, длительность импульса), позволяющая создавать селективные и щадящие технологии для обработки сложных объектов, таких как продукты питания или биологические ткани. Это открывает перспективы разработки высокотехнологичных систем инактивации, соответствующих современным требованиям к безопасности и эффективности.

Механизмы воздействия электромагнитного излучения на клетку микроорганизма определяются его спектральным диапазоном: рентгеновское и гамма-излучение вызывают ионизацию молекул и радиационные повреждения, высокоэнергетическое ультрафиолетовое излучение инициирует фотохимические реакции, тогда как инфракрасное, микроволновое и СВЧ-излучение действуют преимущественно за счёт фототермического эффекта. Ниже рассмотрены основные технологии, получившие практическое применение и демонстрирующие наибольший потенциал для подавления патогенной микрофлоры.

1.1 Ионизирующее излучение

Стерилизация является ключевым этапом в производстве медицинских изделий и фармацевтической продукции. В развитых странах около 40–50 %

одноразовых медицинских изделий обрабатывают ионизирующим излучением (гамма-, рентгеновское излучение, электронный пучок). Также эту технологию применяют в сельском хозяйстве и пищевой промышленности для снижения микробной контаминации и повышения безопасности пищевых продуктов [17]. Воздействие ионизирующего излучения до 10 кГр считается безопасным с точки зрения радиоактивности, токсикологии, пищевой ценности и микробиологической безопасности [18]. Ионизирующее излучение инактивирует микроорганизмы двумя путями: напрямую, вызывая повреждения ДНК/РНК и других ключевых макромолекул, приводящие к гибели клеток и косвенно – через радиолиз воды с образованием активных частиц (гидратированные электроны, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 и др.), которые окисляют и фрагментируют клеточные компоненты и органические молекулы [19].

Гамма-стерилизация основана на ионизации вещества. Гамма-кванты взаимодействуют преимущественно с электронной оболочкой атомов и молекул, что приводит к образованию высокоактивных свободных радикалов. Образующиеся радикалы повреждают биополимеры (в том числе ДНК и клеточные мембранны), что вызывает гибель микроорганизмов. Поглощённая энергия не вызывает существенного повышения температуры изделия, что позволяет применять данный метод для стерилизации термочувствительных материалов. При энергиях, характерных для источников ^{60}Co и ^{137}Cs , гамма-излучение взаимодействует главным образом с электронной оболочкой, а вероятность фотоядерных реакций пренебрежимо мала, поэтому индуцированная радиоактивность облучённого материала практически отсутствует. Обработку проводят, размещая продукцию на заданное время вблизи изотопного источника до набора требуемой поглощённой дозы [20].

Гамма-излучение обычно используется для стерилизации газообразных, жидких, твердых материалов, гомогенных и гетерогенных систем в пищевой и медицинской промышленности [21, 22]. Однако стерилизация биомедицинских

полимеров гамма-облучением приводит к физическим изменениям, включающим охрупчивание, изменение цвета, появление запаха, затвердевание или размягчение, повышение или понижение температуры плавления и уменьшение молекулярной массы [23]. Помимо радиационно-индуцированного охрупчивания и снижения молекулярной массы полимеров, критичны процессы окисления и сшивания, остаточная активность радикалов и миграция примесей из упаковки. Для биологически активных материалов (коллаген, донорские ткани) существенна деградация белков. Для низкомолекулярных лекарственных форм – риск радиолитической модификации вспомогательных веществ. Эти эффекты требуют подбора дозы и атмосферы (например, инертный газ) и пост-облучательной выдержки.

Гамма-облучение обеспечивает высокий уровень стерильности, отсутствие химических остатков, большую проникающую способность (по сравнению с электронным пучком), низкотемпературный режим и относительную простоту валидации, однако требует значительных капитальных вложений [24]. Кроме того, несмотря на эффективность уничтожения микроорганизмов, гамма-облучение вызывает изменения молекулярной структуры и биомеханических свойств тканей и медицинских изделий, а также вызывает обеспокоенность по поводу безопасности облучённой пищи из-за потенциального онкогенного эффекта, что требует дальнейших исследований [25].

Другой метод стерилизации ионизирующим излучением – стерилизация с помощью электронного пучка. Это широко используемый метод в пищевой и фармацевтической промышленности, основанный на воздействии ускоренных электронов высокой энергии. Он нашел применение в медицине (лучевая терапия и брахитерапия), в природоохранной промышленности (дезинфекция сточных вод) и в химической промышленности (сшивание и полимеризация полиэтилена и полипропилена) [26].

Ускоренные электроны генерируются неядерным источником, а возможность гибкого контроля параметров излучения делает метод более удобным, чем гамма-стерилизация [27]. Главные преимущества – высокая скорость обработки, большая доза облучения за короткое время и отсутствие остаточных химических веществ. Метод позволяет непрерывно обрабатывать продукцию с точным контролем дозы. Ограничением является малая глубина проникновения по сравнению с гамма- и рентгеновским излучением, что ограничивает обработку плотных и толстых материалов [28]. Тем не менее, регулируемая энергия электронов делает метод безопасной и быстрой альтернативой традиционным способам стерилизации.

Рентгеновское излучение – электромагнитное излучение, возникающее при взаимодействии внешнего пучка электронов с электронными оболочками атомов мишени. Оно обладает высокой проникающей способностью – до 30–40 см, за счет чего может применяться в качестве эффективного средства для стерилизации медицинских изделий и пищевых продуктов [29]. При воздействии рентгеновских фотонов высокой энергии происходит ионизация атомов, интенсивность которой зависит от энергии излучения и свойств облучаемого материала. Степень ионизации определяется энергией фотонов и физическими свойствами вещества. Взаимодействие с водой приводит к радиолизу и образованию свободных радикалов. Рентгеновское излучение широко применяется для стерилизации медицинских изделий, упаковки, косметики и продуктов питания. Используется для обработки тканей доноров (кожа, кости, сухожилия, клапаны, роговица) с целью снижения риска передачи инфекций при трансплантации [30, 31]. Рентгеновская стерилизация сочетает высокую проникающую способность и равномерность дозы, что позволяет обрабатывать плотные и многокомпонентные изделия, включая продукцию на паллетах. Короткое время экспозиции минимизирует изменения физико-химических свойств материалов, особенно полимеров, что делает метод пригодным для чувствительных изделий. В последние годы рентгеновское и электронное излучение, генерируемое ускорительными

установками, приобретают приоритет над гамма-излучением благодаря управляемости, безопасности и возможности мгновенного включения и отключения источника [32].

Таким образом, гамма-облучение обеспечивает максимальную проникающую способность, высокую равномерность дозы на толстых изделиях, однако, не предполагает выключения источника. Электронный пучок обладает высокой энергоэффективностью и производительностью, возможностью выключения источника, но существенно меньшей глубиной проникновения и чувствительностью к геометрии изделий. Рентгеновское излучение является компромиссом по проникновению и равномерности дозы, но имеет более высокие энергетические затраты из-за потерь на конверсию. Все рассмотренные методы имеют высокую эффективность инактивации микроорганизмов и широко используются в медицине и промышленности, однако их применение сопряжено с высокими затратами на оборудование и потенциальными радиационными рисками для обслуживающего персонала. Для пищевых продуктов основными вопросами качества являются потеря питательных веществ, изменение вкуса и аромата, образование специфических радиолитических маркеров (например, циклобутанонов) [33].

1.2 Ультрафиолетовое излучение, коротковолновое излучение видимого диапазона

Ультрафиолетовое (УФ) излучение является одним из наиболее широко используемых методов физической инактивации патогенов [34]. Его бактерицидное действие детально изучено с классических работ по фотобиологии до современной литературы [35, 36]. УФ-облучение представляет собой одну из наиболее экономичных технологий инактивации микроорганизмов, обеспечивая минимальное количество химических остатков и незначительное тепловыделение за счёт фотохимических реакций, инициируемых поглощением УФ-фотонов. УФ-излучение используется для обеззараживания жидкостей, воздуха и поверхностей.

Эффект инактивации в отношении микроорганизмов и токсинов широко изучался и на различных пищевых материалах [37]. Однако его применение ограничено поверхностной инактивацией пищевых продуктов из-за его низкой проникающей способности [38].

По длине волны ультрафиолетовый спектр подразделяется на три области: УФ-А (315–400 нм), УФ-В (280–315 нм) и УФ-С (100–280 нм) [39]. Каждая из них оказывает инактивирующее воздействие через различные фотобиологические механизмы, среди которых наибольшее значение имеют: повреждение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) [39], структурные изменения и денатурация белков [41], а также генерация активных форм кислорода (АФК) [42]. АФК также разрушают клеточные компоненты, включая клеточные мембранные и белки, что приводит к гибели клеток [43].

Поглощение УФ-фотонов в различных спектральных диапазонах приводит к различным фотобиологическим эффектам. Диапазон УФ-С демонстрирует наибольшую эффективность в отношении микробной инактивации, особенно при длине волны ~ 254 нм, расположенной вблизи максимума собственного поглощения ДНК, обусловленного $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в системе сопряженных двойных связей пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеотидов [40, 44]. Механизм действия УФ-С излучения заключается в прямом воздействии на генетический материал клетки, такой как РНК (актуально для SARS-CoV2) и ДНК (актуально для ДНК-вирусов и бактериальных патогенов) [45]. При воздействии УФ-С на ДНК нарушаются процессы ее транскрипции и репликации, что приводит к повреждению структуры двухцепочечной ДНК и образованию циклобутановых пиримидиновых димеров и 6,4-фотопродуктов [46].

УФ-В менее энергетичное, чем УФ-С, но все еще обладает достаточной энергией для разрушения химических связей. При УФ-В облучении происходят как прямые фотохимические повреждения в биомолекулах (образование

цикlobутановых пиrimидиновых димеров и 6,4-фотопродуктов), так и АФК-зависимые.

УФ-А фотоны недостаточно энергетичны для модификации ДНК, но в присутствии фотосенсибилизаторов может вызывать окисление биомолекул через образование таких АФК, как гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$) и перекись водорода (H_2O_2) [47]. Рассматривают два механизма воздействия УФ-А на ДНК: электронный перенос и передача энергии с участием синглетного кислорода (тип I и тип II на рис. 1.1, соответственно). При электронном переносе (тип I) электрон с основания ДНК (преимущественно гуанина) передается на возбужденный фотосенсибилизатор (ФС). Возникает катион-радикал гуанина $\text{G}^{+\cdot}$, который затем превращается в окисленные производные, главным образом в 8-оксогуанин. Накопление 8-оксогуанина приводит к ошибкам репликации ДНК. В качестве фотосенсибилизаторов в данном процессе выступают рибофлавины, птерины, а также хинолоны (например, налидиксовая кислота). При втором механизме воздействия (тип II) возбужденный фотосенсибилизатор отдаёт энергию молекулярному кислороду, образуя $^1\text{O}_2$ с достаточно большим временем жизни по сравнению с другими короткоживущими радикалами, который избирательно окисляет гуаниновые остатки в ДНК. В роли фотосенсибилизаторов в данном механизме выступают порфирины и метиленовый синий.

Скорость инактивации бактерий УФ-А излучением довольно низка, однако повреждения клеток не восстанавливаются ДНК-фотолиазой, как в случае воздействия УФ-С излучением [49].

На практике используются три класса источников. Ртутные лампы низкого (254 нм) и среднего (200–300 нм) давления, эксимерные KrCl лампы (~222 нм) и УФ-С светодиоды (265–280 нм). Ультрафиолетовые лампы среднего давления дают вклад 185 нм, из-за чего может вырабатываться озон. В основном применяются для водоподготовки и обеззараживания воздуха ртутные и эксимерные лампы.

Светодиоды могут быть встроены в оборудование, однако на данный момент уступают по оптической мощности и КПД и требуют дальнейших разработок.

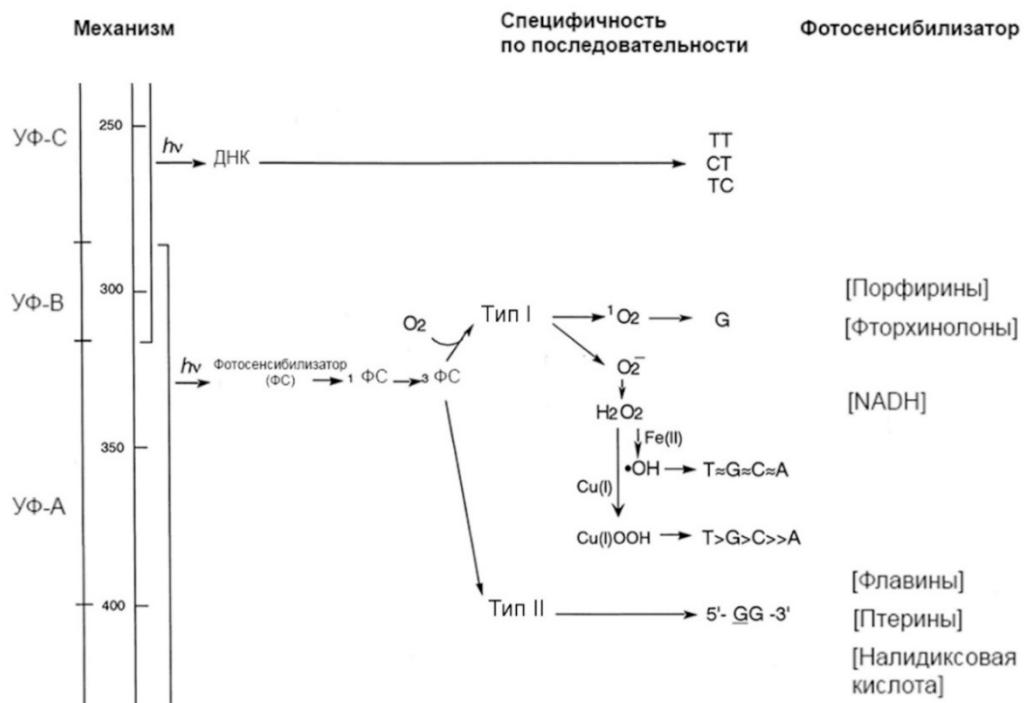


Рис. 1.1 Механизмы УФ-индуцированного повреждения ДНК, опосредованного фотосенсибилизаторами, и специфичность его последовательности [43].

На кинетику инактивации УФ-излучением влияют оптические свойства среды: УФ-прозрачность, мутность, рассеяние, тени, экранирование клетками. Для пищевых матриц это является ключевым ограничением. Имеет значение фаза роста микроорганизмов и их способность образовывать биопленку, для разрушения которой требуются более высокие дозы облучения.

УФ-излучение широко используется для обеззараживания воды, воздуха и поверхностей: в водоподготовке это зрелая технология, эффективная против бактерий, вирусов и устойчивых к хлору простейших (например, *Cryptosporidium parvum*), не приводящая к изменениям органолептических свойств [50] УФ-

рециркуляторы и открытые лампы используются для обеззараживания воздуха в помещениях – в больницах, лабораториях, пищевых производствах, а также в общественных местах [51]. Также УФ-излучение применяется для стерилизации поверхностей и медицинских инструментов, в пищевой промышленности – для обеззараживания упаковочных материалов, поверхностей конвейеров и стерилизации сырых пищевых продуктов [52].

К ключевым ограничениям УФ-инактивации относятся отсутствие остаточного действия и выраженная чувствительность к оптическим препятствиям: мутность, цветность, органические загрязнения, адсорбция на поверхностях и биоплёнки создают «теневые зоны» и снижают эффективность обработки. Дополнительно, из-за сильного УФ-поглощения тканями млекопитающих применение ограничивается требованиями фотобиологической безопасности ввиду мутагенного эффекта [53].

В последние годы облучение светодиодами синего (≈ 400 – 470 нм) и фиолетового (≈ 380 – 400 нм) диапазонов рассматривается как перспективный метод инактивации микроорганизмов, применимый как в медицине, так и в пищевой промышленности. В отличие от УФ-излучения, синий и фиолетовый свет обладает меньшей фототоксичностью для тканей человека, что позволяет использовать его в присутствии людей и даже для прямого воздействия на ткани при лечении инфекций, в том числе, вызванных мультирезистентными штаммами микроорганизмов [54].

Длины волн фиолетового и синего света, особенно вблизи 405 нм, обладают антимикробными свойствами и существуют возможности использования этих длин волн для борьбы с патогенными микроорганизмами во многих областях, включая дезинфекцию воздуха и открытых поверхностей [55–58].

Исследования механизма действия синего и фиолетового излучения показывают, что инактивация происходит в результате фотовозбуждения

внутриклеточных молекул порфиринов (в частности света с длиной волны 405 нм), флавинов и никотинамидных коферментов (NADH/NADPH) в бактериальных клетках. Реакция происходит без введения экзогенных фотосенсибилизаторов. Показано, что весь диапазон длин волн 400–425 нм может быть использован для инактивации бактерий, однако наибольшая антимикробная активность достигается при длине волны 405 нм [57]. Этот пик активности совпадает с максимумом поглощения молекул порфиринов, известным как полоса Сорета (~400–410 нм), находящимся в этом диапазоне длин волн [59]. Облучение на этой длине волны инициирует реакцию фотовозбуждения внутри микроорганизмов, при которой возбужденные порфирины взаимодействуют с кислородом или клеточными компонентами, образуя активные формы кислорода ($^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2). Гибель связывают преимущественно с разрушением клеточной мембраны (липидов) и белков (включая ферменты). Данные недавнего исследования также указывают на повреждение цитоплазматического содержимого и клеточных стенок золотистого стафилококка. Вероятно, вследствие неселективного действия АФК в микробных клетках индуцируется комплексное повреждение [60]. Грамположительные микроорганизмы демонстрируют большую чувствительность к излучению с длиной волны 405 нм, чем грамотрицательные [61]. Излучение с длиной волны 405 нм демонстрирует бактерицидный эффект в отношении биопленок [62]. Однако, при обработке биоплёнок межклеточный матрикс, как и в случае УФ-облучения, инактивирует активные формы кислорода, снижая эффективность воздействия, в связи с чем целесообразно использовать комбинированные подходы. Например, совместное действие перекиси водорода и облучения синим светом позволило дополнительно снизить количество КОЕ на 2–4 порядка [63].

Синее и фиолетовое излучение при условии использования при соответствующих уровнях интенсивности излучения безопасно для человека. Ограничениями применения синего и фиолетового излучения являются относительно меньшая глубина проникновения в обрабатываемую среду и более

низкая эффективность по сравнению с УФ-С при необходимости быстрой инактивации микроорганизмов.

1.3 Фотодинамическая инактивация

Фотодинамическая инактивация (ФДИ) – это метод уничтожения микроорганизмов путем активирования фотосенсибилизатора излучением длины волны, соответствующей спектру поглощения выбранного фотосенсибилизатора, для генерации активных форм кислорода [64]. Фотодинамическая терапия (ФДТ) разрабатывалась как альтернативный подход к лечению рака, и в отличие от традиционных методов лечения (хирургического вмешательства, химиотерапии и лучевой терапии), ФДТ не имеет серьезных побочных эффектов и позволяет чаще ее повторять [65,66]. Помимо онкологии, метод эффективен и при ряде инфекционных заболеваний – бактериальных, грибковых и вирусных, – которые, как и рак, характеризуются неконтролируемой пролиферацией и наличием клеток-мишеней, подлежащих уничтожению. В таком контексте данный подход называют антимикробной фотодинамической терапией или фотодинамической инактивацией. ФДИ показала высокую эффективность в отношении широкого спектра микроорганизмов, включая мультирезистентные патогенные бактерии, споры и грибки [67, 68].

При ФДИ могут применяться как экзогенные фотосенсибилизаторы (порфирин-содержащие соединения, хлорины, фталоцианины, бензопорфирины, производные аминолевулиновой кислоты, а также современные наноструктурированные платформы, включая наночастицы и металлоорганические каркасы), так и эндогенные – молекулы, естественным образом присутствующие в клетках (порфирины, flavины, птерины и др.) [64, 69–71]. Фотосенсибилизатор избирательно связывается с клеточными структурами микроорганизма, после чего облучается светом определённого спектрального диапазона (чаще в синей или красной области), что приводит к генерации АФК,

вызывающих гибель клетки за счёт окислительного повреждения её компонентов (липидов, белков и нуклеиновых кислот) [72].

Фотосенсибилизаторы должны отвечать ряду требований: быть нетоксичными в темноте, особенно по отношению к клеткам млекопитающих, обладать высоким квантовым выходом образования АФК, иметь большой молярный коэффициент поглощения в диапазонах длин волн, обеспечивающих глубокое проникновение света в ткани (красный и ближний ИК-диапазон), избирательно накапливаться в микробных клетках по сравнению с клетками млекопитающих, особенно при коротком времени инкубации [73].

ФДИ эффективна независимо от устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и не приводит к формированию резистентности [74]. Отсутствие индукции резистентности было подтверждено даже после 20 последовательных циклов частичной инактивации с последующим восстановлением роста [75]. К преимуществам метода также относится возможность локальной доставки фотосенсибилизатора непосредственно в инфицированную область. Это особенно важно при хронических инфекциях, ассоциированных с формированием бактериальных биоплёнок, которые плохо проницаемы для антибиотиков. Показано, что ФДИ способна уничтожать клетки в составе биоплёнок как *in vitro*, так и *in vivo* [76], что нашло применение, в частности, в стоматологии – при лечении пародонтита и периимплантита [77]. Ещё одна область применения – лечение ожогов, где нарушенное кровоснабжение препятствует достижению терапевтических концентраций антибиотиков в зоне поражения. В отличие от антибиотиков, для которых требуется несколько часов или даже дней, ФДИ обеспечивает быстрое уничтожение микробных клеток (в течение секунд), что даёт преимущество при быстропрогрессирующих инфекциях. Широкий спектр действия ФДИ позволяет начинать терапию до идентификации возбудителя [78]. Фотосенсибилизатор и излучение могут быть доставлены практически в любую

анатомическую область с использованием эндоскопов, интерстициальных игл и волоконно-оптических систем [79].

Фотодинамическая инактивация имеет ряд ограничений. Во-первых, из-за небольшой глубины проникновения излучения требуется прямой доступ света к обрабатываемому объекту. Во-вторых, метод зависит от наличия кислорода и малоэффективен в анаэробных условиях. Обязательным условием является наличие фотосенсибилизатора, который необходимо подбирать в соответствии с конкретной задачей.

1.4 Импульсное излучение высокой интенсивности

Импульсное излучение высокой интенсивности (ИИВИ) относится к современным нетермическим методам деконтаминации, при котором поверхность пищевых продуктов или упаковочных материалов облучается короткими вспышками ламп, генерирующих широкополосное излучение от ультрафиолетового до ближнего инфракрасного диапазона. Длительность импульсов варьируется от наносекунд до миллисекунд [80]. Эта технология рассматривается как альтернатива традиционной термической обработке и эффективно инактивирует широкий спектр патогенных микроорганизмов, включая бактерии, дрожжи, плесневые грибы и вирусы [81, 82].

Механизм инактивации при ИИВИ еще обсуждается, но считается, что летальное воздействие на микроорганизмы оказывают преимущественно фотохимический и фототермический механизмы. Фотохимический механизм, обусловленный воздействием УФ-излучения, включает формирование пиридиновых димеров в результате фотохимической реакции и ингибирование формирования новых цепочек ДНК бактерий, вирусов и других патогенных микроорганизмов в процессе репликации при делении клетки. Таким образом, излучение УФ-диапазона при ИИВИ обработке является определяющим эффективность метода [83, 84]. В ряде работ подтверждено, что при фильтрации

ультрафиолетового излучения с длиной волны менее 320 нм эффект инактивации не достигается [85, 86].

Несмотря на то, что вклад излучения УФ-диапазона является определяющим для инактивации, инактивация ИИВИ значительно отличается от таковой при облучении непрерывным УФ-излучением. Традиционная УФ-обработка в первую очередь воздействует на ДНК, изменения в которой могут быть обратимы при определенных условиях. Эксперименты, направленные на проверку ферментативной репарации ДНК после обработки импульсным излучением, показали, что подобного восстановления не происходит. Предполагается, что степень повреждения, вызванного импульсным светом, слишком велика для функционирования механизмов восстановления ДНК, либо происходит инактивация белков, отвечающих за репарацию ДНК или другие ферментативные функции [87].

Метод ИИВИ эффективно применяется для обеззараживания твердых и жидкых пищевых продуктов, а также порошков [88]. Эффективность инактивирующего воздействия импульсного света зависит от интенсивности излучения и количества подаваемых импульсов. Эффективность метода связана с локализацией микроорганизмов и теневыми эффектами. Например, в порошках муки и черного перца дрожжи инактивируются с разной эффективностью, что объясняется, в том числе, цветом продукта [89]. Эффективность обеззараживания жидкостей зависит от их оптической плотности: в прозрачных жидкостях достигается значительно большее снижение КОЕ, чем в непрозрачных средах [90, 91].

Хотя ИИВИ позиционируется как нетепловая технология, длительное воздействие вызывает повышение температуры, что может привести к ухудшению качества продуктов. Так, после инактивации ИИВИ были обнаружены разрушения структуры мембранны клетки, что связано с термическим воздействием [92]. Исследования подтверждают, что ИИВИ остаётся нетепловым только при

непродолжительных воздействиях [93]. Эффективность ИИВИ ограничена его низкой степенью проникновения, поэтому инактивированы могут быть микроорганизмы, находящиеся на поверхности продукта, или в прозрачных жидкостях. Стерилизация упакованных продуктов возможна, если упаковка прозрачна для ультрафиолетового излучения. В непрозрачных средах импульсный свет может использоваться для обработки поверхности только на глубину 2 мкм [94]. Состав пищевых продуктов также влияет на эффективность обеззараживания. Продукты с высоким содержанием белка или жирные продукты не подходят для обеззараживания данным методом. Часть излучения поглощается белками и маслами, что снижает эффективную дозу облучения, необходимую для инактивации микробов [95].

1.5 Низкотемпературная плазма

В течение последних нескольких лет технология низкотемпературной («холодной») плазмы приобрела важное значение как перспективный метод стерилизации в пищевой промышленности и сельском хозяйстве [96, 97]. Преимуществами низкотемпературной плазмы являются отсутствие токсичных остатков, низкое энергопотребление, простота оборудования и возможность обработки термочувствительных объектов при близких к комнатной температуре условиях [98]. Технология использует химически реактивные газы для инактивации патогенных микроорганизмов, включая бактерии, вирусы и плесневые грибы, в жидкостях, газовой фазе, биотканях и на твердых поверхностях [99]. Метод основан на использовании высоковольтных источников напряжения для формирования пробоя рабочего газа (например, кислорода, азота или гелия) без применения химических реагентов.

Особенность низкотемпературной плазмы состоит в том, что электроны имеют энергию порядка 1–3 эВ, а нейтральный газ и тяжелые частицы остаются при температуре, близкой к комнатной. Химический состав газа принципиально влияет на процессы, инициируемые плазмой, поскольку некоторые химические

элементы более реакционноспособны, чем другие. При рекомбинации ионов высвобождается энергия в виде квантов ультрафиолетового и видимого излучения, которые воздействуют на бактерии. Количество выделяемой энергии зависит от химического состава плазмы, её плотности и температуры. Системы низкотемпературной плазмы реализуются на основе различных технологий генерации: скользящий дуговой разряд, плазма однородного разряда, плазменная струя, разряд с диэлектрическим барьером и др. Как правило, плазма создаётся путём пропускания электрического разряда через инертные газы при комнатной температуре в различных атмосферных условиях (атмосферное, высокое или низкое давление) [100].

Существует три основных механизма инактивации микроорганизмов низкотемпературной плазмой [102]. Это химическое взаимодействие радикалов или заряженных частиц с клеточными мембранами, повреждение мембран и внутренних клеточных компонентов ультрафиолетовым излучением и разрушение ДНК микроорганизма ультрафиолетовым излучением, генерируемым при рекомбинации частиц плазмы (рис. 1.2). Значительное количество исследований показывает, что доминирующее биоцидное воздействие оказывают реакционные формы частиц (O_2^- , O_3 , He^* , N_2^+ и др., в зависимости от буферного газа). Влияние УФ-излучения остаётся предметом дискуссий: в одних исследованиях оно обозначается как ключевой фактор [103], в других – как незначительное или отсутствующее [104]. Для разных продуктов могут подходить различные антимикробные механизмы, поэтому максимальная дезинфицирующая эффективность достигается за счёт плазмы, использующей множество механизмов одновременно [80]. Эффективность низкотемпературной плазмы может быть усиlena добавлением химических веществ, например, воды или эфирных масел. При инъекции воды в буферный газ (повышенная влажность) в реакционные процессы вводятся активные частицы H и H_2O_2 . Добавление органических веществ вносит в смесь углерод. Эксплуатационные затраты систем низкотемпературной плазмы варьируются в зависимости от используемой технологии и включают

расходы на электроэнергию, буферный газ, усиливающие эффективность химические реагенты, а также текущие расходы на ключевые элементы конструкции: уплотнители, электроды, контрольные датчики, термопары [100].

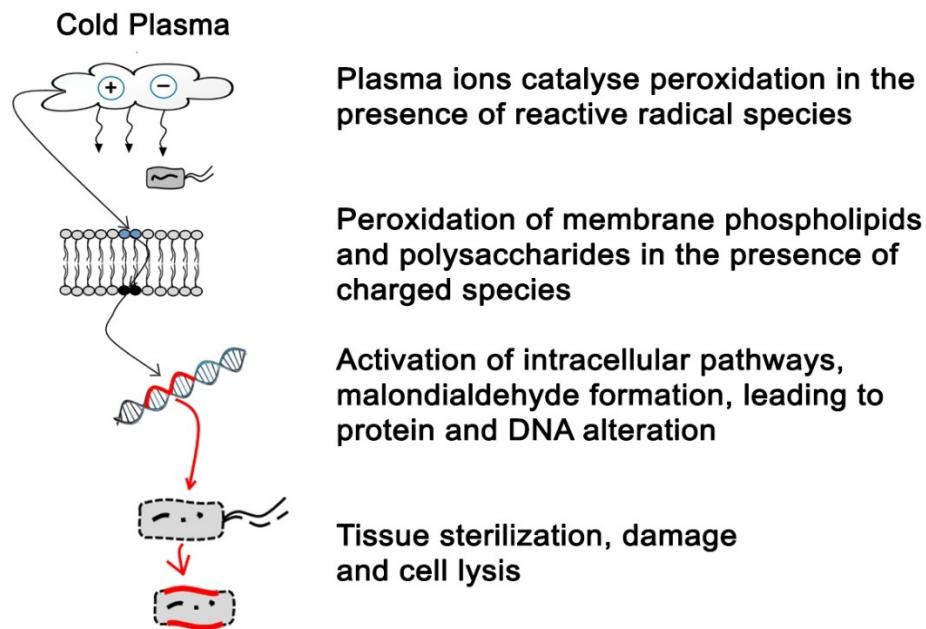


Рис. 1.2 Механизм инактивации микроорганизмов при обработке низкотемпературной плазмой [101]

Несмотря на значительные преимущества, технология низкотемпературной плазмы имеет ряд ограничений. Во-первых, для генерации плазмы требуется специальная газовая среда, что усложняет процесс и повышает эксплуатационные затраты. Во-вторых, масштабирование и интеграция систем низкотемпературной плазмы в промышленные условия остаются технически сложными задачами из-за необходимости обеспечения равномерного и контролируемого воздействия на большие объемы продукции или поверхностей. Наконец, при применении низкотемпературной плазмы в медицине или пищевой промышленности существует риск потенциального повреждения тканей или продуктов из-за реакционноспособных частиц и ультрафиолетового излучения, что требует точного контроля параметров обработки и тщательной оценки безопасности [105, 106].

1.6 Высоко- и сверхвысокочастотный электромагнитный нагрев

Сверхвысокочастотный (микроволновый, СВЧ) и радиочастотный (высокочастотный, ВЧ) нагрев относятся к современным методам диэлектрической термической обработки, основанным на одном принципе: переменное электрическое поле высокой частоты вызывает образование тепла внутри материала вследствие вращения дипольных молекул и ионной проводимости. Эти технологии активно применяются для сушки и выпечки, предварительной термообработки мясных изделий, а также для размораживания замороженных продуктов. Диэлектрический нагрев обеспечивает равномерную стерилизацию пищевых продуктов, сочетая высокую скорость, объемный характер нагрева, быстрое проникновение тепла и небольшое время обработки. Основным ограничением метода остаётся риск неравномерного распределения температуры и образования «холодных точек», где микроорганизмы способны выжить и возобновить рост при благоприятных условиях [107].

В электромагнитном спектре СВЧ охватывают диапазон 300 МГц–300 ГГц, а радиочастоты – 3 кГц–300 МГц. Оба типа излучения применимы к диэлектрическим материалам с низкой электропроводностью. Поскольку они попадают в радиолокационный диапазон и могут создавать помехи для телекоммуникаций, для промышленного, научного и медицинского применения установлены фиксированные частоты: для СВЧ – 915 и 2,45 ГГц, для РЧ – 13,56, 27,12 и 40,68 МГц [108, 109]. В случае СВЧ установлено, что частота 2,45 ГГц эффективно нагревает воду, что является одной из причин уничтожения биологических организмов микроволновым излучением, а на частоте 915 МГц проще реализовать одномодовые резонаторные камеры для работы с крупными объектами, что особенно важно в пищевой промышленности [110].

В микроволновом и радиочастотном диапазоне инактивация микроорганизмов инактивация происходит за счет термических эффектов. Однако, может происходить при сублетальных температурах за счёт совокупности

эффектов: воздействия электрического поля, селективного нагрева, электропорации и разрушения клеточной мембранны. Хотя оба метода основаны на взаимодействии переменного электрического поля с дипольными молекулами и ионными токами, но они различаются частотой и глубиной проникновения: микроволновое излучение более эффективно для продуктов с низким содержанием диполей, тогда как радиочастотное подходит для материалов с высокой ионной проводимостью и для массивных образцов из-за большей глубины прогрева [111]. Механизм инактивации остаётся предметом дискуссий: часть исследований указывает на термическую природу инактивации, другие предполагают наличие нетермических эффектов [112]. Термический механизм связан с фазовым запаздыванием дипольной поляризации воды относительно высокочастотного электрического поля и с омическими потерями, что ведёт к диссипации энергии и локальному перегреву, повреждающему клеточные структуры [113]. При воздействии переменного электрического поля полярные молекулы стремятся выстроиться по полю, что описывается частотной зависимостью комплексной диэлектрической проницаемости. По мере роста частоты действительная часть ϵ' (характеризующая степень поляризации молекул) постепенно снижается, а мнимая часть ϵ'' (коэффициент потерь) возрастает, достигая максимума в СВЧ-диапазоне, и значительная часть энергии поля уходит в тепло. С дальнейшим ростом частоты ϵ'' падает (рис. 1.3).

К нетепловым воздействиям СВЧ-излучения относятся нарушение целостности мембранны за счёт прямого воздействия переменного электромагнитного поля на заряженные и полярные группы в липидном бислое, воздействие на ионные каналы и транспорт и изменение активности ферментов вследствие колебаний дипольных молекул, не связанных с нагревом [114]. В отдельных исследованиях сообщается о возможном повреждении ДНК, но этот механизм остаётся дискуссионным, и, как и другие тепловые эффекты, требует дальнейших исследований [115]. Радиочастотное воздействие может вызывать гибель клеток как за счёт теплового разрушения, так и посредством механического

повреждения: заряженные микробные клетки под действием поля совершают быстрые колебания, превышающие предел их упругости, что приводит к разрыву мембраны и гибели клетки [116].

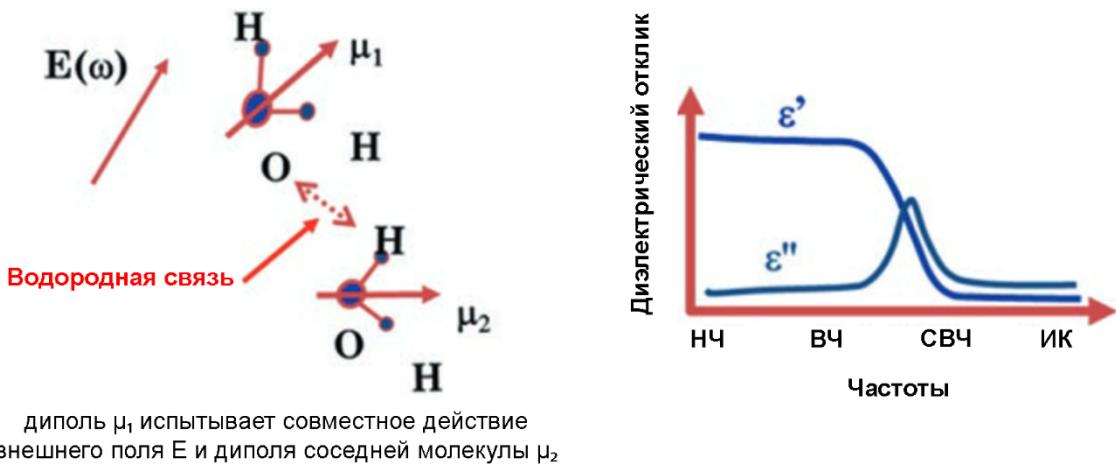


Рис. 1.3 Иллюстрация диэлектрического отклика молекулы воды, подверженной изменению частоты переменного электрического поля (низкие частоты (НЧ), высокие частоты (ВЧ), микроволны (СВЧ), инфракрасное излучение (ИК)); μ_1 и μ_2 – дипольные моменты соседних молекул H_2O [117].

Диэлектрический нагрев используется для обработки упакованных пищевых продуктов, обеспечивая более равномерный нагрев, сокращенное время процесса и лучшее сохранение питательных веществ и цвета по сравнению с традиционными методами [118]. СВЧ частота 915 МГц обеспечивает большую глубину проникновения, чем 2,45 ГГц, однако требует большего времени экспозиции [119]. При больших глубинах естественной альтернативой становится ВЧ-инактивация. Микроволновая и радиочастотная обработка показали эффективность для инактивации плесневых грибов и микотоксинов в пищевых продуктах [120]. В ряде исследований продемонстрирована высокая эффективность инактивации патогенов (*Listeria*, *Salmonella*, *E. coli*, дрожжи, плесень) – до 9 порядков снижения колониеобразующих единиц [121, 122].

С точки зрения качества продуктов, ВЧ/СВЧ-нагрев позволяет лучше сохранять витамин С, цвет и текстуру, но в некоторых случаях наблюдается ускоренное разрушение ферментов и питательных веществ по сравнению с традиционным нагревом [123]. Оптимизация параметров процесса (частота, мощность, время, состав продукта) критически важна для достижения максимальной безопасности. Однако, переход к промышленному стандарту сдерживают недостаток данных о диэлектрических свойствах при высоких температурах, невалидированные модели нагрева для жидкостей, дефицит исследований на ключевых частотах, а также нерешённые задачи масштабирования.

1.7 Инфракрасное излучение

Инфракрасное излучение (ИК) представляет собой электромагнитное излучение в диапазоне длин волн 0,78–1000 мкм. Тепловое воздействие инфракрасного излучения традиционно применяется для термической обработки пищевых продуктов с целью обеспечения их безопасности и увеличения срока хранения. Таким образом, применение ИК-излучения является одним из старейших методов обработки пищевых продуктов. Инфракрасный нагрев может использоваться для пастеризации и стерилизации с высокой тепловой эффективностью и скоростью нагрева по сравнению с традиционным процессом нагревания. Изменения качества продуктов при этом значительно ниже [124, 125]. По сравнению с микроволновым методом ИК-нагрев обеспечивает более равномерный прогрев поверхности и сердцевины продуктов.

1.7.1 Биологические мишени инфракрасного излучения

Широкий диапазон ИК-излучения подразделяется на ближний (0,75–3 мкм), средний (3–30 мкм) и дальний ИК (30–1000 мкм) [126]. Диапазон ИК-излучения 2,5–200 мкм обычно используется в современных методах обработки пищевых продуктов [127]. ИК-инактивация микроорганизмов основана на тепловом

повреждении белков, нуклеиновых кислот и клеточных оболочек. При поглощении ИК-излучения возрастает температура в результате колебательного возбуждения молекул, что, в свою очередь, приводит к физическим и химическим изменениям в веществе. Эффективность поглощения сильно зависит от длины волны излучения. Хромофорами в среднем ИК-диапазоне являются вода и органические молекулы. У биоматериалов в среднем ИК-диапазоне находится ряд сильных полос поглощения, относящихся к колебаниям химических связей в воде и различных структурных компонентах (белках, липидах, сахараах) (таблица 1, рис. 1.4). Аминокислоты, полипептиды и белки имеют сильные полосы поглощения в диапазоне 3–4 и 6–9 мкм, липиды – 3–4, 6 и 9–10 мкм, углеводы 3 и 7–10 мкм. Вода имеет полосы поглощения 3, 4,7 и 6 мкм [8].

Несмотря на большой вклад воды в поглощение ИК-излучения в живых системах, помимо колебаний молекул воды, необходимо учитывать мезоструктуру биоткани, при которой белки имеют решающее значение для общей биологической активности. В свою очередь функционирование белков зависит от гидратной оболочки. Таким образом, свойства тканей (даже на клеточном уровне) зависят от содержания воды и изменяются в зависимости от него [129]. Причиной гибели микроорганизмов при температуре выше 60°C может быть главным образом денатурация белка [128]. Белки являются важным компонентом, отвечающим за пролиферацию клетки и выполняющим ряд функций: активация биокатализитических реакций, перенос электронов, и мембранныя функция [136].

Белки, а также РНК являются наиболее уязвимыми мишениями для ИК-излучения по сравнению с клеточной стенкой и ДНК [131]. Есть данные, показывающие, способность ИК-излучения приводить к деградации РНК у микроорганизмов в воздухе, что указывает на возможность его применения в отношении РНК-вирусов [132].

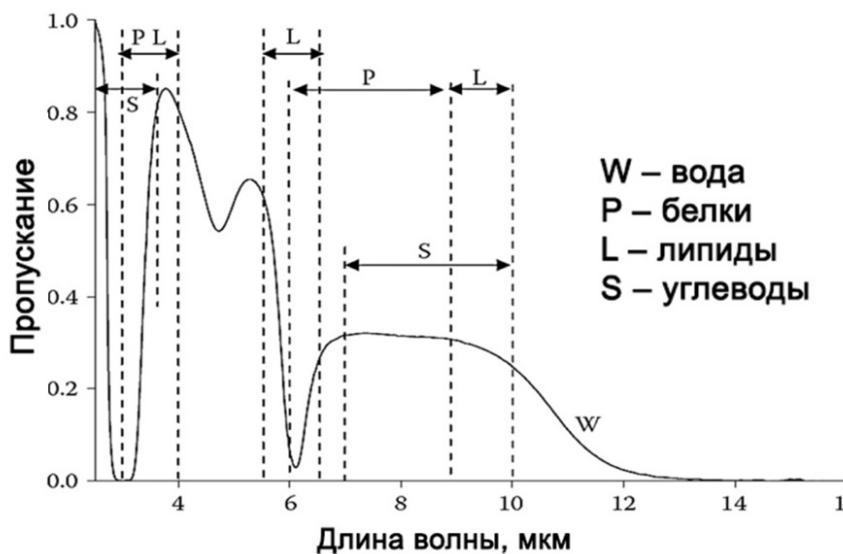


Рис. 1.4 Полосы поглощения основных компонентов пищи относительно спектра воды [8].

Таблица 1. Длины волн поглощения основных компонентов пищевых продуктов и соответствующие им химические связи [130].

Компонент	Химическая группа, ответственная за поглощение ИК-излучения	Длина волны поглощения, мкм
Сахара	Гидроксильная группа О–Н	2,7–3,3
Липиды, сахара, белки	Алифатические углеводородные связи	3,25–3,7
Липиды	Карбонильная группа (С=О) липидов	5,71–5,76
Белки	Карбонильная группа (С=О) амидов	5,92
Белки	Азот-водородная группа (–NH–)	2,83–3,33
Ненасыщенные липиды	С=С	4,44–4,76

До сих пор обсуждаются механизмы структурных трансформаций сложных молекул под действием ИК-излучения. ИК-воздействие включает в себя термический и нетермический эффекты. Термические эффекты проявляются в

результате поглощения ИК-квантов молекулами и усиления их колебаний и вращения. Нетермические эффекты возникают в результате взаимодействия полярных звеньев в молекулах под действием электромагнитного поля до того, как поглощается достаточная энергия для возникновения термических эффектов [133]. В итоге, комбинированное воздействие ИК-излучения может привести к конформационным изменениям в молекулах. В работе [134] показано, что после ИК-воздействия в белке уменьшается количество α -спиралей и возрастает количество β -складчатостей и случайных спиралей. Моделирование молекулярной динамики инактивации фермента полигалактуроназы ИК-излучением показало разрушение вторичной структуры фермента в результате увеличения количества случайных спиралей (65,62%), сокращения количества β -складчатостей (29,11%) и межмолекулярных водородных связей при более выраженном термическом влиянии [135]. В работе [137] утверждается, что ИК-нагрев инактивирует микроорганизмы в результате разрушения их внутриклеточных компонентов, таких как ДНК, РНК, рибосомы, белки и клеточные стенки. ИК-нагрев приводит как к внешнему, так и к внутреннему повреждению клеток.

1.7.2 Широкополосные источники инфракрасного излучения

Широкополосные тепловые источники инфракрасного излучения формируют энергию в диапазоне длин волн от коротковолнового (≈ 1 мкм) до дальнего ИК. Любое тело с температурой выше абсолютного нуля испускает ИК-излучение, спектр и интенсивность которого определяются температурой источника в соответствии с законом Стефана-Больцмана. На практике для нагрева и инактивации микроорганизмов применяются электрические и газовые ИК-нагреватели, работающие при температурах 1100–2200 °C и 343–1100 °C, соответственно. Электрические источники более распространены благодаря простоте управления, высокой скорости нагрева и возможности подбора оптимальной длины волны для конкретного процесса. Рабочая эффективность электрических ИК-излучателей достигает 40–70%, газовых – 30–50% [138]. Для

большинства промышленных применений оптимальный диапазон длин волн составляет 1,17–5,4 мкм, что соответствует температурам 260–2200 °С, при которых теплообмен за счёт излучения наиболее эффективен [139].

На эффективность инактивации микроорганизмов с помощью инфракрасного нагрева влияние оказывают мощность инфракрасного излучения, температура продукта, максимальная длина волны и полоса пропускания источника ИК-нагрева, тип микроорганизма и его физиологическая фаза, а также размер и тип продукта. Также установлено, что термостойкость микроорганизмов значительно возрастает с уменьшением влажности продукта [140].

Излучение среднего инфракрасного диапазона обеспечивает более эффективный нагрев по сравнению с конвективной сушкой горячим воздухом, что связано с высокой плотностью потока энергии и её преимущественным поглощением в приповерхностном слое. Поскольку большая часть энергии падающего излучения в дальнем ИК-диапазоне поглощается поверхностью, метод лучше всего подходит для нагрева поверхности пищевых продуктов, что было подтверждено экспериментально [141] и с помощью математических моделей [142].

ИК-инактивация показала свою эффективность в отношении широкого спектра патогенов в различных средах [143–145]. В процессе ИК-пастеризации при выдержке 3 мин при 80 °С и 2 мин при 85 °С достигнуто снижение *Listeria monocytogenes* более чем на 6,4 порядка для смеси из четырёх штаммов [146]. Нагрев до 120 °С с последующим охлаждением до 90 °С и выдержкой 5 мин обеспечивал снижение колониеобразующих единиц *Pediococcus spp.* более чем на 5 порядков на поверхности миндаля [147]. В экспериментах на кишечной палочке обнаружено, что бактерии более чувствительны к инфракрасному нагреву, чем к кондуктивному [148]. Другие исследования показали, что ИК-нагрев наносит больший ущерб стенкам клеток, которые находились в экспоненциальной фазе роста: снижение КОЕ на 3,9 порядка в клетках экспоненциальной фазы по

сравнению со снижением КОЕ на 1,8 порядков в клетках стационарной фазы достигнуто при обработке клеток ИК-излучением мощностью $3,2 \text{ кВт/м}^2$ в течение 5 минут [149]. Споры патогенных микроорганизмов значительно устойчивее вегетативных клеток из-за физиологических адаптаций к стрессам, включающим тепло, химические вещества и излучение, что делает их трудными для инактивации [150]. Наиболее эффективным методом уничтожения спор является термический нагрев до высоких температур ($>121^\circ\text{C}$). ИК-излучение использовалось для инактивации спор *Bacillus cereus* на поверхности зерна и в порошках специй, при этом повышение температуры и активности воды увеличивает эффективность инактивации. Исследования показали, что ИК-излучение среднего диапазона эффективнее ближнего, так как лучше поглощается компонентами спор, приводя к их активации и превращению в вегетативные клетки, которые затем уничтожаются теплом или другими методами [151].

ИК-излучение рассматривается как безопасная, быстрая и безреагентная альтернатива традиционным методам дезинсекции зерна (например, метилбромиду). Применение каталитических ИК-излучателей позволило нагреть заражённый рис до 61°C с последующей выдержкой в течении 1 минуты, что обеспечило полную гибель взрослых насекомых, личинок и яиц *Rhizopertha dominica* и *Sitotroga cerealella* при минимальных изменениях качества зерна. Эффект основан на селективном нагреве насекомых, имеющих более высокую влажность по сравнению с зерном [152]. Основными параметрами, влияющими на качество продуктов и эффективность их обезвреживания, являются расстояние от источников ИК-излучения до продукта и время обработки. Для минимизации теплового воздействия важно поддерживать температуру чуть ниже критического уровня. Это побуждает исследователей искать оптимальные параметры процессов путем моделирования. В [153] использовано моделирование трассировки лучей методом Монте-Карло для анализа эффективности обработки дальним ИК для обеззараживания поверхности клубники. Предложена оптимальная схема обработки, состоящая из расположения нагревателей с 4 сторон в комбинации с

циклическим нагревом. В работе [154] разработана модель инактивации микроорганизмов с учетом температурно-временного профиля ИК-нагрева с учетом эффекта испарения для оценки эффективности ИК-обработки. Также была исследована интенсивность нагрева, зависящая от расстояния. В результате предложенная модель хорошо предсказала профили температуры поверхности агара во всех точках со средней погрешностью $\pm 2,0$ $^{\circ}\text{C}$.

1.7.3 Селективные (узкоспектральные) источники инфракрасного излучения

Как было сказано выше, различные структурные компоненты биомолекул имеют неоднородное поглощение в среднем ИК-диапазоне (таблица 1). Это позволило предположить, что целесообразно выполнять обработку излучением с выбранными длинами волн в диапазоне максимального поглощения теми или иными структурными элементами, увеличив таким образом эффективность метода (рис. 1.5).

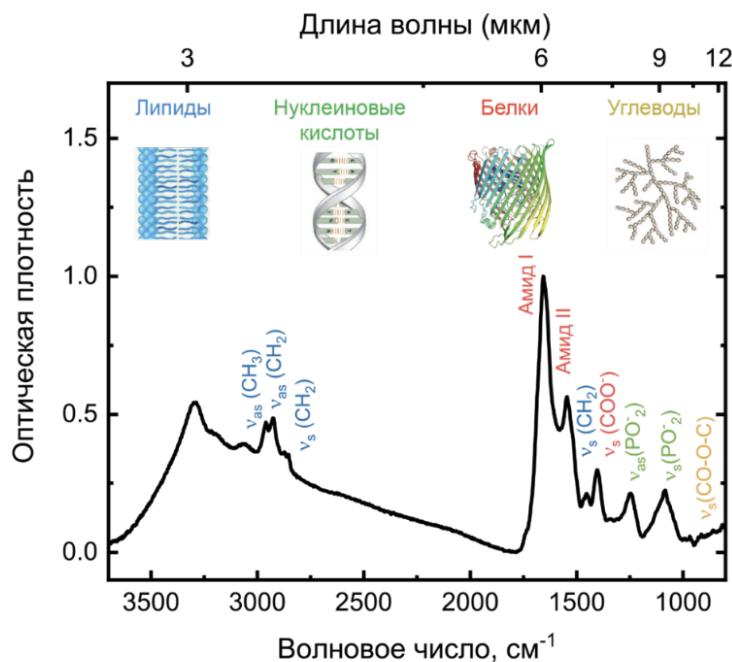


Рис. 1.5 Спектр оптической плотности образца бактериальной культуры в диапазоне 800–3700 см^{-1} .

Селективные инфракрасные источники отличаются от широкополосных тем, что их излучение сконцентрировано в узком диапазоне длин волн, совпадающем с полосами поглощения белков или липидов. Данное спектральное соответствие позволяет осуществлять избирательный нагрев целевых биологических структур при минимальном термическом воздействии на окружающую матрицу продукта. Селективный нагрев обеспечивает более высокую эффективность инактивации при более низкой общей температуре, что особенно важно для термочувствительных пищевых продуктов и биоматериалов. В контексте пищевой промышленности длины волн выше 4,2 мкм наиболее желательны для оптимальной ИК-обработки пищевых продуктов из-за преимущественного поглощения энергии водой на длинах волн ниже 4,2 мкм [155].

При воздействии селективным излучением эффективность поглощения также определяется и сечением поглощения. Сечения поглощения в среднем ИК-диапазоне определяются характером фундаментальных колебательных полос, например, C–H, C–N, N–H и т.д. Сечение растет в центре этих полос и резко падает в окнах. В работе [156] авторы измерили инфракрасные сечения поглощения уксусной кислоты (CH_2COOH) в диапазонах около $\sim 2950 \text{ см}^{-1}$ (C–H связи) и $\sim 1745 \text{ см}^{-1}$ (C=O связь), сечения поглощения составляют $1,2 \times 10^{-18} \text{ см}^2 \cdot \text{молекула}^{-1}$ и $3,4 \times 10^{-17} \text{ см}^2 \cdot \text{молекула}^{-1}$, соответственно.

Получение селективного излучения осуществляется за счет использования фильтров на требуемые диапазоны длин волн. Концепция селективного нагрева в дальнем инфракрасном диапазоне была применена для инактивации спор *Aspergillus niger* и *Fusarium proliferatum* в кукурузной муке [157]. Показано, что селективный нагрев в спектральном диапазоне от 5,88 до 6,66 мкм денатурирует белковые компоненты спор, демонстрируя повышенную летальность (~40% при 5–минутной выдержке) по сравнению с обычным широкополосным излучением. Для инактивации микроорганизмов (плесени и бактерий) на неочищенном рисе использование излучения с длиной волны 3,2 мкм обеспечило более значительное

снижение численности микроорганизмов по сравнению с широкополосным ИК-излучением, что связано с более высокой интенсивностью селективного излучения. Оба вида обработки были более эффективны для подавления роста плесневых грибов, чем роста аэробных бактерий [9].

Из различных методов термической обработки метод ИК-нагрева является наиболее перспективным для применения как на малых, так и на крупных предприятиях пищевой промышленности. Технология демонстрирует большой потенциал в различных областях применения благодаря присущим ей преимуществам, таким как контролируемый, быстрый и равномерный нагрев, высокая энергоэффективность, экологичность, высокая скорость теплопередачи, короткое время обработки. Данный метод сохраняет эффективность при неблагоприятных условиях эксплуатации (наличие пылевых частиц, пористая структура обрабатываемых поверхностей) и не приводит к образованию остаточных органических или неорганических загрязнителей. Технология может быть легко интегрирована в непрерывную технологическую линию. Однако, на текущий момент системы селективной ИК-инактивации не задействованы в промышленности. Их исследования ограничиваются небольшим количеством видов патогенов и продуктов питания.

1.8 Лазерное излучение

Лазеры являются источниками когерентного и монохроматического излучения, параметры которого (длина волны, мощность, длительность импульса и частота следования импульсов) могут точно регулироваться в зависимости от задач инактивации патогенных микроорганизмов. Такое излучение позволяет направленно вносить энергию в заданный объём, сводя к минимуму повреждения окружающей среды или обрабатываемого продукта.

1.8.1 Лазеры, обеспечивающие электронное возбуждение

Механизмы взаимодействия лазерного излучения с биологическими объектами обусловлены селективным поглощением света молекулярными хромофорами, присутствующими в этих объектах и обладающими характерными полосами поглощения. Механизмы инактивации включают фототермический (нагрев и денатурация белков), фотомеханический (ударные волны и кавитация) и фотохимический (генерация АФК, повреждение нуклеиновых кислот) эффекты [133]. При фотохимической реакции при поглощении фотонов высокой энергии молекулами вещества могут быть разорваны химические связи, что активирует ряд химических процессов, включая образование АФК, сшивание полимерных цепей или их разрыв.

Инактивация микроорганизмов с помощью лазерного излучения осуществляется прямым облучением материала лазерным пучком, часто с применением расширителя пучка. Эффективность процесса определяется длиной волны, режимом работы (непрерывный или импульсный) и частотой следования импульсов. Выбор оптимальных параметров излучения определяется типом микроорганизма, его морфологией и локализацией, а также физико-химическими свойствами обрабатываемой среды.

Эффективность лазерной инактивации микроорганизмов во многом определяется длиной волны излучения, поскольку она влияет на глубину проникновения света и механизмы его взаимодействия с клеточными структурами. При исследовании влияния типа лазера, плотности мощности, времени облучения на ингибирование биоплёнок патогенов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, результаты показали, что синий диодный лазер длиной волны 450 нм был более эффективен, чем красный и зелёный: при плотности мощности 0,36 Вт/см² за 15 минут подавление роста составляло 65,9% для *S. aureus*, 34,52% для *E. coli* и 43,63% для *C. albicans*. При увеличении времени облучения до 30 мин показатели возрастили до 85,39%, 41,18% и 54,55%, соответственно. Наибольшее

ингибиование биоплёнок *S. aureus* (94,61%) наблюдалось при 60 минутах воздействия. В [158] исследовали воздействие красных, зеленых и синих лазерных диодов на патогенные микроорганизмы. В результате обнаружено, что синий лазер более эффективен, чем красный и зеленый. Эффективная инактивация *E. coli* была достигнута при облучении импульсным лазером видимого диапазона (532 нм) путем смешивания бактерии с красителем, поглощающего видимый свет. В работе [159] добились трехкратной инактивации за 10 минут, используя низкую дозу облучения – 50 кДж/см². Исследования семян дополнитель но подтверждают потенциал лазерного облучения как альтернативной стратегии подавления патогенов, вызывающих порчу. Облучение третьей и четвертой гармониками Nd:YAG-лазера (355 и 266 нм) эффективно подавляет рост возбудителей пищевых инфекций: было достигнуто полное подавление *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* и *Listeria monocytogenes*. Конфокальная микроскопия подтвердила лизис клеток у всех патогенов [160]. Полная стерилизация молока излучением Nd:YAG-лазера (1064 нм) достигнута при мощности лазера 50 Вт за 2 минуты [161]. Излучение Nd:YAG (1064 нм), диодного (810 нм), Er:YAG (2940 нм), Er,Cr:YSGG (2780 нм) лазеров подходит для дезинфекции глубоких слоев дентина в отношении *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis* [162]. С помощью Nd-YAG-лазера (1064 нм) в режиме модуляции добротности была достигнута инактивации биопленок *Pseudomonas aeruginosa* за счет ударных волн и формирования плазмы [163]. Результаты показали зависимость инактивации *E. coli* в молоке излучением эксимерного лазера (248 нм) с частотой импульсов 20 Гц, площадью луча 3 см² и средней энергией на 410 мДж в импульсе достигала 6 порядков при дозе 10 000 мДж/см² [164]. В другом исследовании инактивация микроорганизмов *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens* в жидкой среде излучением импульсного эксимерного лазера (248 нм) достигнута при пороговой интенсивности 12 Дж/см². Инактивация связана разрушением ДНК бактерий через

нетепловые фотохимические процессы [165]. Инактивация микроорганизмов непрерывным газовым лазером с длиной волны 632,8 нм и мощностью 21–30 мВт при времени экспозиции 5–60 минут наступает в результате фотодинамического действия света и вызванного им окислительного стресса [166]. Низкомощные наносекундные импульсные лазеры в видимой области инактивируют бактерии за счёт абляции, возникающей при поглощении излучения: достигнуто сокращение числа клеток *Escherichia coli* за 10 минут при низкой дозе облучения 50 кДж/см² на 3 порядка [159]. Бактерицидный эффект обработки лазером Nd:YAG ($\lambda = 1064$ нм) для *Escherichia coli* и *Pseudomonas fragi* был выше на 1,50–2,68 и 1,31–2,50 порядка соответственно по сравнению с традиционным УФ-облучением ($\lambda = 180$ –280 нм) [167].

Лазерные источники могут выступать в качестве альтернативы химическим фунгицидам [168, 169]. Против плесневых грибов основное внимание уделяется лазерам с излучением в красном и зеленом диапазонах спектра. Излучение непрерывных диодного (670 нм) и аргонового (514 нм) лазеров вызвало морфологические деформации и повреждения гифов грибов *Aspergillus ochraceus*, *Chaetomium funicolum*, *Penicillium lividum*, *Trichoderma polysporum* [170]. Полупроводниковый лазерный диод (630–660 нм) показал подавление роста грибов на семенах риса при облучении без дополнительных красителей [171].

К данной группе относятся также фемтосекундные лазеры (с длительностью импульса порядка 10^{-15} с) видимого и ближнего ИК-диапазонов, при которых реализуются нелинейные фотофизические процессы — многофотонное возбуждение, ионизация и генерация плазмы, приводящие к разрушению биологических структур без значительного теплового воздействия. Фемтосекундные лазеры сегодня рассматриваются как один из наиболее перспективных инструментов для инактивации патогенных микроорганизмов. Их особенность в том, что энергия доставляется в биологический объект за время, меньшее характерных релаксационных процессов.

Инактивация с использованием фемтосекундных лазеров вызвала интерес как потенциальная альтернатива УФ-облучению, поскольку этот метод основан на низкоэнергетических фотонах в видимой или ближней ИК-области (400–800 нм). Экспериментальные данные показывают, что фемтосекундные импульсы можно использовать в качестве общей стратегии инактивации бактериальных и вирусных патогенов. Они эффективны против бактерий (как грамположительных, так и грамотрицательных), а также оболочечных и безоболочечных одноцепочечных и двухцепочечных ДНК и РНК вирусов [179, 180].

Механизмы действия фемтосекундных лазерных импульсов можно разделить на несколько ключевых направлений. Во-первых, это резонансное возбуждение колебаний белковых структур и оболочек вирусов и бактерий в видимом и ближнем ИК-диапазоне, приводящее к механическим повреждениям капсидов и клеточных стенок. Во-вторых, возможная фотодеструкция нуклеиновых кислот и белков, связанная с многофотонным поглощением. Наконец, при сверхвысоких интенсивностях реализуются кавитационные и ударно-волновые эффекты, вызывающие локальные микроповреждения клеточных структур. В ряде работ показано, что непрерывные фемтосекундные лазеры в видимом и ИК-диапазоне (400–800 нм) способны когерентно возбуждать механические колебания в белковых капсидах вирусов, вызывая их повреждение и инактивацию широкого спектра патогенов [181]. Заявлено, что метод, оказывает минимальное неблагоприятное воздействие на организм человека. Однако метод имеет следующие недостатки: низкая эффективность инактивации, из-за чего требуется длительное время обработки (> 1 часа), и высокая пиковая мощность фемтосекундного импульса для инактивации бактерий микрометрового размера. Эти особенности препятствуют масштабируемости и практической реализации этого метода инактивации. Исследования бактерицидной эффективности фемтосекундного лазерного излучения против *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* показали, что наилучший эффект достигается при длинах волн 370–420 нм, интенсивности 0,063 Вт/см² и экспозиции не менее 20 минут.

Механизм действия связан с фотоактивацией эндогенных порфиринов и генерацией активных форм кислорода [180]. Продемонстрирована возможность применения метода для дезинфекции воды: достигнуто значительное подавление роста *E. coli* после облучения фемтосекундными импульсами с длиной волны 400 нм [182].

Фемтосекундные лазеры обеспечивают высокую селективность и локализованность воздействия, минимальное тепловое повреждение материала, а также возможность обработки мутных и биологически сложных сред (за счёт нелинейных механизмов поглощения). Основные ограничения на настоящее время связаны технической сложностью и высокой стоимостью таких систем.

1.8.2 Лазеры, обеспечивающие колебательное возбуждение

Излучение среднего ИК-диапазона (3–30 мкм) соответствует колебательным модам молекул, связанным с колебаниями различных химических связей – О–Н, С–Н, Н–Н, С=О и др. Эти лазеры возбуждают колебательные уровни без перехода на электронные состояния, что приводит к селективному поглощению энергии отдельными химическими группами. К данной группе источников среднего ИК-диапазона относятся СО₂-лазеры ($\lambda = 10,6$ мкм), Er:YAG ($\lambda=2,94$ мкм), лазеры на свободных электронах (ЛСЭ), оптические параметрические генераторы (ОПГ) и генераторы разностной частоты (ГРЧ), позволяющие осуществлять перестройку в широком спектральном диапазоне. Наиболее широко эти источники применяются в хирургии для абляции тканей [15], однако существует ряд работ по инактивации микроорганизмов.

В данном диапазоне основным хромофором является вода с полосами поглощения 1,95, 2,94, 4,68 и 6,1 мкм с максимумом в районе 2,94 мкм, поглощение которой приводит к эффективной абляции. Белок (пептидная связь) в диапазоне колебания амидных групп ~6,0–6,5 мкм также имеет сильное поглощение, что позволяет использовать эту длину волны для прецизионной абляции с

минимальными коллатеральными повреждениями. Возбуждение длинами волн в среднем ИК-диапазоне не вызывает фотохимически активные электронные переходы, система остается в основном электронном состоянии, а селективная модификация материала определяется колебательными переходами. Оптимальные условия абляции достигаются в режиме теплового удержания, при котором длительность лазерного импульса много меньше характерного времени теплопереноса, что дает более локальный нагрев во время импульса и меньший перенос тепла в соседние слои [15].

Лазерное излучение СО₂-лазера с длиной волны 10,6 мкм эффективно для инактивации патогенов человека – *Legionella pneumophila* и SARS-CoV-2, содержащихся в аэрозоле: 99% микроорганизмов инактивировано за <15 мс [172]. В исследовании [173] представлена возможность использования СО₂-лазера ($\lambda=10,6$ мкм) для инактивации патогенных бактерий (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*), дрожжей (*Candida albicans*) и спор плесневых грибов (*Aspergillus niger*) без химических агентов в режиме сканирования. Инактивация имеет пороговый характер. Споры показали наибольшую устойчивость к инактивации. Бактерия культуры *Staphylococcus aureus* более устойчива к воздействию лазерного излучения, чем *Escherichia coli*.

Лазеры на свободных электронах, позволяющие плавно перестраивать длину волны в среднем ИК-диапазоне 2–10 мкм, обладают большим потенциалом использования в биофотонике, поскольку в данном диапазоне находятся основные характеристические колебания биомолекул [174]. Инактивация бактерий *Escherichia coli* излучением среднего ИК-диапазона лазера на свободных электронах продемонстрирована в работе [175]. В работе рассмотрены длины волн, соответствующие частотам внутримолекулярных связей основных компонентов клетки: 6,00 мкм (амид I), 6,62 мкм (амид II), 6,88 мкм (асимметричное деформационное колебание С–Н связей), 7,14 мкм (симметричное колебание СОО[–]), 8,09 мкм (амид III, асимметричное колебание РО₂[–]) и 9,26 мкм (симметричное

колебание PO_2^-). Наилучший эффект инактивации показало излучение с длиной волны 6,62 мкм, соответствующей полосе поглощения амида II. Однако, данные системы недоступны для практического применения без существенных разработок ввиду их высокой стоимости, сложности и размеров. Поскольку ЛСЭ позволяют выполнить точную подстройку по длине волны, их излучение используется для изменения элементов вторичной структуры молекул белков. Амилоидные фибриллы, являющиеся причиной нейродегенеративных заболеваний, представляют собой жесткую структуру из уложенных в стопку β -складчатостей, разборка которой затруднена без денатурирующих средств. С помощью излучения лазера на свободных электронах, настроенного на диапазон полосы амида I, осуществляется преобразование нерастворимых фибрилл амилоидоподобного белка в растворимую мономерную форму. После облучения содержание β -складчатостей ($1625\text{--}1640 \text{ см}^{-1}$) сокращается, при этом увеличивается содержание α -спиралей ($1650\text{--}1655 \text{ см}^{-1}$), соответствующих нативной форме белка. Облучение излучением с длиной волны 5 мкм, не имеющее резонансного поглощения элементами β -складчатостей, не приводит к изменениям конформации [176–178].

Излучение ОПГ с длинами волн в области ~ 6 мкм и фемтосекундной длительностью импульсов используется для прецизионной абляции роговицы глаза. В работе [14] кератотомия излучением с длиной волны 6,1 мкм, длительностью импульсов 200 фс достигается в пределах миллисекундной серии фемтосекундных импульсов с частотой следования 50 кГц через взрывное испарение. Нагрев ткани достигается за счет накопительного эффекта на миллисекундной шкале, модель теплопередачи может быть описана уравнением теплового баланса:

$$\rho C \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) + Q \quad (1.1)$$

где ρ – плотность ткани роговицы, C – удельная теплоёмкость, k – теплопроводность, а T – локальная температура роговицы.

Однако резонансное высокоинтенсивное лазерное излучение среднего ИК-диапазона способно селективно возбуждать конкретную молекулярную колебательную систему [183]. При этом реализуется процесс ступенчатого возбуждения, при котором система совершает последовательный переход по колебательным уровням $v \rightarrow v+1$ в течение действия одного импульса с широкой спектральной полосой. По мере роста колебательного уровня v частота переходов сдвигается в сторону больших длин волн, что связано с явлением колебательного ангармонизма, описываемого потенциалом Морзе (рис. 1.6):

$$\frac{E(v)}{\hbar} = \omega_{harm}(v + 1/2) - \omega_{anharm}(v + 1/2)^2 \quad (1.2)$$

$$\frac{\Delta E_{0-1}}{\hbar} = \omega_{harm} - 2\omega_{anharm}; \quad (1.3)$$

$$\frac{\Delta E_{1-2}}{\hbar} = \omega_{harm} - 4\omega_{anharm}, \quad (1.4)$$

где ΔE_{0-1} – энергия перехода, ω_{harm} – частота в гармоническом приближении, ω_{anharm} – эффективная частота перехода с учетом ангармоничности.

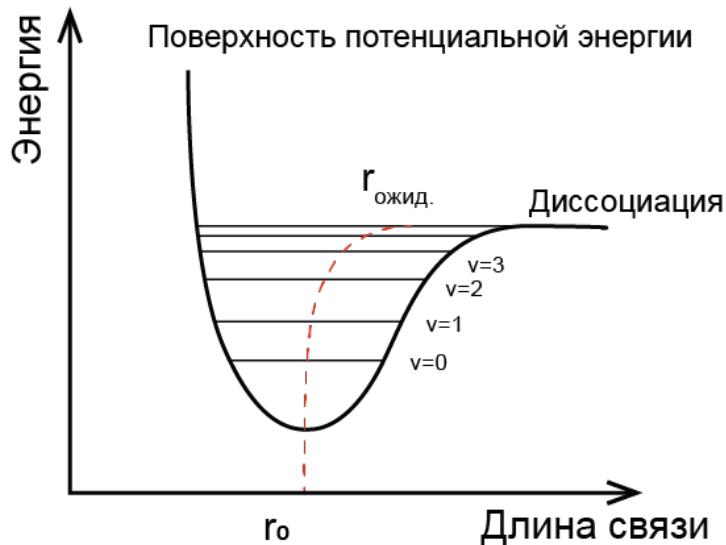


Рис. 1.6 Поверхность потенциальной энергии ангармонического осциллятора (потенциал Морзе), $r_{ожид.}$ – ожидаемая длина связи [184].

Соответственно, для реализации процесса ступенчатого возбуждения требуется лазерный импульс со спектральной полосой, достаточной для перекрытия всех частот переходов между соседними колебательными уровнями, с учётом их ангармонических смещений. При таких условиях переходы $\nu \rightarrow \nu + 1$ могут происходить последовательно в пределах одного импульса. Этим требованиям удовлетворяет фемтосекундные лазерные импульсы, поскольку они сочетают широкую спектральную полосу и высокую пиковую интенсивность.

Заключение по главе 1

Физические методы не только актуальны как альтернатива традиционным химическим подходам, но и становятся стратегически важным направлением в условиях глобального кризиса антибиотикорезистентности.

Ионизирующее излучение демонстрирует высокую эффективность против широкого спектра патогенов, однако его использование ограничено высокой стоимостью, сложностью инфраструктуры и рисками изменения свойств материалов. УФ-излучение и коротковолновое излучение видимого диапазона удобны в применении, но ограничены слабой проникающей способностью и низкой эффективностью в мутных или плотных средах, кроме того, их воздействие сопряжено с мутагенным воздействием на клетки млекопитающих. Фотодинамическая инактивация даёт возможность селективного воздействия, но требует введения фотосенсибилизаторов, что не всегда совместимо с пищевыми продуктами. Импульсное излучение высокой интенсивности эффективно для обеззараживания поверхностей, однако его использование ограничивает риск термических повреждений продуктов. Низкотемпературная плазма демонстрирует перспективные результаты, но остаётся трудной для масштабирования в промышленных процессах. Микроволновое и радиочастотное излучение обеспечивают быстрый и объёмный нагрев, но проблема неравномерного распределения температуры приводит к образованию «холодных зон», где сохраняются микроорганизмы. Инфракрасное излучение традиционно

используется для стерилизации и пастеризации, но его применение ограничено низкой эффективностью и риском теплового повреждения. Селективные подходы с использованием определённых диапазонов ИК-изучения частично решают данную проблему, однако по-прежнему связаны с риском снижения качества. Основные физические методы и их ограничения приведены в таблице 2.

Таблица 2. Физические методы инактивации, их механизмы воздействия и ограничения.

Тип излучения	Диапазон	Механизм воздействия	Основные ограничения
Гамма, тормозное рентгеновское	<0,01 нм <10 нм	Ионизация, повреждение ДНК	Радиационные риски, сложность оборудования
Дальний УФ (УФ-С)	100–280 нм	Прямое повреждение ДНК/РНК	Мутагенный эффект
Средний, близкий УФ (УФ-Б, УФ-А)	280–370 нм	Генерация радикалов, окислительный стресс	Слабая проникающая способность
Коротковолновое излучение видимого диапазона	~280–405 нм	Генерация активных форм кислорода через порфирины	Низкая эффективность
Видимое излучение, близкий ИК	630–800 нм + фотосенсибилизатор	Фотодинамическая инактивация через генерацию активных форм кислорода	Необходимость фотосенсибилизатора
Средний ИК	3–30 мкм	Денатурация белков, нуклеиновых кислот	Низкая эффективность

Терагерцовое (ТГц)	0,1–10 ТГц (30–3000 мкм)	Вращательные моды, дипольное возбуждение	Слабая проникающая способность, находится на стадии исследований
Микроволновое излучение	2,45 ГГц (12,2 см)	Объемный нагрев	Неселективно, риск перегрева биологических тканей

Лазерные источники излучения открывают новые возможности благодаря когерентности, высокой плотности энергии и возможности точного выбора параметров. Фемтосекундные лазеры видимого диапазона уже показали способность разрушать белковые оболочки вирусов и клеточные стенки бактерий за счёт фотомеханических и нелинейных эффектов, при этом минимизируя тепловое воздействие на окружающую среду. Однако ограничение таких подходов заключается в отсутствии селективности: возбуждение и разрушение происходят преимущественно за счёт универсальных механических процессов, без чёткого соответствия спектрам поглощения клеточных биомолекул. Селективность достигается при инактивации излучением лазера на свободных электронах, однако данная система является слишком сложной для практического применения.

Применение фемтосекундных импульсов среднего ИК-диапазона, длины волн которых совпадают с полосами поглощения амидных групп белков и С–Н связей органических молекул представляет особый интерес. Такой подход сочетает два ключевых преимущества: ультракороткая длительность импульсов позволяет избегать перегрева и макроскопического повреждения среды, а спектральная селективность среднего ИК-излучения обеспечивает прямое воздействие на критически важные молекулярные мишени микроорганизмов. Это открывает перспективу разработки принципиально нового метода инактивации, в котором достигается высокая эффективность за счёт адресного разрушения биомолекул при

сохранении структуры и свойств обрабатываемого продукта. В настоящей работе использовано излучение, полученное методом генерации разностной частоты. В связи с высокими темпами развития лазеров среднего ИК-диапазона и нелинейных преобразователей частот (ОПГ, ГРЧ), метод имеет перспективы практического приложения.

Глава 2. Экспериментальные методы и объекты исследования

2.1 Экспериментальные установки

В данной работе для генерации фемтосекундных лазерных импульсов среднего ИК-диапазона с длинами волн 3,4 и 6 мкм задействовано оборудование, входящее в состав уникальной научной установки «Многоцелевой фемтосекундный лазерно-диагностический спектрометрический комплекс» (УНУ МФЛДСК) Института спектроскопии РАН, предназначеннной для исследований в спектральном диапазоне 2,6–11 мкм ультрабыстрых фотоиндуцированных процессов в различных материалах. Схема установки приведена на рис. 2.1.

Система, использующаяся для генерации излучения с длинами волн 3,4 и 6 мкм состоит из следующих функциональных узлов:

1. Титан-сапфировый генератор фемтосекундных импульсов *Tsunami* (Spectra-Physics, США), центральная длина волны – 800 нм, длительность импульса на полувысоте – 50 фс, частота следования импульсов – 76 МГц, энергия импульса – 7 нДж;

2. Регенеративный усилитель фемтосекундных импульсов *Spitfire PRO* НР (Spectra-Physics, США), длина волны - 800 нм, длительность импульса - 38 фс, частота следования импульсов – 1 Гц – 1 кГц, энергия импульса - до 4 мДж;

3. Параметрический преобразователь частоты *TOPAS-C* в комплекте с неколлинеарным генератором разностной частоты *nDFG* (Light Conversion, Литва), длина волны – 0,25–11 мкм, длительность импульсов составляет до 100 фс, энергия импульса – 0,5–160 мкДж в зависимости от длины волны. *nDFG* используется с *TOPAS-C* для расширения спектрального диапазона в ИК-область и обеспечивает диапазон перестройки 1,6–11 мкм при накачке выходным излучением с *TOPAS-C*.

4. Монохроматор / спектрограф с пироэлектрическим приемником *Solar TII MS2004* (диапазон измерения – 2–15 мкм, фокусное расстояние – 200 мм, относительное отверстие – 1/3.6).

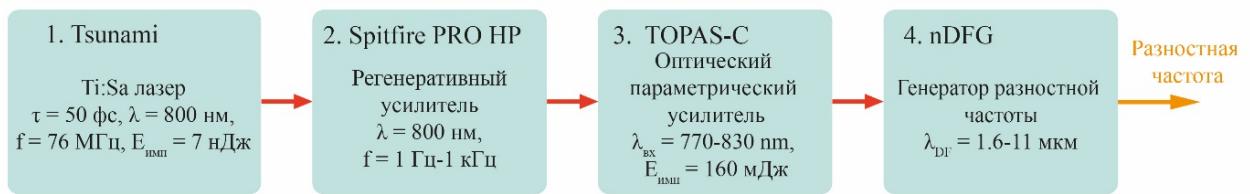


Рис. 2.1 Схема установки на основе генератора фемтосекундных импульсов Tsunami.

Профили полученных лазерных пучков измерялись пироэлектрической камерой Pyrocam III, Spiricon (Израиль). Диапазон анализируемых длин волн 13–355 нм и 1,06–3000 мкм.

Также для исследований использовалась система генерации разностной частоты излучения на основе фемтосекундного усилителя ТЕТА-20, Аввеста-проект. Схема установки представлена на рис. 2.2.

Система состоит из следующих функциональных узлов:

1. Регенеративный фемтосекундный усилитель ТЕТА (Аввеста-проект, Россия). Длина волны – 1025–1035 нм, длительность импульса – 350 фс – 10 пс, максимальная энергия в импульсе – 1 мДж (при 20 кГц), частота следования импульсов – 1–200 кГц. В качестве задающего генератора используется иттербийевый волоконный лазер;
2. Оптический параметрический усилитель PARUS-NE-515-HP s/n 109, (Аввеста-проект, Россия). Предназначен для генерации фемтосекундного излучения в диапазоне перестройки длин волн сигнальной (640–1020 нм) и холостой (1040–2600 нм) волн, в качестве накачки использует выходное излучение системы ТЕТА. Длительность импульса – 250 фс;
3. Модуль генерации разностной частоты PARUS-DFG, Аввеста-проект. Предназначен для генерации среднего ИК-излучения в диапазоне 3–9 мкм. Нелинейный кристалл – AgGaS₂, толщина 5 мм. Длительность импульса – 250 фс.

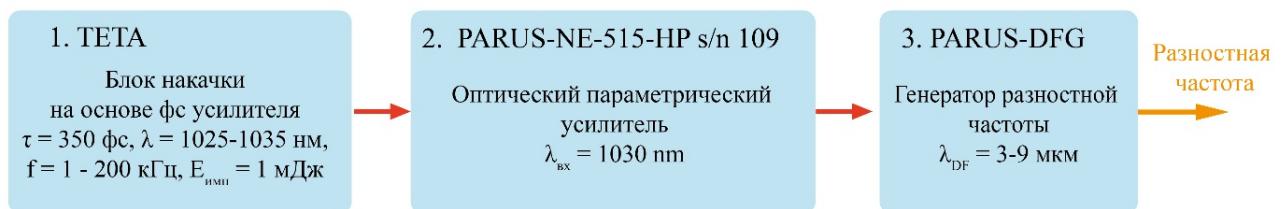


Рис. 2.2 Схема установки на основе ТЕТА.

2.2 Материалы исследования

2.2.1 Микробиологические культуры

В исследовании использовались микробиологические культуры *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) и *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) – типичные представители грамотрицательных и грамположительных патогенных микроорганизмов, соответственно, являющиеся возбудителями пищевых и внутрибольничных инфекций [104, 105]. Микробиологические культуры получены из коллекции НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи в планктонной форме.

Pseudomonas aeruginosa – грамотрицательная аэробная палочковидная бактерия, способная формировать биопленку и содержащаяся в различных группах пищевых продуктов. Обладает высокой способностью к адаптации и росту при низких температурах, является распространенной бактерией, вызывающей порчу продуктов, особенно в продуктах с высоким содержанием воды и богатых питательными веществами. Является одним из наиболее распространенных внутрибольничных патогенов в мире. Вызывает ряд тяжелых острых и хронических инфекций, угрожающих жизни, таких как менингит, средний отит, инфекции мочевыводящих путей и пневмония (в том числе за счет образования биопленки на медицинских устройствах при искусственной вентиляции легких). *P. aeruginosa* входит в тройку основных причин оппортунистических инфекций у людей, ежегодно поражает более 2 миллионов человек и приводит к смерти около

90 тысяч в год. Из-за высокой устойчивости к антибиотикам с трудом поддается лечению [185, 186].

Staphylococcus aureus – грамположительная бактерия. Золотистый стафилококк является распространенным внутрибольничным патогеном, вызывающим высокую заболеваемость и смертность. Основными очагами инфекции у пациентов больниц являются хирургические раны и имплантированные в них медицинские приборы (катетеры и пр.). В последнем случае бактерии могут колонизировать имплантированное устройство. Употребление пищи, зараженной энтеротоксином золотистого стафилококка, может привести к пищевому отравлению [187].

Спектры оптической плотности бактериальных культур в диапазоне 1000–4000 см^{-1} приведены на рисунке 2.3.

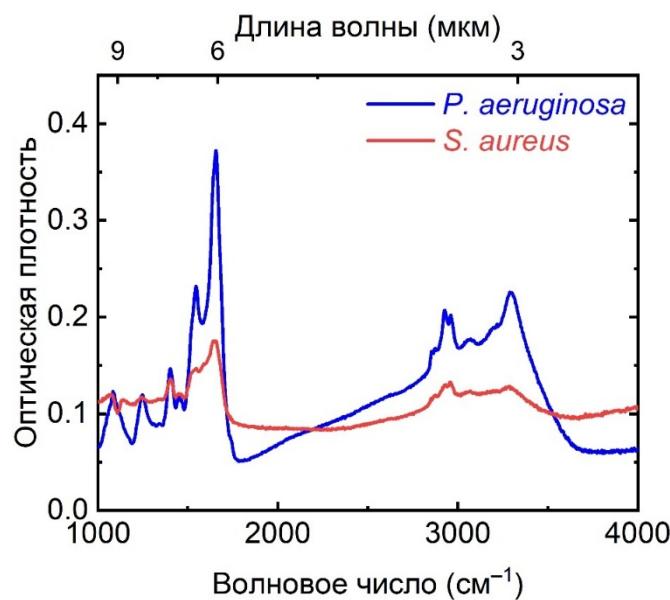


Рис. 2.3 Спектры оптической плотности микробиологических культур *P. aeruginosa* и *S. aureus* в диапазоне волновых чисел 1000–4000 см^{-1} .

2.2.2 Подложки для нанесения биологических образцов

Для размещения микробиологической культуры использовались подложки из фторида кальция (CaF_2) (толщина 2 мм) или n-легированного кремния (Si)

(толщина – 0,45 мм, легирующая примесь – фосфор, концентрация примеси – 10^{17} см $^{-3}$). Фторид кальция прозрачен в диапазоне длин волн 0,15–9 мкм, используемый тип кремния также не имеет полос поглощения в интересующей области спектра (рис. 2.4). Оба типа материалов химически инертны и при использованных условиях эксперимента не проявляют собственной антимикробной активности в отношении исследуемых микроорганизмов.

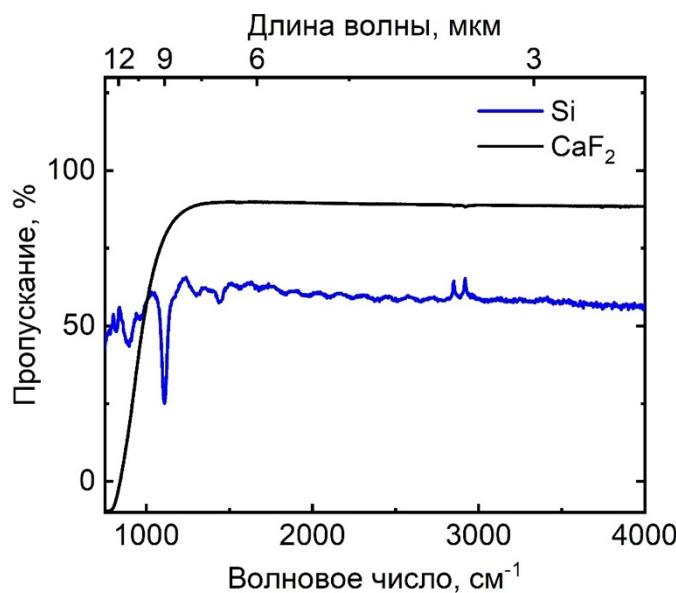


Рис. 2.4 Спектры пропускания подложек из Si и CaF₂ в диапазоне волновых чисел 800–4000 см $^{-1}$.

2.3 Применяемые методики

2.3.1 Воздействие лазерных импульсов на микроорганизмы

2.3.1.1 Инактивация микроорганизмов

Для исследования инактивации микроорганизмов использовалось излучение с длинами волн в среднем ИК-диапазоне с частотами следования импульсов 1 кГц и 10 кГц. Импульсы среднего ИК-диапазона с частотой следования 1 кГц получены путем параметрической генерации излучения титан-сапфирового фемтосекундного лазера Tsunami (Spectra-Physics, США) с центральной длиной волны 800 нм. В

экспериментах были использованы фемтосекундные лазерные импульсы с центральными длинами волн 3,4 мкм (полуширина 0,4 мкм), энергия в импульсе 30 мкДж, длительность $\tau=130$ фс и 6 мкм (полуширина 0,6 мкм), 10 мкДж в импульсе, $\tau=140$ фс. Лазерное излучение фокусировалось на поверхность образца по нормали золотым параболическим зеркалом с фокусным расстоянием 150 мм. Импульсы среднего ИК-диапазона с частотой следования 10 кГц получены путем генерации излучения разностной частоты на системе ТЕТА-20. Были использованы фемтосекундные лазерные импульсы с центральными длинами волн: 3,4 мкм (полуширина 0,1 мкм), энергия в импульсе 3 мкДж, 5,2 мкм (полуширина 0,2 мкм), 2 мкДж в импульсе и 6 мкм (полуширина 0,35 мкм), 2 мкДж в импульсе, длительность импульсов $\tau=350$ фс. Излучение фокусировалось на поверхность образца с помощью асферической линзы из фторида кальция (CaF_2) с фокусным расстоянием 20 мм.

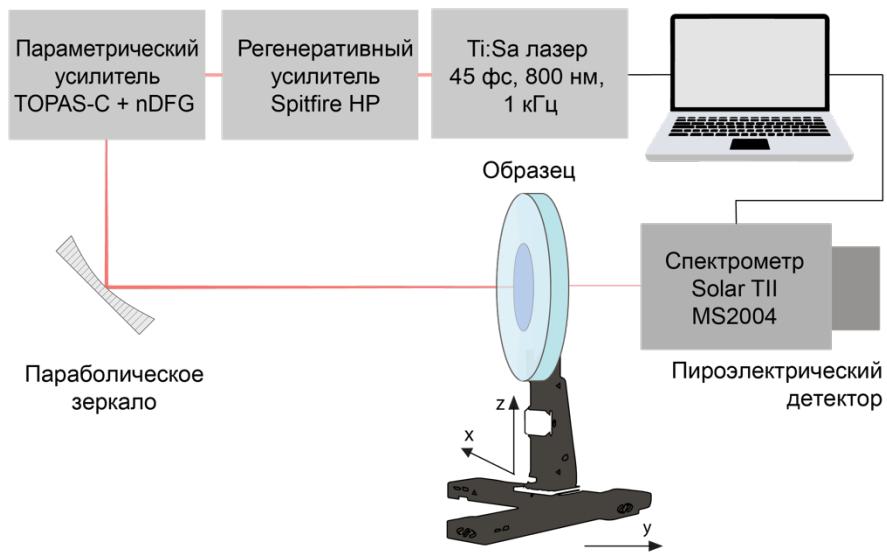


Рис. 2.5 Типовая схема экспериментальной установки.

Пиковая интенсивность лазерных импульсов менялась путем смещения образца по оптической оси (направление y на рисунке 2.5) для изменения диаметра облученной области. Облучение образцов производилось в режиме сканирования, обеспечивающем равномерное покрытие без пропусков. Сканирование

осуществлялось с перекрытием 50% (N=2 импульса в точку). Перемещение образца в фокальной плоскости осуществлялось с помощью программируемой моторизированной двухкоординатной подвижки. Для каждого уровня интенсивности лазерных импульсов готовили отдельный образец. После облучения его помещали в индивидуальный контейнер с физиологическим раствором (0,9% NaCl) для последующего определения жизнеспособности микроорганизмов.

2.3.1.2 Измерение относительного пропускания

Исследование микробиологических образцов выполнено методом спектроскопии динамического пропускания. Регистрировались спектры при различной пиковой интенсивности лазерных импульсов, полученных путем параметрической генерации излучения титан-сапфирового фемтосекундного лазера Tsunami. Спектры регистрировались спектрометром Solar TII MS2004 (SOL Instruments) с широкополосным пироэлектрическим приемником ПБ-9М (рис. 2.6). На рис. 2.7 показаны спектры пропускания фемтосекундных импульсов с длинами волн 3,4 и 6 мкм, измеренные через чистую кремниевую пластину и через пластину с нанесенным бактериальным покрытием. Для анализа каждый спектр для образца с бактериями был нормирован на спектр чистой пластины кремния.

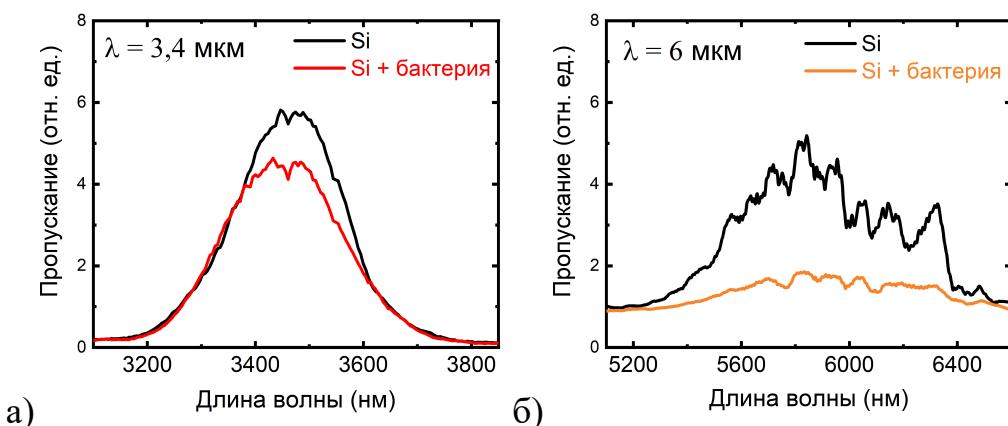


Рис. 2.6 Спектры пропускания лазерных импульсов с длинами волн а) 3,4 и б) 6 мкм чистой пластиной кремния и пластиной кремния с бактериальным покрытием.

На основании полученных спектральных данных получены спектры изменения относительного пропускания микробиологических образцов путем логарифмирования отношения пропускания возбужденного образца к пропусканию невозбужденного образца (в основном состоянии) $\ln(T/T_0)$:

$$\ln\left(\frac{T}{T_0}\right) = \ln\left(\frac{e^{-\alpha^* d}}{e^{-\alpha_0 d}}\right) = \ln(e^{(\alpha_0 - \alpha^*)d}) = (\alpha_0 - \alpha^*)d \quad (2.1)$$

где: T – пропускание образца, возбужденного при интенсивности излучения I ; T_0 – пропускание невозбужденного образца (нулевая интенсивность излучения); α_0 – коэффициент поглощения невозбужденного образца; α^* – коэффициент поглощения возбужденного образца; d – толщина образца.

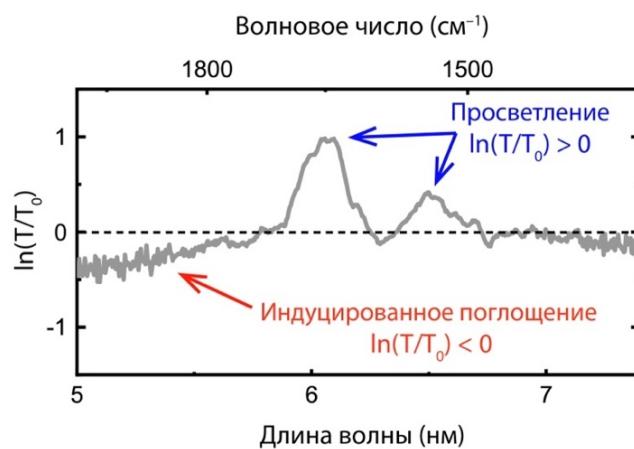


Рис. 2.7 Спектр изменения относительного пропускания бактериальной культуры при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм.

Зависимость показывает разницу между населенностями состояний до и после возбуждения образца лазерными импульсами. Таким образом, положительные значения $\ln(T/T_0)$ соответствуют увеличению пропускания (просветлению), отрицательные значения – уменьшению пропускания (возникновению индуцированного или наведенного поглощения) (рис. 2.7). Данный подход позволяет исключить систематические искажения, связанные с подложкой и исходным поглощением. Дает возможность фиксировать с высокой

чувствительностью как ослабление полос поглощения, так и появление индуцированных спектральных компонент в условиях фемтосекундного воздействия.

2.3.1.3 Инактивация образцов под полиэтиленовой пленкой

Для исследования инактивации бактерий под полиэтиленовой (ПЭ) пленкой использовалось излучение с длиной волны 6,04 мкм, полученное в результате генерации разностной частоты импульсами параметрической генерации на системе ТЕТА-20, частота следования импульсов – 10 кГц. Интенсивность лазерных импульсов с длиной волны 6,04 мкм составила 8×10^6 Вт/см², $\tau = 250$ фс. Температуру образцов контролировали с помощью тепловизора UTi120S (Uni-T, Дунгуань, Китай, диапазон температур – 20–400°C, разрешение дисплея – 320×240 пикселей, пиксели тепловизионного изображения – 12×90 штук, размер пикселя – 17 мкм). Обработка проводилась для двух типов образцов: накрытых упаковочной полиэтиленовой пленкой и образцов без пленки. Схема экспериментальной установки представлена на рис. 2.8.

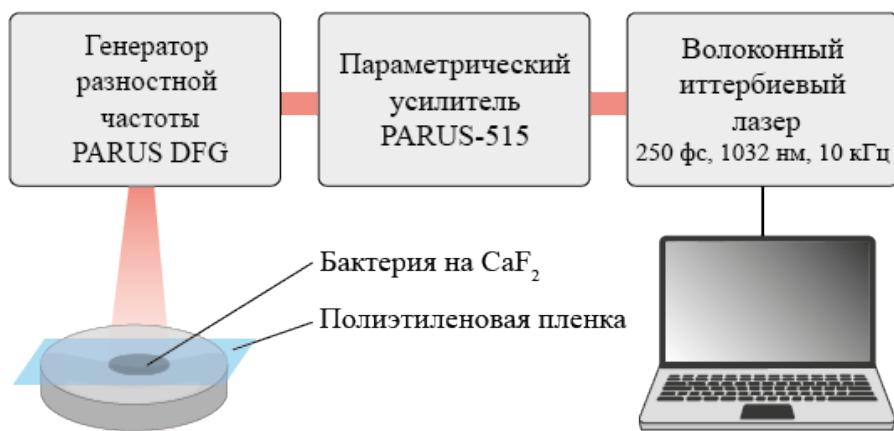


Рис. 2.8 Схема экспериментальной установки при облучении расфокусированным пучком через полиэтиленовую пленку.

Использовалась неокрашенная, нестабилизированная, неармированная полиэтиленовая пленка толщиной 15 мкм (Россия, ГОСТ 10354-82). Спектр пропускания пленки представлен на рисунке 2.9.

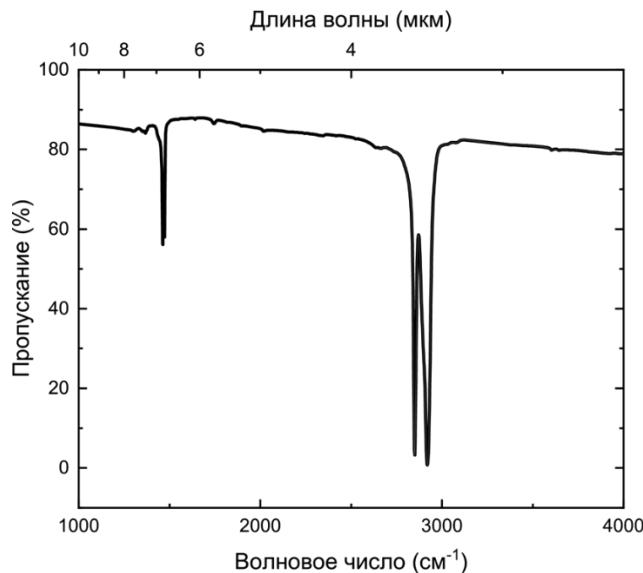


Рис. 2.9 Спектр пропускания полиэтиленовой пленки в диапазоне волновых чисел 1000–4000 см^{−1}.

2.3.2 Микробиологический анализ

2.3.2.1 Подготовка бактериальной культуры

Микробиологические культуры выращивали на триптиказо-соевом бульоне (TSB, Panreac, Испания). Ночную культуру отмывали дистиллированной водой: 1 мл суспензии центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли 1 мл дистиллированной воды и интенсивно встряхивали. Цикл повторяли 3–4 раза. Полученную суспензию разводили серийными десятичными разведениями до 10⁵ КОЕ/мл. КОЕ (колониеобразующая единица) – число жизнеспособных клеток, способных к образованию колоний. Для экспериментов использовали бульонную культуру, разбавленную дистиллированной водой, чтобы исключить влияние компонентов с полосами поглощения в среднем ИК-диапазоне (например, физиологического раствора).

Суспензию наносили каплей объёмом 5 мкл на подложки из фторида кальция (CaF_2) или кремния (Si) и высушивали 10–15 мин (рис. 2.10). Толщина высушенного слоя составляла $\sim 1,5$ мкм.

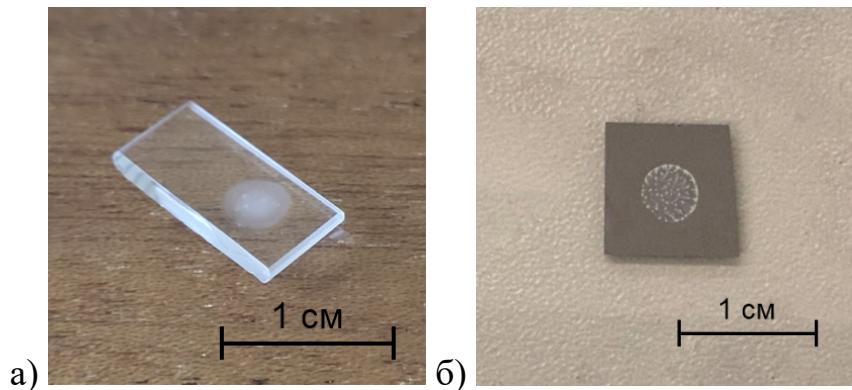


Рис. 2.10 Подложки из а) CaF_2 и б) Si с нанесенной на них бактериальной культурой.

По окончанию работ утилизация микробиологических отходов выполнялась путем автоклавирования. Образцы подложек подвергались химической дезинфекции (экспозиция 30 минут в 70% спирте) для повторного использования.

2.3.2.2 Анализ жизнеспособности микроорганизмов

Наряду с экспериментальными микробиологические исследования выполнялись для ряда контрольных образцов: 1) контрольные образцы с нанесенным инокулятом, которые выдерживались в тех же условиях на протяжении всего времени эксперимента, что и экспериментальные, но не подвергались воздействию излучения; 2) контроль исходного инокулята (исходное КОЕ/мл до нанесения на подложки); 3) отрицательный контроль (подложка без инокулята). Каждый эксперимент выполнялся в 3 повторах.

Экспериментальные и контрольные образцы – пластинки кремния или фторида кальция с нанесенной на них бактериальной культурой, после эксперимента размещалась в стерильных индивидуальных пробирках с физиологическим раствором NaCl 0,9%. Пробирки интенсивно встряхивались на

вортекс-миксере в течение 30 минут. Полученную суспензию титрировали с помощью метода капель для определения количества КОЕ и производили посев на твердую питательную среду в чашку Петри (рисунок 2.11а). Полученные посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов.

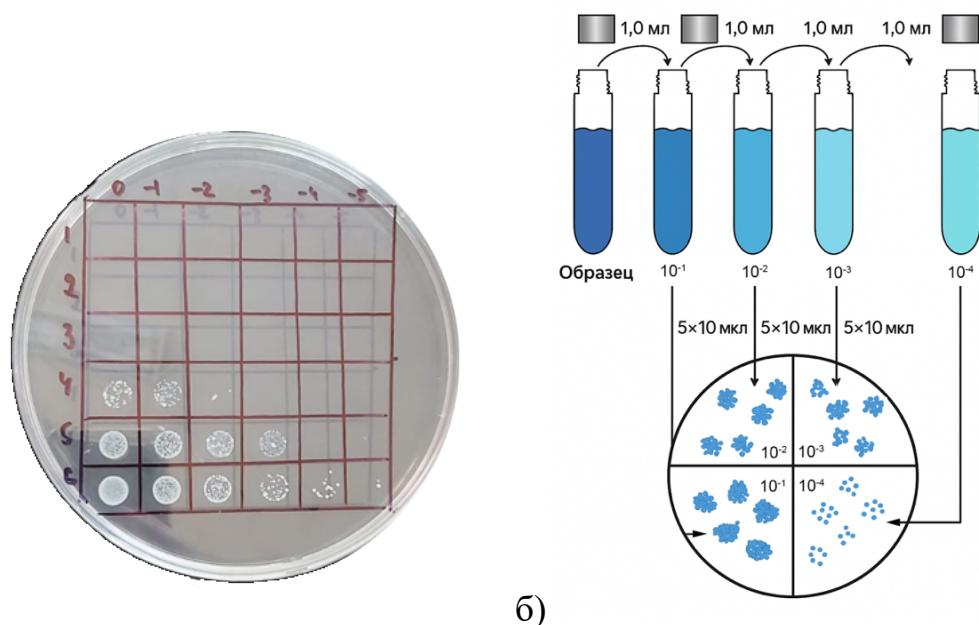


Рис. 2.11 а) фотография чашки Петри с питательной средой, на которую выполнен посев методом капель: каждый ряд соответствует одному образцу, колонки – порядку разведения; б) схема выполнения серийных десятичных разведений инокулята по методу капель для оценки КОЕ.

Метод капель представляет собой способ оценки количества жизнеспособных бактерий в образце путем последовательного десятичного разведения исследуемого материала в жидкой питательной среде до концентрации единичных клеток и нанесения этих разведений на одну чашку Петри [188]. Схема выполнения представлена на рисунке 2.11б.

Подсчет КОЕ/мл выполняется по следующей формуле:

$$\text{КОЕ/мл} = \frac{N}{V \times D} \quad (2.2)$$

где: N – среднее число колоний в одной капле; V – нанесённый объём одной капли (в мл); D – коэффициент разведения.

2.3.3 Оптическая и структурная характеристика образцов

Для исследования колебательных спектров микробиологических образцов до и после лазерного воздействия, а также подложек использовался инфракрасный Фурье спектрометр VERTEX V-70 (Bruker, Billerica, MA, USA) с вакуумной камерой позволяет получать спектры в диапазоне от УФ до среднего ИК (0,2–25 мкм) со спектральном разрешением $0,4 \text{ см}^{-1}$. Оснащен источником ИК-излучения глобаром, разделителем пучка KBr, пироэлектрическим приемником RT DLaTGS (Int Post). Для измерений использовались образцы облучённых бактерий и контрольный образец, размещённые на пластинке из фторида кальция без дополнительной пробоподготовки.

Высокоинтенсивное лазерное излучение может инициировать в биологических клетках ряд летальных механизмов, прежде всего разрушение плазматической мембраны вследствие абляции или кавитации. Для регистрации этих процессов необходимо исследовать морфологию клеток до и после воздействия. Для исследования морфологии бактериальных клеток до и после лазерного воздействия использовался сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) Tescan Vega (Tescan JSCo, Brno, Czech Republic), оснащенный ЭДС-детектором AZtecOne (Oxford Instruments, UK), а также просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) Tecnai G12 (FEI company, Hillsboro, OR, USA) с ускоряющим напряжением 200 кэВ. Для исследования методом СЭМ использовались образцы облучённых бактерий и контрольный образец, размещённые на кремниевой подложке без дополнительной пробоподготовки. Для анализа методом ПЭМ облучённые бактериальные клетки смывали с подложек из CaF_2 следующим образом. Каждый из облучённых и контрольных образцов помещали в отдельные пробирки типа, добавляли 0,5 мл дистиллированной воды и встряхивали в течение 15 мин. Полученную суспензию бактериальных клеток

наносили на покрытые углеродной плёнкой золотые сетки и высушивали при комнатной температуре.

Толщина слоя бактериальной культуры на подложке измерялась контактным способом с использованием сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) Certus Standard V (НаноСканТехнология, Россия). Для измерения использовался образец бактерий, размещённых на кремниевой подложке без дополнительной пробоподготовки.

2.3.4 Квантово-механическое моделирование

Для количественной интерпретации ангармонических эффектов поглощения амида I и амида II коллегами из Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова были проведены квантово-механические расчеты структур и колебательных спектров молекул, содержащих амидную группу. В качестве модельной молекулы, напоминающей колебательные свойства пептидных групп, выбрана молекула N,N-диметилформамида (ДМФА) (рис. 2.12), подобная по своим колебательным свойствам амида I в пептидах и нуклеиновых кислотах как для гармонического одноуровневого, так и для ангармонического возбуждения высоких уровней. Для молекулы ДМФА был проведён колебательный ангармонический анализ, включающий оптимизацию геометрии и оценку гармонических и ангармонических констант в рамках теории возмущений второго порядка (VPT2) [189]. Все расчёты *ab initio* были выполнены с помощью программного обеспечения Gaussian 09 (G09) [190]. В связи с относительно большим размером фрагментов, теория функционала электронной плотности (DFT: B3LYP) была реализована в сопряжении с базисным набором 6-31G+(d,p), который, как было доказано, является подходящим выбором для прогнозирования геометрических конфигураций и силовых полей органических молекул. Однако его формальная эффективность может быть обусловлена лишь эффектами компенсации ошибок.

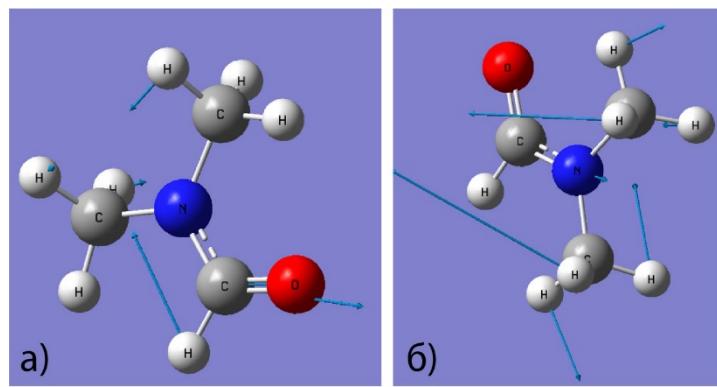


Рис. 2.12. Рассчитанные комбинированные колебательные смещения в а) растяжении C=O амида I моды $v_6(A')$ и б) растяжении C–N симметричной деформации и CH₃ амида II моды $v_7(A')$ в ДМФА.

Ангармонические колебания ДМФА были подробно проанализированы для идентификации и характеристики интересующих колебательных мод. Особое внимание было уделено валентным колебаниям связи C=O, поскольку это необходимо для понимания «красных» сдвигов наблюдаемых спектров. Идентификация и отнесение рассчитанных ангармонических частот к атомным смещениям были выполнены с помощью программного обеспечения GaussView путем визуализации и сравнения с литературными данными [191] векторов атомных смещений для каждой колебательной моды.

Заключение по главе 2

В данной главе описаны лазерные системы, используемые для исследования инактивации патогенных микроорганизмов и микроскопических процессов, происходящих при ней. Приведены ключевые характеристики лазерных систем. Данные лазерные системы обеспечивают гибкую подстройку параметров по длине волны, что необходимо для селективного возбуждения выбранных колебательных мод вещества.

Дано описание микробиологической части исследований. Обоснован выбор модельных культур (*P. aeruginosa* и *S. aureus*) как клинически значимых патогенов. Применялись культуры референтной коллекции, что повышает воспроизводимость

исследований. Многократная отмыка дистиллированной водой при подготовке культур обеспечивает исключение спектрально активных примесей в среднем ИК-диапазоне. Обоснован выбор подложек: спектральная прозрачность в рабочем диапазоне и химическая инертность исключают артефакты поглощения и собственную антимикробную активность. Методика оценки жизнеспособности культур после облучения ИК-импульсами валидирована и обеспечивает построение количественных зависимостей от интенсивностей лазерного излучения. Методы предварительной и постхарактеризации образцов позволяют выявить механизмы, происходящие на молекулярном уровне после воздействия ИК-импульсами, и исключить лазерную аблацию клеточной стенки.

Совокупность описанных установок, материалов и методик обеспечивает воспроизводимую постановку экспериментов и даёт возможность последующей интерпретации механизмов инактивации и сравнения ее эффективности на различных длинах волн.

Глава 3. Инактивация патогенных бактерий путем селективного фемтосекундного возбуждения в среднем ИК-диапазоне

В данной главе описано исследование возможности инактивации грамотрицательных (*P. aeruginosa*) и грамположительных (*S. aureus*) патогенных бактерий фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона с длинами волн, соответствующими колебаниям C–N и C=O связей амидных групп белков 1510–1700 см^{−1} (~6 мкм) и C–H связей углеводородного скелета биомолекул ~3100–3500 см^{−1} (~3 мкм), а также длины волны 5,2 мкм, на которой отсутствует выраженное поглощение. Продемонстрирована возможность инактивации бактерий фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм, находящихся под полиэтиленовой пленкой, прозрачной в данном диапазоне, и сделан вывод о спектрально-селективном характере инактивации.

3.1 Селективная инактивация бактерии *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона (3,4 и 6 мкм)

В данном разделе описано исследование возможности инактивации грамотрицательной патогенной бактерии *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона с длинами волн 3,4 и 6 мкм. Выбор длин волн обусловлен наличием у бактериальной клетки полос поглощения амидных групп белков и нуклеиновых кислот в диапазоне 5,8–6,1 мкм и полос колебаний алифатических C–H связей в диапазоне 3,3–3,5 мкм, относящиеся преимущественно к жирнокислотным цепям различных мембранных амфифилов (например, фосфолипидов) и колебаниям боковых цепей аминокислот (рис. 3.1) [130].

В данном эксперименте были использованы фемтосекундные лазерные импульсы с центральными длинами волн 3,4 мкм (полуширина 0,4 мкм), энергия в импульсе – 30 мкДж, длительность $\tau = 130$ фс и 6 мкм (полуширина 0,6 мкм), 10 мкДж в импульсе, $\tau = 140$ фс. Частота следования импульсов составляла 1 кГц.

Излучение с данными длинами волн получено путем генерации излучения разностной частоты титан-сапфирового фемтосекундного лазера Tsunami (Spectra-Physics, США) с центральной длиной волны 800 нм. Диапазон пиковых интенсивностей для 3-мкм лазерного излучения составлял $(1,4-13,3) \times 10^2$ ГВт/см², для 6-мкм лазерного излучения – $(0,98-15,3) \times 10^2$ ГВт/см². Пиковая интенсивность менялась путем смещения образца по оптической оси (направление *у* на рис. 2.5). Диаметры лазерного пучка в каждом положении фокусировки измерены на полуширине пучка, и находились в диапазоне 143–433 мкм для 3-мкм излучения и 244–287 мкм для 6-мкм излучения. Схема эксперимента представлена на рисунке 2.5.

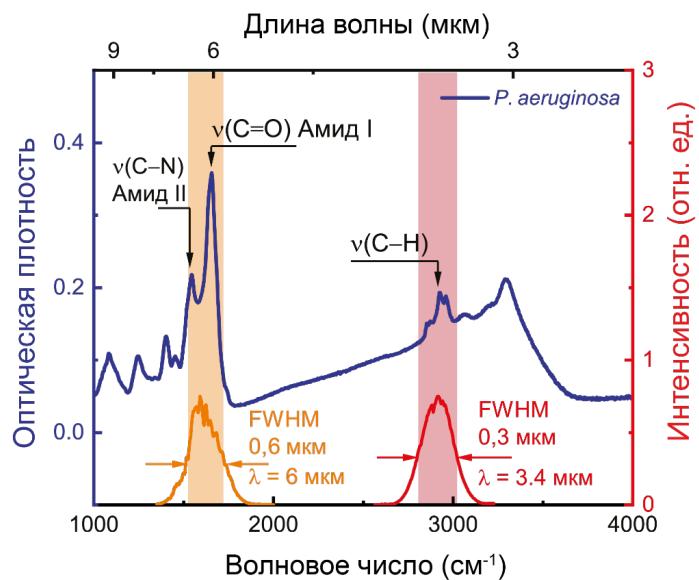


Рис. 3.1 Спектр оптической плотности бактериальной культуры *P. aeruginosa* (слой толщиной ~1,5 мкм) – левая ось, спектры лазерных импульсов с длинами волн 3,4 и 6 мкм – правая ось.

Для контрольных образцов (без облучения) и облученных лазерными импульсами с различной интенсивностью проведен анализ жизнеспособности по методу, описанному в главе 2. По результатам анализа для серии экспериментов для каждой длины волны получены зависимости КОЕ/мл от интенсивности лазерных импульсов (рис. 3.2), где синий столбец соответствует необлученному

образцу, выступающему в качестве контроля, оранжевые – облученным с различной интенсивностью лазерных импульсов. Начальное значение КОЕ/мл всех образцов соответствовало контрольному и составляло 10^5 КОЕ/мл. После лазерного воздействия данное значение снижалось. Снижение значения КОЕ/мл для бактерии на 2–3 и более порядка показывает, что метод обладает выраженным антибактериальным эффектом.

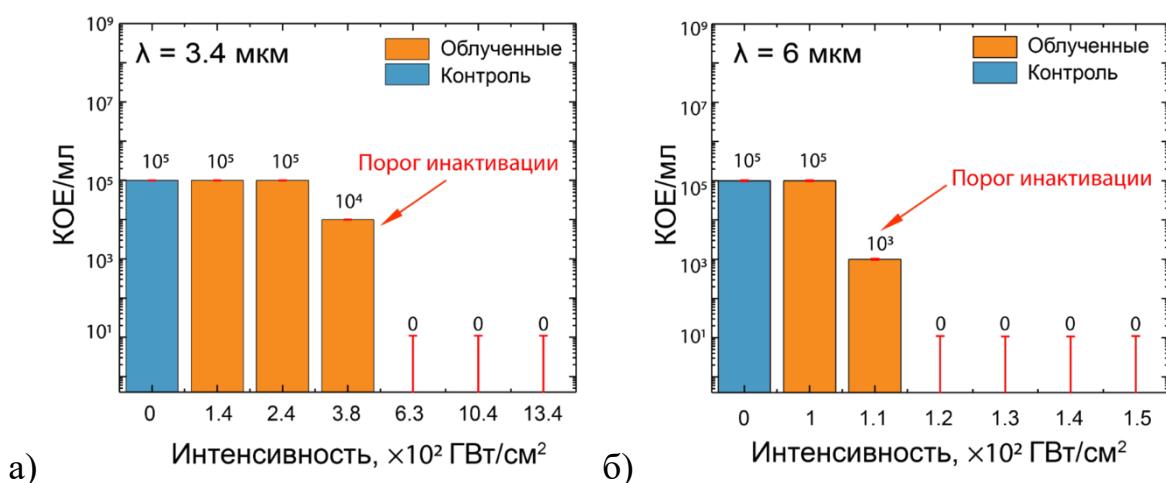


Рис. 3.2 Количество КОЕ/мл, соответствующее бактериальным образцам *P. aeruginosa*, обработанным фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны а) 3,4 мкм и б) 6 мкм при различной интенсивности (оранжевые столбцы), а также контрольному образцу (синий столбец).

Данные демонстрируют, что пороговая интенсивность инактивации бактерий *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм составляет $\sim 1,1 \times 10^2$ ГВт/см 2 (рис. 3.2, а). Пороговая интенсивность инактивации бактерий *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 3,4 мкм составляет $\sim 3,8 \times 10^2$ ГВт/см 2 (рис. 3.2, б), что значительно (более чем в три раза) превышает порог инактивации для импульсов с длиной волны 6 мкм.

3.2 Спектральная зависимость порога инактивации бактерий *S. aureus* фемтосекундными импульсами среднего ИК-диапазона (3,4–6 мкм)

Исследование порога инактивации от длины волны фемтосекундных импульсов среднего ИК-диапазона исследовано на модели патогенных микроорганизмов *S. aureus* (золотистый стафилококк). Облучение образцов выполнено в режиме сканирования импульсами с длинами волн 3,4 мкм (алифатические С–Н связи), 6 мкм (колебания амида I белков и нуклеиновых кислот) и 5,2 мкм (область слабого поглощения, выбранная для сравнения).

Импульсы среднего ИК-диапазона получены путем генерации излучения разностной частоты на системе ТЕТА. Частота следования импульсов составляет 10 кГц, длительность импульса – 350 фс. Диапазоны интенсивностей лазерных импульсов составляли: для $\lambda = 3,4$ мкм – $(3–11,3) \times 10^2$ ГВт/см², $\lambda = 5,2$ мкм – $(1–4,3) \times 10^2$ ГВт/см², $\lambda = 6$ мкм – $(0,3–11,3) \times 10^2$ ГВт/см². Сканирование лазерным лучом осуществлялось с перекрытием 50% (N=2 импульса в точку). Перемещение образца в фокальной плоскости осуществлялось с помощью программируемой моторизированной двухкоординатной подвижки.

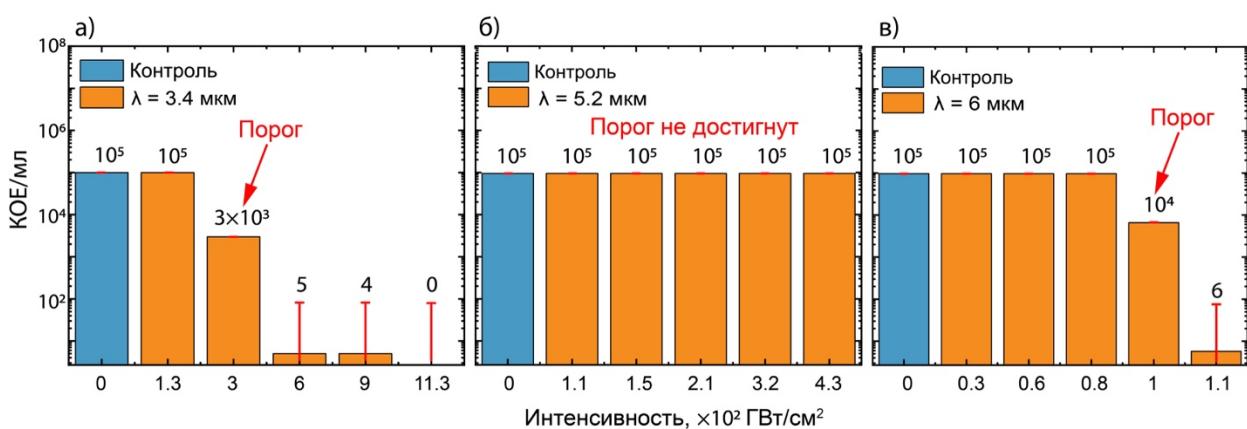


Рис. 3.3 Количество КОЕ/мл, соответствующее бактериальным образцам *S. aureus*, обработанным фемтосекундными лазерными импульсами с длинами волн: а) 3,4 мкм б) 5,2 мкм и в) 6 мкм при различной интенсивности (оранжевые столбцы), а также контрольному образцу (синий столбец).

Результаты микробиологических исследований облученных и контрольных образцов показали пороговый характер инактивации, зависящий от интенсивности импульсов (рис. 3.3). При воздействии с длиной волны 3,4 мкм (рис. 3.3а) при интенсивности 3×10^2 ГВт/см² число КОЕ/мл существенно падает до значения $\sim 3 \times 10^3$ КОЕ/мл. При дальнейшем росте интенсивности наблюдается почти полная инактивация (до нескольких клеток/мл). При длине волны воздействия 5,2 мкм (рис. 3.3б) инактивация не достигается при всех интенсивностях в диапазоне до $4,3 \times 10^2$ ГВт/см², количество бактерий остаётся на уровне контроля ($\sim 10^5$ КОЕ/мл). При воздействии излучением с длиной волны 6 мкм (рис. 3.3в) инактивация наблюдается при меньшей пороговой интенсивности – около 1×10^2 ГВт/см², когда количество живых бактерий снижается до $\sim 10^4$ КОЕ/мл.

Таким образом, наиболее эффективная инактивация достигается при длине волны излучения 6 мкм, где порог интенсивности существенно ниже, чем для 3,4 мкм. Данная зависимость продемонстрирована для грамположительных и грамотрицательных бактерий. Отсутствие инактивации при длине волны воздействия 5,2 мкм указывает на спектральную селективность: выраженный эффект достигается при длинах волн, приходящихся на области резонансного поглощения образца, тогда как при слабом поглощении инактивация не реализуется даже при повышенной интенсивности.

3.3 Инактивация патогенных бактерий под полиэтиленовой пленкой

Инфракрасное излучение с длиной волны ~ 6 мкм эффективно инактивирует патогенные микроорганизмы, находящиеся под полиэтиленовой пленкой. В большинстве марок полиэтилена отсутствуют сильные полосы поглощения в диапазоне 5,8–6,6 мкм, совпадающие с амидной областью поглощения белков (полоса амид I). Соответственно, в данном спектральном диапазоне плёнка демонстрирует высокую прозрачность. Для использованной ПЭ-плёнки

коэффициент пропускания вблизи 6 мкм составил порядка 90 % (рис. 3.4, что обеспечивает доставку излучения к биологическому объекту).

Напротив, в диапазоне 3,1–3,7 мкм ПЭ имеет выраженные полосы поглощения, обусловленные валентными колебаниями связей С–Н углеводородной матрицы, и пропускание падает до единиц процентов (поглощательная способность ~98 %). Поэтому использование излучения с длиной волны 3,4 мкм для инактивации через упаковку оказывается неэффективным.

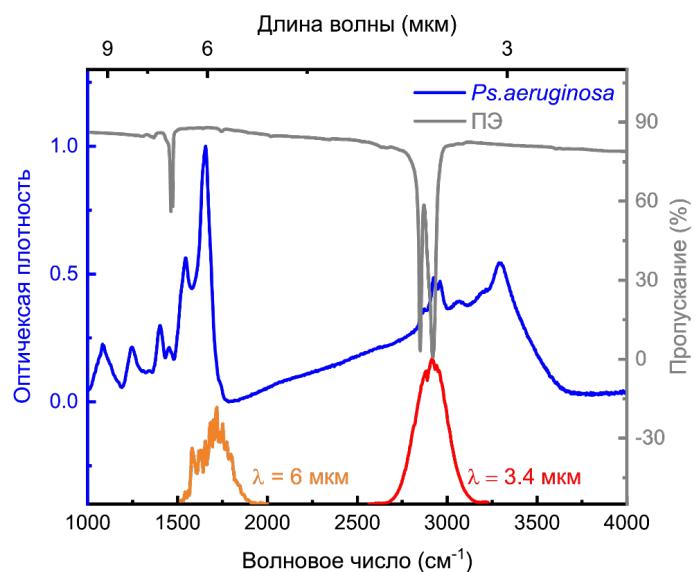


Рис. 3.4 Спектры оптической плотности бактериальной культуры *P. aeruginosa* (синий) – левая ось, спектр пропускания полиэтиленовой пленки (ПЭ) (серый) – правая ось, спектры лазерных импульсов с длинами волн 3,4 и 6 мкм.

Показано, что культура *P. aeruginosa*, накрытая ПЭ-плёнкой, инактивируется под действием фемтосекундных импульсов с длиной волны ~6 мкм, попадающей в область амидного поглощения белков и нуклеиновых кислот. Облучение проводили несфокусированным пучком (диаметр \approx 5 мм на поверхности образца) при интенсивности 8×10^6 Вт/см², время экспозиции – 3, 5 и 7 мин. Схема эксперимента представлена на рис. 2.9. Температура образцов в процессе обработки не превышала комнатной температуры (25°C), что исключает возможные тепловые эффекты при инактивации бактерий. По результатам

микробиологического анализа (табл. 2), при экспозиции 7 мин достигнуто снижение КОЕ/мл на ~ 2 порядка относительно контроля (таблица 3). Суммарная поглощённая энергия составила 8,4 Дж.

Таблица 3. Результаты микробиологического анализа образцов *P. aeruginosa*: после облучения лазерными импульсами с длиной волны ~ 6 мкм с различным временем экспозиции под ПЭ-пленкой и в ее отсутствие, контроль – необработанные бактерии.

	Время экспозиции, мин	<i>P. aeruginosa</i> под ПЭ-пленкой, КОЕ/мл	<i>P. aeruginosa</i> , КОЕ/мл
Обработка излучением $\lambda = 6$ мкм	3	5×10^2	1×10^3
	5	1×10^3	5×10^2
	7	3×10^3	4×10^2
Контроль	–	5×10^4	5×10^4

Эта спектральная селективность делает ИК-область около 6 мкм перспективной для бесконтактной инактивации микроорганизмов в условиях с ограниченным прямым доступом к объекту: обработка медицинских катетеров, дезинфекция упакованных изделий и инактивация возбудителей особо опасных инфекций.

3.4 Обсуждение результатов

Микробиологические исследования показали, что инактивация фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона имеет пороговый характер в зависимости от интенсивности излучения. Для импульсов с длиной волны 6 мкм пороговое значение интенсивности импульсов ниже, чем для импульсов с длиной волны 3,4 мкм. Пороговые интенсивности инактивации составляют $3,8 \times 10^2$ ГВт/см² и $1,1 \times 10^2$ ГВт/см² для 3-мкм и 6-мкм излучения, соответственно. Как при воздействии 3-мкм, так и при воздействии 6-мкм

лазерного излучения при интенсивности, превышающей пороговую, количество бактерий уменьшается на 5 порядка по сравнению с исходным, что указывает на дезинфекцию.

Как показано на рисунке 3.1, лазерные импульсы с длиной волны 6 мкм (в диапазоне волновых чисел $1650\text{--}1750\text{ см}^{-1}$) попадают в полосы колебаний, соответствующие: 1) валентным колебаниям карбонильных C=O-связей нуклеиновых кислот ($1680\text{--}1715\text{ см}^{-1}$), 2) валентным колебаниям C=O-групп в сложноэфирных фрагментах липидов и жирных кислот ($\approx 1740\text{ см}^{-1}$) и 3) валентным колебаниям C=O-связей пептидной группы, ассоциированных с α -спиралями и β -складчатостями белков (полоса амид I: 1650 см^{-1}) [201], что приводит к интенсивному локальному возбуждению белков и аминокислот. Напротив, лазерные импульсы длиной волны 3,4 мкм ($2700\text{--}3050\text{ см}^{-1}$) воздействуют на асимметричное растягивающее колебание C—H-связей в алифатических $-\text{CH}_2$ и $-\text{CH}_3$ фрагментах жирных кислот и липидов в клеточной стенке бактерий, а также боковых цепей аминокислот в диапазоне $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, что обеспечивает однородное поглощение всей бактериальной клеткой, при этом для инактивации требуется значительно более высокая интенсивность лазерного излучения.

Анализ образцов методом просвечивающей электронной микроскопии выявил появление темных участков в объеме клеток *P. aeruginosa*, обработанных излучением с длиной волны 6 мкм, отсутствующих в необработанных бактериях и обработанных на длине волны 3,4 мкм (рис. 3.5).

Снимки демонстрируют сохранение морфологии (отсутствие абляции, нарушения целостности мембранны) бактериальной клетки после воздействия лазерными импульсами.

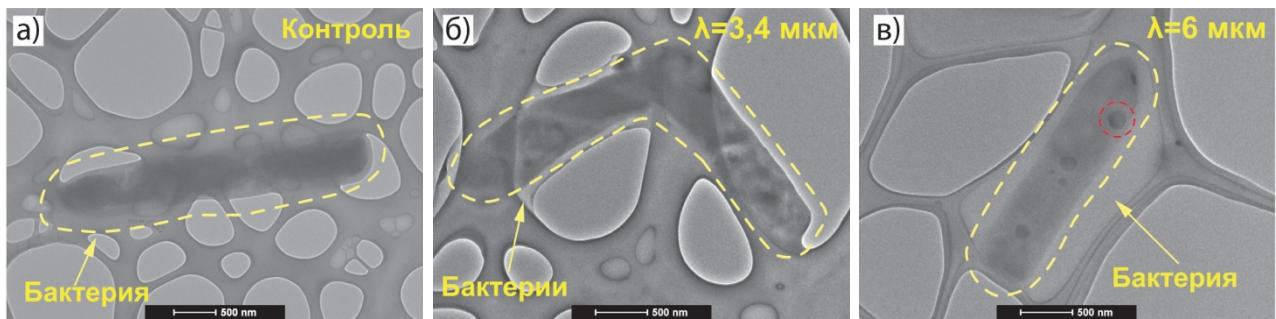


Рис. 3.5 ПЭМ-изображения клеток *P. aeruginosa*, отмытых от субстрата CaF_2 , контрольных (а) и после облучения на длине волн 3,4 мкм (б) и 6 мкм (в). Красным кругом обозначена область модификации.

После воздействия лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм в клетке появляются темные области модификации размером ~ 100 нм, связанные с воздействием излучения (рис. 3.5в). Принимая этот размер за характерный размер зоны выделения энергии (L в метрах), было оценено время трехмерной сферической тепловой диффузии (3.1):

$$t_d \approx \frac{L^2}{24\alpha} : \frac{(10^{-7} \text{ м})^2}{10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}} \sim 10^{-8} \text{ с} \quad (3.1)$$

где α – коэффициент температуропроводности в $\text{м}^2/\text{с}$.

Полученное время тепловой диффузии значительно меньше периода следования импульсов в данных экспериментах:

$$t_d \sim 10^{-8} \text{ с} \ll \frac{1}{1-10 \text{ кГц}} \quad (3.2)$$

Соотношение (3.2) свидетельствует о том, что тепло из зоны поглощения успевает рассеиваться до прихода следующего импульса, вследствие чего процесс протекает в ненакопительном режиме.

Отсутствие абляции (или локальное разрушение стенок бактерий) и удаления бактерий с подложки также было подтверждено измерением оптической плотности до и после обработки (рисунок 3.6) и методом атомно-силовой микроскопии (толщина слоя не уменьшилась).

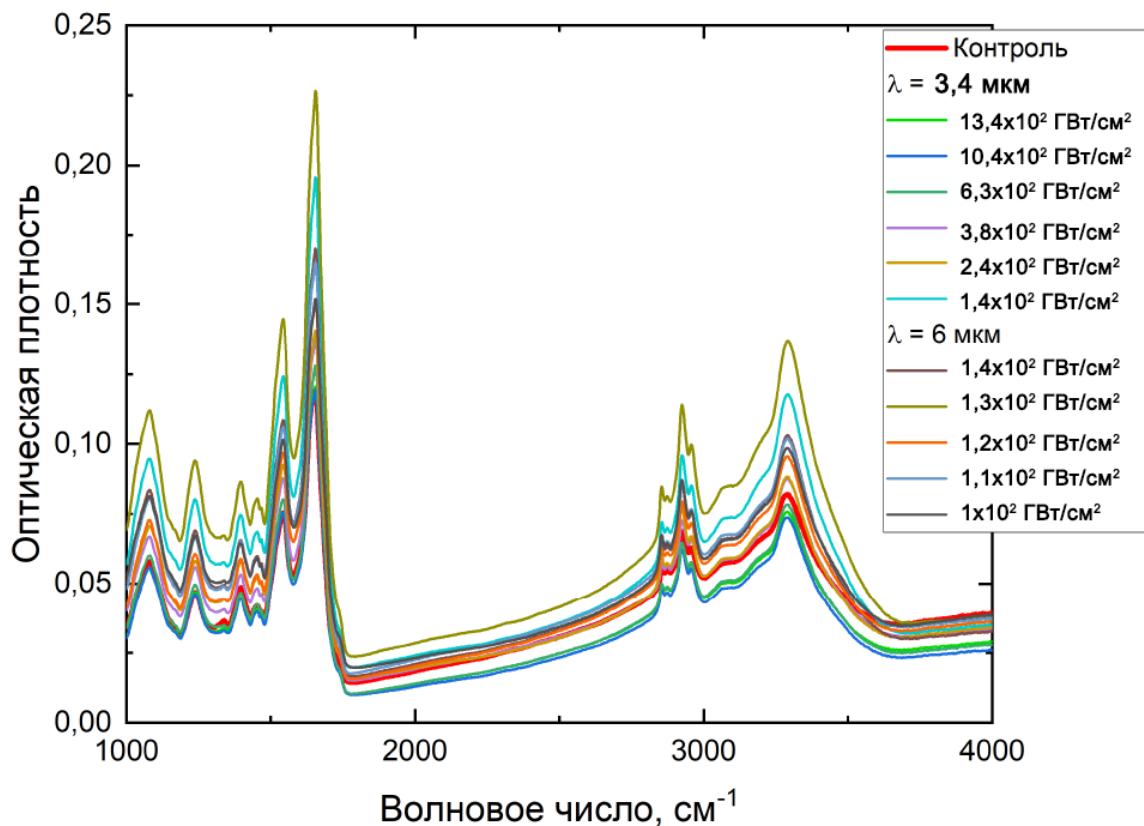


Рис. 3.6 Спектр оптической плотности слоя образцов бактерий *P. aeruginosa* толщиной 1,5 мкм после облучения 3,4-мкм и 6-мкм лазерными импульсами с различной интенсивностью.

При сопоставлении спектров оптической плотности (ОП) бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* и порогов интенсивностей их инактивации (I) (рис. 3.7а, б) можно наблюдать, что более высоким значениям ОП соответствуют более низкие значения поровой интенсивности инактивации I. При сопоставлении величины, обратной интенсивности $1/I$, наблюдается линейная корреляция (рис. 3.7в, г):

$$\frac{1}{I} \approx 0 \Pi \propto \alpha. \quad (3.3)$$

Это означает, что для диапазонов, где поглощение более выражено, требуемая пороговая интенсивность лазерного излучения оказывается ниже, что указывает на селективный характер взаимодействия.

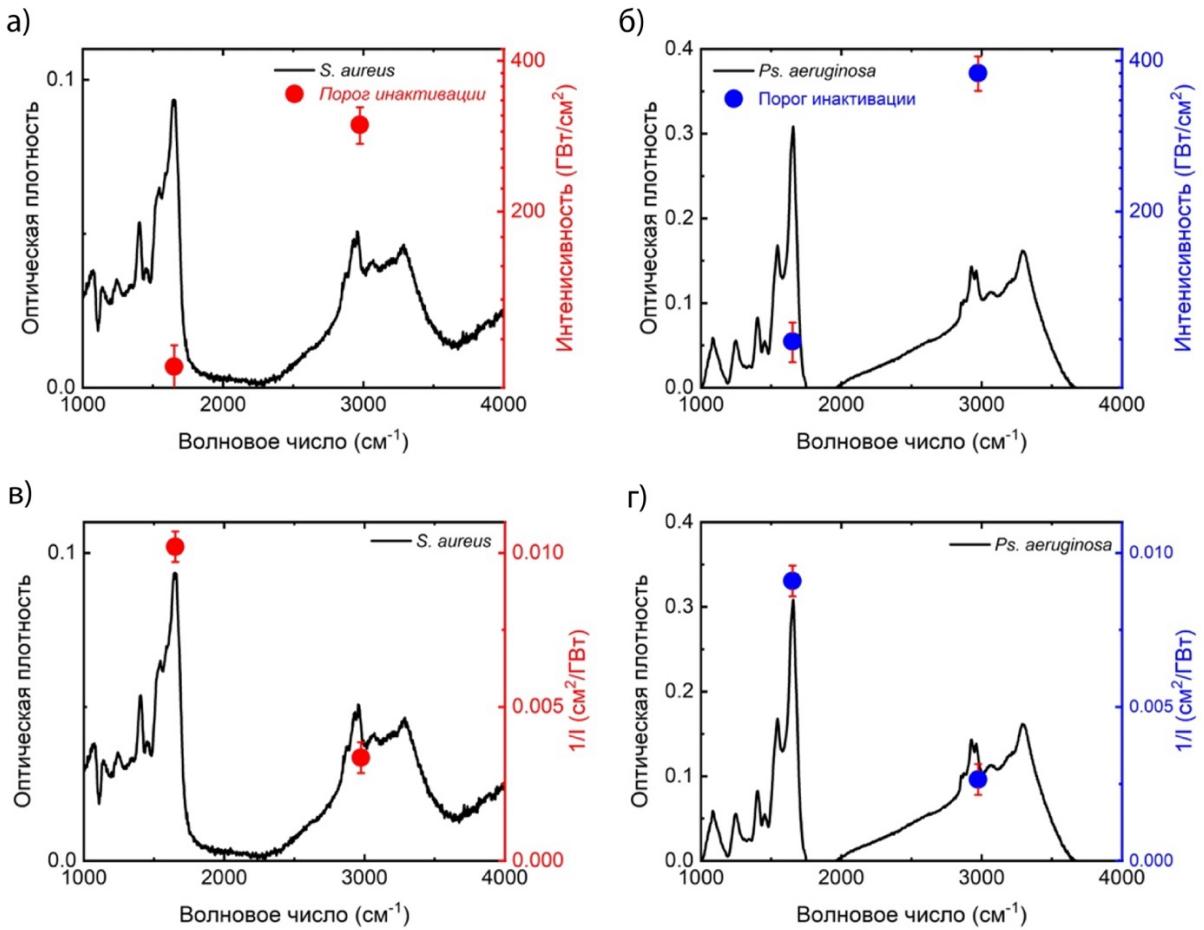


Рис. 3.7 Спектры оптической плотности и пороговые интенсивности инактивации для бактерий *S. aureus* (а) и *P. aeruginosa* (б); обратная величина пороговой интенсивности ($1/I$) и оптическая плотность для бактерий *S. aureus* (в) и *P. aeruginosa* (г).

Как показано на рис. 3.7, б корреляция между величинами ОП и $1/I$ для обеих культур, это говорит о том, что произведение зависящего от длины волны коэффициента поглощения на пороговую интенсивность инактивации является константой для данной культуры:

$$\alpha I \approx \text{const} \quad (3.4)$$

где α – коэффициент поглощения, связанный с микроскопическими параметрами через выражение:

$$\alpha \approx \sigma N \quad (3.5)$$

где σ – сечение поглощения, N – концентрация поглощающих центров.

Выражение (3.5) обеспечивает высокую скорость колебательного возбуждения и плотность вложения энергии, а также указывает, что поглощение, ответственное за инактивацию, является однофотонным ступенчатым, а не многофотонным. При этом, более высокие коэффициенты поглощения соответствуют более высоким сечениям переходов. Поперечные сечения поглощения для длин волн 6 и 3,4 мкм составляют: $\sigma_6 \approx 3.6 \times 10^{-17} \text{ см}^2/\text{мол}$ и $\sigma_{3,4} \approx 1.2 \times 10^{-18} \text{ см}^2/\text{мол}$ [156].

Таким образом, процесс инактивации биологических образцов под действием фемтосекундного ИК-излучения является селективным и определяется спектральными особенностями их поглощения.

Выводы по главе 3

В данной главе продемонстрирована инактивация фемтосекундным лазерным излучением среднего ИК-диапазона (3,4 мкм и 6 мкм) грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus* в ненакопительном режиме.

Исследования микробиологической жизнеспособности показали, что относительно равномерное фемтосекундное лазерное колебательное возбуждение С-Н-связей бактерий на длине волны 3,4 мкм соответствует более высокому порогу интенсивности для эффективной инактивации бактерий по сравнению с более пространственно-селективным возбуждением их сильной полосы С=О-связей фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм.

Отсутствие эффекта инактивации при длине волны 5,2 мкм свидетельствует о спектральной селективности процесса: выраженная инактивация реализуется только в диапазонах, соответствующих областям резонансного поглощения

образца, тогда как при слабом поглощении воздействие остаётся неэффективным даже при высокой интенсивности излучения.

Фемтосекундное лазерное излучение среднего ИК-диапазона с длиной волны 6 мкм, соответствующей поглощению амидных групп белков бактериальной клетки, способно инактивировать микроорганизмы, накрытые полиэтиленовой пленкой. Полиэтиленовая пленка обладает пропусканием порядка 90% в спектральном диапазоне 5,8–6,7 мкм и не препятствует распространению излучения с длиной волны 6 мкм. Данный метод инактивации имеет потенциал применения в пищевой промышленности для обеззараживания упакованной продукции, а в медицине – для инактивации особо опасных бактерий.

Глава 4. Исследование механизмов инактивации патогенных бактерий методом спектроскопии пропускания фемтосекундных лазерных ИК-импульсов

В данной главе образцы планктона бактерий *P. aeruginosa*, нанесённые на ИК-прозрачную кремниевую подложку, были исследованы методом спектроскопии динамического пропускания при воздействии фемтосекундных лазерных импульсов с длинами волн 3,4 и 6 мкм в контексте изучения молекулярных механизмов инактивации.

4.1 Спектральная динамика при накачке фемтосекундным излучением с длиной волны 6 мкм

В данном разделе представлены результаты исследования трансформаций ИК-спектра образцов планктона бактерий *P. aeruginosa*, нанесённых на ИК-прозрачную кремниевую подложку, методом спектроскопии динамического пропускания при воздействии фемтосекундных импульсов с длиной волны 6 мкм. Анализ выполнен в зависимости от пиковой интенсивности излучения, варьируемой от малых значений до уровней, превышающих порог инактивации бактерии. Методика эксперимента и схема установки описаны в Главе 2.

Центральная длина волны излучения фемтосекундных лазерных импульсов составляла 6,1–6,2 мкм при полуширине спектра 0,6 мкм и длительности импульса 140 фс. Максимальная энергия лазерных импульсов составляла 12,5 мДж. Ширина спектра обеспечивала возбуждение колебаний C=O и C–N амидных групп I и II бактериальной клетки. Спектр оптической плотности слоя бактерий после коррекции на спектр чистого кремния представлен на рис. 4а синей кривой.

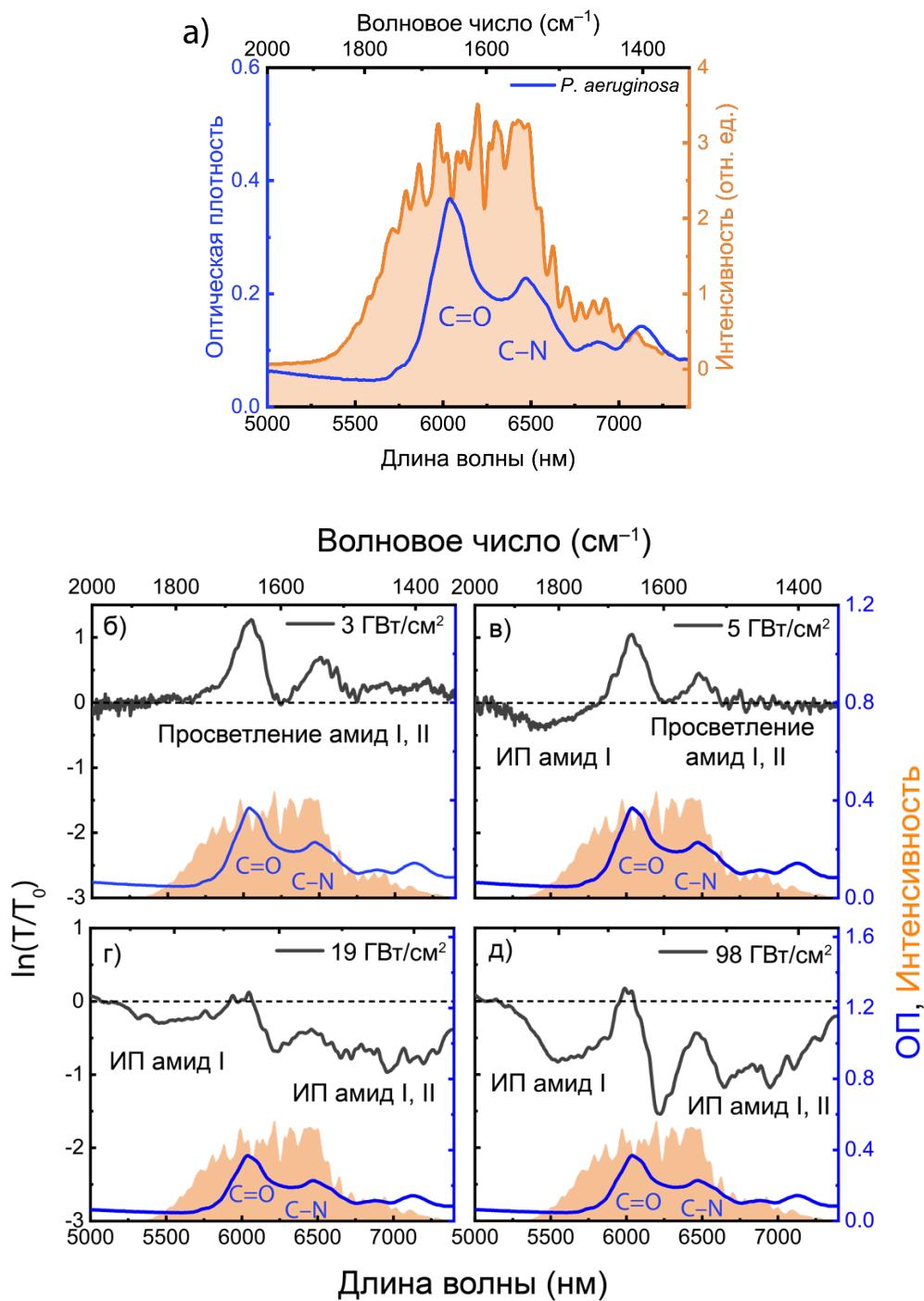


Рис. 4.1 а) Стационарный спектр оптической плотности бактериального покрытия *P. aeruginosa* в диапазоне колебаний амид I и амид II (правая ось), спектр интенсивности фемтосекундного лазерного импульса с длиной волны 6 мкм (левая ось); б–д) спектры нормированного динамического пропускания $\ln(T/T_0)$ при $I = 3$ (б), 5 (в), 19 (г) и 98 (д) $\text{ГВт}/\text{см}^2$ (левая ось), для сравнения приведен спектр оптической плотности (ОП) (правая ось); ИП – индуцированное поглощение.

Воздействие фемтосекундными ИК-импульсами производилось в диапазоне интенсивностей 3–98 ГВт/см², что охватывает как значения ниже, так и вблизи установленного ранее порогового уровня инактивации бактерий ($\approx 1,1 \times 10^2$ ГВт/см²) [191]. Для каждого значения интенсивности был измерен спектр пропускания образца бактериальной культуры, затем были построены спектры изменения относительного пропускания $\ln(T/T_0)$, где T – спектр пропускания образца под воздействием импульсов накачки, T_0 – спектр пропускания необлученного образца [196]. Спектры изменения относительного пропускания для различных интенсивностей накачки (3, 5, 19 и 98 ГВт/см²) приведены на рис. 4.1 (б-д).

При сравнении со стационарным спектром бактерий *P. aeruginosa* спектр изменения относительного пропускания $\ln(T/T_0)$ при минимальной интенсивности $I = 3$ ГВт/см² (рис. 4.1б) демонстрирует: i) просветление интенсивных и хорошо разрешённых полос поглощения (положительные значения) в областях 1650 см⁻¹ (амид I) и 1550 см⁻¹ (амид II), совпадающих с максимумами спектральной яркости лазерного излучения; ii) отсутствие изменений по сравнению с пропусканием необлучённого образца T_0 (нулевые значения) в диапазонах исходно слабого поглощения 1350–1500 и 1800–2000 см⁻¹, где спектральная яркость излучения также мала.

При увеличении интенсивности до $I = 5$ ГВт/см² спектр изменения относительного пропускания $\ln(T/T_0)$ (рис. 4.1в) демонстрирует помимо полос частичного просветления колебаний амидов I и II, появление локального минимума в области 1800–1850 см⁻¹ (отрицательные значения), соответствующего наведённому поглощению в бактериях.

При увеличении интенсивности до $I = 19$ ГВт/см² (рис. 4.1г) в спектре изменения относительного пропускания $\ln(T/T_0)$ ослабляются («размываются» во времени импульса) эффекты просветления полос поглощения амидов I и II на гармонических частотах. Наблюдается эффект наведённого поглощения амида I с

«синим» (область ≈ 1800 см $^{-1}$) и амидов I, II с «красным» смещением в области 1400–1600 см $^{-1}$ (рис. 4.1 г).

С дальнейшим ростом интенсивности до $I = 98$ ГВт/см 2 (рис. 4.1 д), в области близкой к пороговой интенсивности инактивации бактерий *P. aeruginosa* ($1,1 \times 10^2$ ГВт/см 2), наблюдаются эффекты наведенного поглощения в «синей» (1700–1850 см $^{-1}$) и «красной» (1400–1500 см $^{-1}$) областях спектра.

4.2 Спектральная динамика при накачке фемтосекундным излучением с длиной волны 3,4 мкм

В данном разделе представлены результаты исследования изменений ИК-спектров планктонной культуры *P. aeruginosa*, нанесённой на кремниевую подложку, прозрачную в исследуемой области, методом спектроскопии динамического пропускания при воздействии фемтосекундных импульсов с длиной волны 3,4 мкм [196]. Анализ выполнен для серии экспериментов при варьировании пиковой интенсивности излучения. Методика и схема установки приведены в главе 2.

Центральная длина волны излучения фемтосекундных лазерных импульсов составляла 3,4 мкм при полуширине спектра около $\approx 0,4$ мкм и длительности импульса 130 фс. Максимальная энергия лазерных импульсов составляла 30 мкДж. Спектр лазерного импульса представлен на рис. 4.2 красной кривой. Ширина спектра обеспечивала перекрытие С–Н колебаний в диапазоне 2850–3000 см $^{-1}$. Спектр оптической плотности слоя бактерий после коррекции на спектр чистого кремния представлен на рис. 4.7 синей кривой.

На рисунке 4.2 видно, что при поглощении излучения с длиной волны 3,4 мкм в спектрах изменения относительного пропускания наблюдается просветление основной полосы гармонических С–Н колебаний.

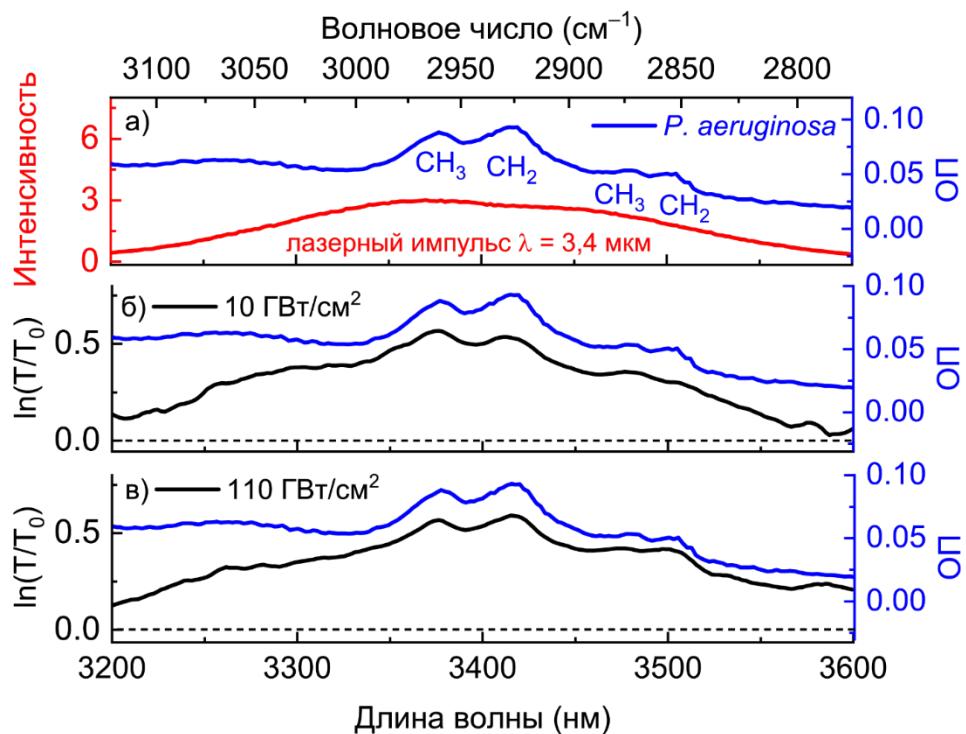


Рис. 4.2 а) Стационарный спектр оптической плотности (ОП) бактериального покрытия *P. aeruginosa* в диапазоне С–Н колебаний (правая ось), спектр интенсивности фемтосекундного лазерного импульса с длиной волны 3,4 мкм (левая ось); б) спектр изменения динамического пропускания $\ln(T/T_0)$ при $I_0 = 10$ ГВт/см² и в) спектр изменения динамического пропускания $\ln(T/T_0)$ при 110 ГВт/см² (левая ось); для сравнения приведен спектр оптической плотности (ОП) (правая ось).

4.3 Обсуждение результатов

Спектральная область 1600–1700 см^{−1} представляет собой набор перекрывающихся полос. Полоса амид I (≈ 1650 см^{−1}) является колебанием полипептидного каркаса, которое возникает в основном (на 80%) из-за валентного колебания C=O пептидных групп с незначительными вкладом валентных CN, деформационных CCN и плоскостного деформационного NH колебаний. На частоту колебания амида I практически не влияет природа боковых цепей макромолекулы, но существенно влияет ее вторичная структура. Амид I является

наиболее часто используемым колебанием для анализа вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот. Различные элементы вторичной структуры белка (α -спирали, β -складчатости) поглощают излучение в области $1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$. Однако частоты колебаний этих структур в значительной степени перекрываются, за счет чего в спектре поглощения белка наблюдается широкая полоса колебаний амида I. Элементы вторичной структуры стабилизируются водородными связями, которые соединяют пептидные группы в трехмерную матрицу макромолекулы (рис. 4.4). Частотное положение максимума поглощения амида I в различных элементах вторичной структуры коррелирует с прочностью водородных связей. Частота полосы поглощения амида I уменьшается с увеличением прочности водородных связей [193].

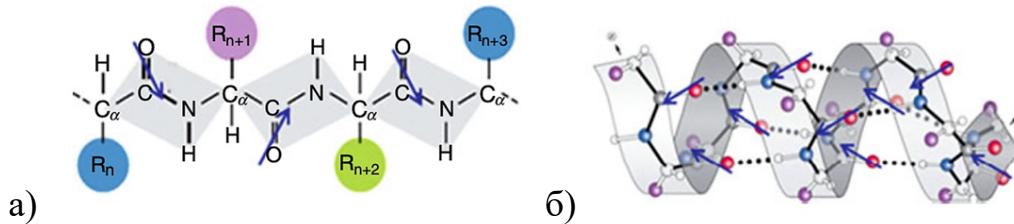


Рис. 4.4 С=О колебание в модах амид I. Колебание амид I вторичной структуры, стабилизированной сетью водородных связей: а) полипептидная цепь, синие стрелки указывают на переходные диполи мод амида I; б) иллюстрация С=О–колебаний с водородными связями внутри α -спирали [195].

Полоса амида II ($\approx 1550\text{ см}^{-1}$) обусловлена преимущественно внутриплоскостным деформационным колебанием N–H в сочетании с валентным колебанием C–N. Меньший вклад вносят внутриплоскостные деформации C=O и валентные колебания C–C и N–C. Амид II также слабо зависит от колебаний боковых цепей макромолекулы, а её связь со вторичной структурой менее выражена, чем у амида I [193].

Вид спектра $\ln(T/T_0)$ при $I = 3\text{ ГВт/см}^2$ на рис. 4.1, б указывает, что в облучаемой области бактериального покрытия в пределах длительности

фемтосекундного ИК-импульса для части амидных групп произошли переходы между колебательными уровнями $v = 0 \rightarrow 1$ на гармонических частотах 1650 см^{-1} (амид I) и 1550 см^{-1} (амид II). Частичное насыщение обусловлено заселением колебательного уровня $v = 1$.

Поскольку типичные колебательные сечения поглощения изменяются в диапазоне $\sigma_{01} \approx 10^{-19} - 10^{-17} \text{ см}^2/\text{мол}$ [194], а полоса амида I $v = 0 \rightarrow v = 1$ является сильной в ИК-спектрах органических веществ, то время однофотонного перехода для σ_{01} можно найти следующим образом:

$$\tau = \frac{1}{\sigma_{01}\Phi_{\min}} \sim 0,1 \text{ пс} \quad (4.1)$$

Для использованных в работе световых потоков Φ за время действия фемтосекундного импульса длительностью 140 фс населенность уровней $v = 0$ и $v = 1$ успевает частично выровняться. Такой же эффект наблюдается для полосы амида II ($\sim 1540 \text{ см}^{-1}$).

При интенсивности $I = 5 \text{ ГВт/см}^2$ рост населенности первого колебательного уровня $v = 1$ приводит не только к просветлению полос, но и появлению поглощения в высокочастотной области спектра («синий» сдвиг). Тот же эффект присутствует в олигомерах этанола и пептидах, для которых наблюдался «синий» сдвиг поглощения на $100-300 \text{ см}^{-1}$, указывающий на восстановление C=O-связи после отрыва протона H⁺ [196, 197]. В настоящей работе эффект возникает в пределах длительности фемтосекундного импульса за счёт раскачки сильного C=O-колебания (период ~ 20 фс при частоте 1650 см^{-1} , энергия перехода $v = 0 \rightarrow 1$ – 0,2 эВ). Поскольку межмодовый перенос на временах порядка 100 фс несущественен, возбуждённое ангармоническое колебание C=O с энергией 0,2 эВ может разрывать слабые водородные связи (типичная энергия связи в белках $\approx 0,02-0,07$ эВ [199]) (рис. 4.5). Поскольку амид I (C=O) в белках и нуклеиновых кислотах связан с протоном через водородную связь, то при возбуждении фемтосекундным импульсом с длиной волны 6 мкм для амида I возможен как

переход $\nu = 0 \rightarrow 1$, так и разрыв водородной связи за счет механической передачи энергии диссоциации $\approx 0,01\text{--}0,1$ эВ на водородную связь при каждом неупругом столкновении атомов О ($M_O \approx 16$ а.е.м.) и Н ($M_H \approx 1$ а.е.м.) с их приведенными массами в осцилляторах C=O и N-H:

$$\mu_1 = \frac{M_C M_O}{M_C + M_O} \approx 10 \text{ а.е.м.}, \mu_2 = \frac{M_N M_H}{M_N + M_H} \approx M_H \approx 1 \text{ а.е.м.}, \Delta\epsilon \approx \hbar\Omega \frac{\mu_2}{\mu_1}, \quad (4.2)$$

где $M_C \approx 12$ а.е.м. и $M_N \approx 14$ а.е.м. – атомные массы атомов углерода (C) и азота (N).

Эффект наблюдается для водородной связи со свободным амидом I с частотой ~ 1732 см $^{-1}$, рассчитанной для отдельной молекулы ДМФА (табл. 4), по сравнению с ее экспериментально измеренной частотой влияния водородной связи ~ 1670 см $^{-1}$ в растворах. Также подобный эффект наблюдался при схожих условиях в работе [198]. Для амида II данного эффекта не ожидается по причине отсутствия у него водородных связей.

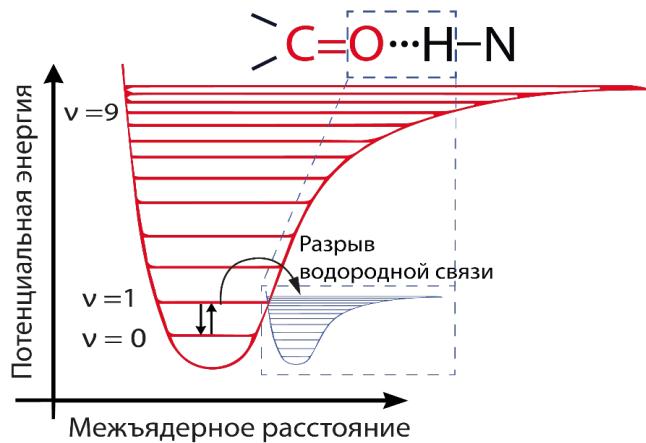


Рис. 4.5 Схематическое изображение потенциалов Морзе, иллюстрирующих ангармоническое колебание связи C=O, его взаимодействие с водородной связью O···H.

При интенсивности $I = 19$ ГВт/см 2 появляется полоса поглощения в области $\sim 1400\text{--}1600$ см $^{-1}$ (минимум $\ln(T/T_0)$ на рис. 4.1, г). Мы полагаем, что как только связь C=O амида I становится свободной от водорода при более низких интенсивностях фемтосекундного лазера («синий» сдвиг на рис. 5, в), при более

высоких интенсивностях она начинает возбуждаться на высокие колебательные уровни $v > 1$. Это устанавливает серию каскадных переходов $v \rightarrow v + 1$ с их связанным квазиконтинуумом ангармонически сдвинутых полос поглощения с максимально возможным красным сдвигом $\Delta \sim 450 \text{ см}^{-1}$, что объясняет некоторый вклад поглощения моды амида II (рис. 5, г). Высокие сечения поглощения ИК-излучения модами амидов I, II и соответствующие интенсивности фемтосекундного лазера (потоки $\Phi = 10^{30}$ фотонов/ $\text{см}^2\text{с}$) подтверждают это наблюдение внутриимпульсного многоступенчатого колебательного возбуждения.

При интенсивностях $I = 98 \text{ ГВт/см}^2$, сходных с пороговой интенсивностью для инактивации микроорганизмов (рис 4.1, д), поглощённая амидной группой энергия возрастает за счёт возбуждения всё более высоких колебательных уровней амидов I и II. Спектр демонстрирует интенсивные полосы, смещенные в «синюю» и «красную» области поглощения. Такое сильное колебательное возбуждение может быть обеспечено посредством многофотонных колебательных переходов или переходов в квазиконтинууме высоких колебательных состояний, обусловленных интенсивными центральными компонентами спектра лазерного излучения (рис. 4.6).

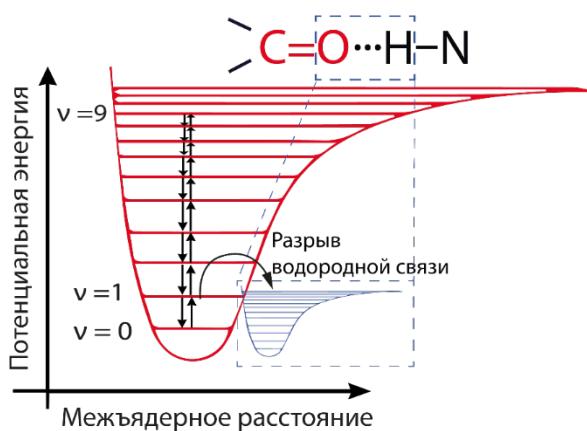


Рис. 4.6 Схематическое изображение потенциалов Морзе, иллюстрирующих ангармоническое колебание связи C=O, его взаимодействие с водородной связью O...H и возбуждение на высокие колебательные уровни.

Данное сильное колебательное возбуждение приводит к разрушению вторичной и третичной структуры белков и нуклеиновых кислот, то есть к их необратимой денатурации, что, в свою очередь, приводит к гибели бактериальной клетки.

Для оценки уровня колебательного возбуждения для модельной молекулы ДМФА был проведён колебательный ангармонический анализ и получены расчетные гармонические ($v=0 \rightarrow 1$) и ангармонические ($v=1 \rightarrow 2$) частоты, ангармонический сдвиг Δ_A для мод амида I и II (таблица 4).

Таблица 4. Расчетные гармонические ($v=0 \rightarrow 1$) и ангармонические ($v=1 \rightarrow 2$) частоты, ангармонический сдвиг Δ_A в ДМФА в сравнении с эталонными ($0 \rightarrow 1$) значениями.

ДМФА	0→1	1→2	Δ_A	Ссылка
$v_6(A')$; C=O растягивающее колебание	1760,545	1731,619	29	1677 ^a
$v_7(A')$; CN str + CH ₃ симметричное деформационное колебание	1542,569	1501,81	41	1502 ^a

^a [191]

Количественная оценка параметра ангармоничности x проводилась в виде колебательного спектра для обычного ангармонического потенциала Морзе с его энергией диссоциации D_e , равновесным расстоянием r_e , гармонической частотой ω и калибровочным параметром a :

$$U(r) = D_e \left(1 - e^{-a(r-r_e)}\right)^2, \quad (4.3)$$

$$E(v) = \hbar \left\{ \omega \left(v + \frac{1}{2}\right) - \omega x \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 \right\}, \quad (4.4)$$

$$\Delta E(\Delta v = 1) = \hbar \omega (1 - 2x) = \hbar \omega - \Delta_A. \quad (4.5)$$

«Красные» сдвиги полос амидов I и II при высоких интенсивностях свидетельствуют о накачке на высокие колебательные уровни ν и позволяют оценить уровни возбуждения по ангармоническому сдвигу (таблица 4). При пороговой интенсивности в спектре наблюдаются: просветление исходной моды амида I, его «синий» сдвиг $\sim 1800\text{--}1850\text{ см}^{-1}$ и «красный» сдвиг до $\sim 1600\text{ см}^{-1}$, что происходит последовательно в пределах одного импульса: $\nu = 0 \rightarrow 1 \rightarrow$ разрыв водородной связи \rightarrow ангармоническая накачка («красный» сдвиг). При интенсивностях $\approx 19\text{ ГВт/см}^2$ и выше «красный» сдвиг насыщается на частоте $\sim 1600\text{ см}^{-1}$. «Красный» сдвиг может быть квантован в терминах ступенчатого колебательного возбуждения:

$$\nu = 1 + \frac{1850 - \nu(I)}{\Delta}, \quad (4.6)$$

где $\Delta_A = 30\text{ см}^{-1}$ – рассчитанное изменение частоты ангармонического амида I (табл. 4). Максимальное смещение составляет $\approx 1600\text{ см}^{-1}$, что соответствует колебательно-возбужденному уровню $\nu \approx 9$ (рис. 4.7). Для сравнения, для более слабой моды амида II наблюдаемый «красный» спектральный сдвиг равен $\approx 50\text{--}100\text{ см}^{-1}$, что для ангармонического фактора 40 см^{-1} (табл. 4) предполагает возбуждение на 2–3 колебательные уровни.

Таким образом, по мере роста интенсивности наблюдаются просветление основной полосы поглощения амида I, ее «синий» сдвиг в диапазоне интенсивностей $4\text{--}10\text{ ГВт/см}^2$, связанный с разрывом водородных связей, и «красный» сдвиг в диапазоне $10\text{--}50\text{ ГВт/см}^2$, связанный с колебательным ангармонизмом и возбуждением на высокие колебательные уровни, с его насыщением при $I \approx 60\text{ ГВт/см}^2$ (рис. 4.7).

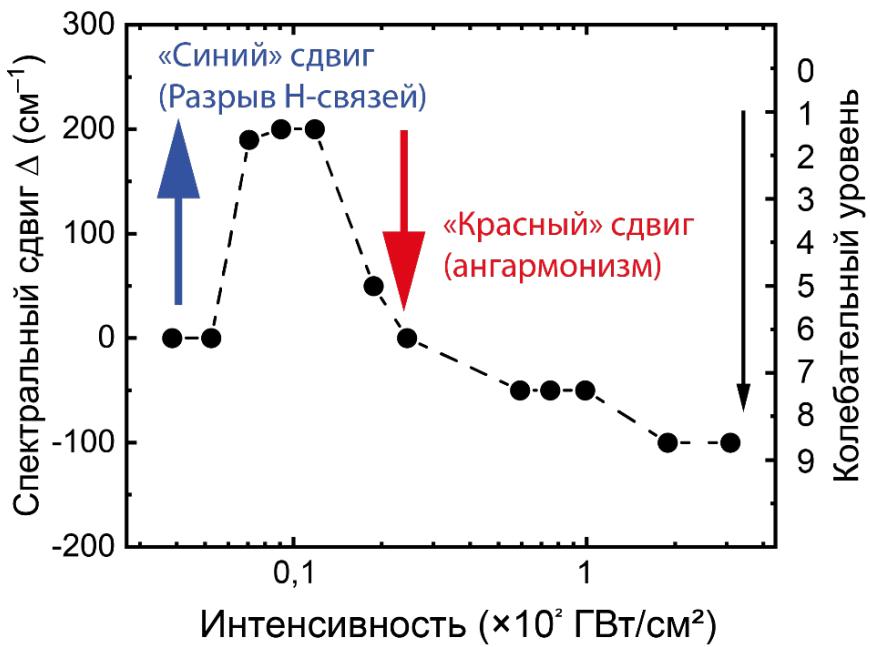


Рис. 4.7 Мгновенные спектральные сдвиги частоты полосы амида I и соответствующие номера колебательных уровней (ν) в зависимости от интенсивности.

Оценка ступенчатого колебательного возбуждения для амида I позволяет оценить эффективную локальную температуру нуклеотидных или аминокислотных фрагментов. Количество атомов в фрагменте приняли равным мельчайшим фрагментам пептида (тимин или цитозиновые основания $C_4N_2H_3$, дезоксирибоза $C_5H_{10}O_4$ и фосфат-ион PO_4^- – $N=33$ атома) или мельчайшим аминокислотным фрагментам (глицин C_2H_3NO – $N=7$ атомов), с учетом теплоемкости на атом $C = 3k_B$:

$$T(I) = 300 + \frac{\langle \nu(I) \rangle \times \hbar \omega}{N \times C} \approx 300 + 800 \times \frac{\langle \nu(I) \rangle}{N} \text{ (К)} \quad (4.7)$$

$$\langle \nu(I) \rangle \approx \sum_{i=1} n_i \nu_i \quad (4.8)$$

$$\langle \nu(I) \rangle \approx 5 \quad (4.9)$$

Таким образом, по представленным оценкам достигается повышение температуры до ~ 400 К для наименьшей аминокислоты и ~ 800 К для наименьшего пептида (рис. 4.8).

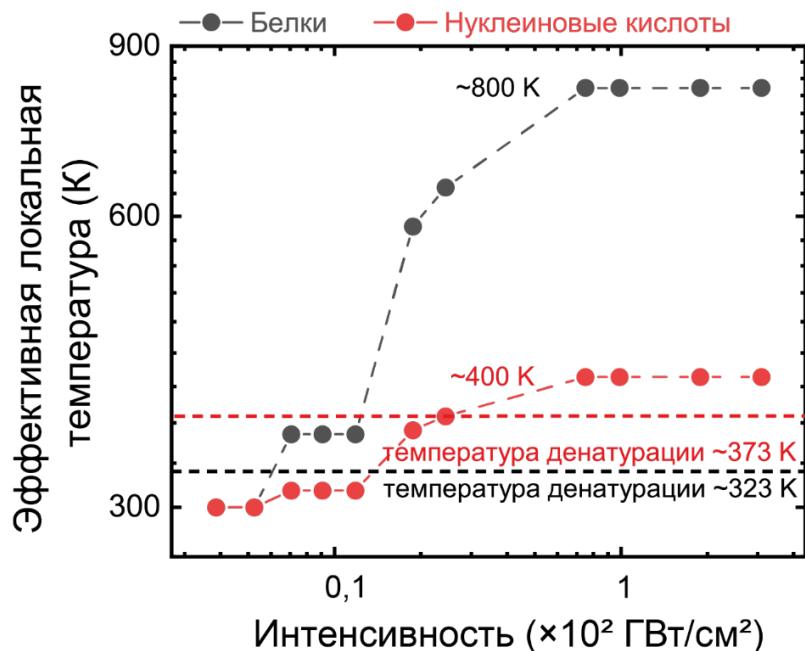


Рис. 4.8. Зависимые от интенсивности локальные температуры для каждого аминокислотного и нуклеотидного фрагмента, рассчитанные с использованием микроскопической модели. Для сравнения приведены типичные температуры денатурации белков и нуклеиновых кислот.

Полученные локальные температуры могут гарантировать необратимую денатурацию данных биомолекул [200].

При резонансном поглощении излучения с длиной волны 3,4 мкм в спектрах изменения относительного пропускания наблюдается просветление основной полосы гармонических С–Н колебаний, при этом отсутствует наведенное поглощение в «синей» и «красной» областях спектра.

В диапазоне 2800–3050 см⁻¹ спектры биологических объектов формируются полосами растяжений С–Н: $\nu_{as}(\text{CH}_3) \sim 2956$ см⁻¹ и $\nu_s(\text{CH}_3) \sim 2870$ см⁻¹, $\nu_{as}(\text{CH}_2) \sim 2920$ –2935 см⁻¹ и $\nu_s(\text{CH}_2) \sim 2850$ –2853 см⁻¹. Проявляется колебание $\nu_{as}(=\text{C}–\text{H})$

~3010 см⁻¹, связанное с олефиновыми группами или ненасыщенными жирными кислотами [192, 201]. Прежде всего эти полосы принадлежат алифатическим фрагментам, и основной вклад вносят длинные ацильные цепи липидов (фосфолипиды, триглицериды), тогда как вклад алифатических боковых цепей белков и углеводов менее значительный.

Колебания С–Н практически не вовлечены в водородные связи, поэтому их полосы остаются сравнительно узкими и слабо зависят от гидратации. Отсутствие наведенного поглощения в «красной» области спектра можно связать с узким диапазоном интенсивностей 181 возбуждающих лазерных импульсов, а также с большим значением параметра ангармонизма, вследствие чего спектральной ширины используемых импульсов недостаточно для эффективного возбуждения переходов на более высокие колебательные уровни.

Заключение по главе 4

В данной главе представлены исследования микроскопического механизма инактивации бактериальных клеток возбуждением фемтосекундных лазерных импульсов среднего ИК-диапазона с центральными длинами волн около 6 мкм и 3,4 мкм с варьируемой пиковой интенсивностью методом динамической спектроскопии пропускания.

При воздействии лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм по мере увеличения интенсивности лазерного излучения для колебаний амидов I и II фиксируется: i) эффект просветления гармонических полос амида I и II; ii) значительного «синего» смещения полосы амида I; iii) «красного» смещения полос амида I и II. Наблюдаемый эффект «синего» смещения связан с разрушением слабых водородных связей, связанных с полосой амид I (C=O), участвующих в стабилизации вторичной и третичной структуры белков и нуклеиновых кислот. Для бактерий смещение наблюдалось уже при однофотонном возбуждении колебаний амида I, энергия которых (около 0,2 эВ) существенно превышает типичные энергии

водородных связей ($<0,1$ эВ). При дальнейшем росте интенсивности лазерного излучения отмечается «красное» смещение полос колебаний амидных групп, обусловленное ангармонизмом возбуждения высоких колебательных уровней. По величине смещения амид I оценивается достижение уровней до примерно $\nu \approx 9$ (при характерном ангармоническом сдвиге порядка ~ 30 см $^{-1}$ на квант по квантово-механическому расчету и итоговом смещении полосы вплоть до ~ 1600 см $^{-1}$). Для амид II величина смещения $50\text{--}100$ см $^{-1}$ согласуется с заселением уровней порядка $\nu \approx 2\text{--}3$ (при ангармоническом сдвиге ~ 40 см $^{-1}$ на квант) за время одного импульса. Накопление энергии в амидных связях после термализации приводит к денатурации вторичной и третичной структуры белков и нуклеиновых кислот бактерий и гибели клетки.

При воздействии лазерными импульсами с длиной волны 3,4 мкм наблюдается просветление основной полосы гармонических С–Н колебаний. «Красное» и «синее» смещения полос колебаний С–Н групп отсутствуют по причине недостаточного возбуждения для перехода на более высокие колебательные уровни и невовлеченности С–Н групп в систему водородных связей, соответственно.

Заключение

В диссертационной работе были получены следующие основные результаты:

1. Путем резонансного воздействия фемтосекундными лазерными импульсами среднего ИК-диапазона с длинами волн 3,4 и 6 мкм, соответствующими поглощению С–Н углеводородного скелета биомолекул и колебаний амидных групп белков/нуклеиновых кислот, на грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные (*P. aeruginosa*) патогенные бактерии впервые достигнута их термическая спектрально-селективная инактивация в ненакопительном режиме. Понижение КОЕ/мл составило 10^5 .

2. Интенсивность порога инактивации грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*P. aeruginosa*) патогенных бактерий значительно ниже для фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны 6 мкм: для бактерии *S. aureus* – 1×10^2 ГВт/см², *P. aeruginosa* – $1,1 \times 10^2$ ГВт/см²), чем для импульсов с длиной волны 3,4 мкм (*S. aureus* – 3×10^2 ГВт/см², *P. aeruginosa* – $3,8 \times 10^2$ ГВт/см²). Данное различие обусловлено более высокими значениями оптической плотности бактерий и сечения поглощения амидными группами белков/нуклеиновых кислот по сравнению с углеводородным скелетом. При воздействии фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны 5,2 мкм (вне полос поглощения бактерий) в сопоставимом диапазоне интенсивностей $(1\text{--}4) \times 10^2$ ГВт/см² инактивация бактерий не достигается.

3. Динамические спектры пропускания фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны 6 мкм в диапазоне интенсивностей $(0,03\text{--}1) \times 10^2$ ГВт/см² по мере роста интенсивности демонстрируют: i) просветление полосы амида I (C=O , ~ 1650 см⁻¹), ii) её сдвиг в высокочастотную область спектра на ~ 200 см⁻¹ (признак разрыва водородных связей) и iii) насыщающийся ангармонический сдвиг в низкочастотную область спектра на 300 см⁻¹. При значениях интенсивности лазерных импульсов близких к пороговому ($1,1 \times 10^2$ ГВт/см²) достигается

ненакопительная термическая инактивация бактерий, сопровождающаяся ростом локальной температуры фрагментов белков до ~ 800 К.

4. Исследование спектральной динамики при пропускании фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны 3,4 мкм в диапазоне интенсивностей $(0,1\text{--}1,1)\times 10^2$ ГВт/см² демонстрирует просветление полос С–Н колебаний.

5. При возбуждении амидных групп белков и/или нуклеиновых кислот фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 6 мкм и частотой следования 10 кГц достигнута ненакопительная термическая инактивация бактерий культуры *P. aeruginosa*, находящихся под полиэтиленовой плёнкой, прозрачной в данном диапазоне.

Благодарности

В заключение выражаю благодарность своему научному руководителю Кудряшову Сергею Ивановичу за поддержку и помощь при обсуждении полученных данных и написании научных статей.

Отдельно выражаю признательность Толордаве Этери Ромеовне за помощь в реализации микробиологической части исследования, а также за конструктивные замечания и профессиональную поддержку.

Также благодарю коллектив лаборатории лазерной нанофизики и биомедицины Центра лазерных и нелинейно-оптических технологий ОКРФ ФИАН за помощь в проведении экспериментов и обсуждении научных результатов, представленных в диссертационной работе.

Публикации автора по теме диссертации

A. Статьи в рецензируемых изданиях:

A.1 Kompanets V. O., Kudryashov S. I., Totordava E. R., **Shelygina S. N.**, Sokolova V. V., Saraeva I. N., Kovalev M. S., Ionin A. A. and Chekalin S. V. Femtosecond Infrared Laser Spectroscopy of Characteristic Molecular Vibrations in Bacteria in the 6- μ m Spectral Range // JETP Letters. – 2021. – Vol. 113. – № 6. – P. 365-369. – DOI: 10.1134/S0021364021060060

A. 2 Kompanets V. O., **Shelygina S. N.**, Tolordava E. R., Kudryashov S. I., Saraeva I. N., Rupasov A. E., Baitsaeva O. I., Khmelnitskii R. A., Ionin A. A., Yushina Y. K., Chekalin S. V. and Kovalev M. S. Spectrally-selective mid-IR laser-induced inactivation of pathogenic bacteria // Biomedical Optics Express. – 2021. – Vol. 12. – № 10. – P. 6317-6325. – DOI: 10.1364/BOE.434969

A. 3 **Shelygina S. N.**, Kompanets V. O., Tolordava E.R., Gonchukov S., Chekalin S. V. and Kudryashov S. I. Ultrafast spectroscopy of CH vibrations in pathogenic bacteria in 3- μ m spectral range // Laser Physics Letters. – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. 015602. – DOI: 10.1088/1612-202X/ac3eea

A. 4 Saraeva I. N., Tolordava E. R., **Shelygina S. N.**, Nastulyavichus A. A., Khmelnitskii R. A., Pokryshkin N., Khmelenin D., Kudryashov S. I., Ionin A. A. and Akhmatkhanov A. FT-IR analysis of *P. aeruginosa* bacteria inactivation by femtosecond IR laser radiation // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5119. – DOI: 10.3390/ijms24065119

A. 5 **Shelygina S. N.**, Saraeva I. N., Tolordava E. R., Nastulyavichus A. A. and Kudryashov S. I. Infrared laser inactivation of pathogenic bacteria through a polyethylene film // Bulletin of the Lebedev Physics Institute. – 2023. – Vol. 50. – № 10. – P. 434-437. – DOI: 10.3103/S1068335623100081

A. 6 Kudryashov S. I., **Shelygina S. N.**, Kompanets V. O., Chekalin S. V., Efremov I. M., Stolyarov A. V. and Tolordava E. R. Microscopic mechanism of protein and nucleic acid denaturation *in P. aeruginosa* bacteria under resonant absorption of femtosecond laser pulses at 6 μm wavelength // JETP Letters. – 2025. – Vol. 122. – № 3. – DOI: 10.31857/S0370274X25080114.

Б. Тезисы докладов в сборниках трудов конференций:

Б. 1 **Shelygina S. N.**, Kompanets V. O., Kudryashov S. I., Tolordava E. R., Yushina Y. K., Ionin A. A. and Chekalin S. V. Laser-based inactivation method of pathogenic microorganisms // Сборник тезисов V Международной конференции по сверхбыстрым оптическим явлениям – UltrafastLight-2021, Москва, 4 – 8 октября 2021 г. – Москва, Россия 2021 г. – С. 255.

Б. 2 **Shelygina S. N.**, Kompanets V. O., Tolordava E. R., Kudryashov S. I., Yushina Y. K. Mid-IR laser inactivation of pathogenic bacteria // Сборник тезисов Международной конференции «Fundamentals of Laser Assisted Micro-and Nanotechnologies» (FLAMN - 22), г. Санкт-Петербург, 27 – 30 июня 2022 г. – Санкт-Петербург, Россия 2022 г. – С. 31.

Б. 3 **Shelygina S. N.**, Kompanets V. O., Frolov M. P., Tolordava E. R., Kudryashov S. I., Yushina Y. K., Ionin A. A. and Chekalin S. V. Inactivation of pathogenic bacteria by mid-IR radiation // Сборник тезисов VI Международной конференции по сверхбыстрым оптическим явлениям – UltrafastLight-2022, Москва, 3 – 7 октября 2022 г. – Москва, Россия 2022 г. – С. 145.

Б. 4 **Shelygina S. N.**, Saraeva I. N., Nastulyavichus A. A., Tolordava E. R., Khmelnitskii R. A. and Kudryashov S. I. FT-IR analysis of pathogenic bacteria inactivation by femtosecond IR laser pulses // Сборник тезисов VII Международной конференции по сверхбыстрым оптическим явлениям – UltrafastLight-2023, Москва, 2 – 4 октября 2023 г. – Москва, Россия 2023 г. – С. 132.

Б. 5 **Shelygina S. N.**, Klimachev Y. M., Tolordava E. R., Kudryashov S. I., Yushina Y. K. Inactivation of pathogenic bacteria by mid-infrared laser pulses // Сборник тезисов 10-й международной конференции по оптике и биофотонике – Saratov Fall Meeting-22, Саратов, 26–30 сентября 2022 г. – Саратов, Россия 2022 г. – С. 11.

Б. 6 **Shelygina S.N.**, Saraeva I.N., Nastulyavichus A.A., Tolordava E. R., Khmelnitskii R.A., Kudryashov S. I. FT-IR analysis of pathogen inactivation by middle IR femtosecond laser pulses // Сборник тезисов 11-й международной конференции по оптике и биофотонике – Saratov Fall Meeting-23, Саратов, 25–29 сентября 2023 г. – Саратов, Россия 2022 г. – С. 15.

Б. 7 **Shelygina S. N.**, Kompanets V. O., Tolordava E. R. and Kudryashov S. I. Mechanisms of spectral-selective bacterial inactivation using the mid-IR femtosecond laser pulses // Сборник тезисов IX Международной конференции по сверхбыстрым оптическим явлениям – UltrafastLight-2025, Москва, 29 сентября – 02 октября 2025 г. – Москва, Россия 2025 г. – С. 151.

С. Патент на изобретение

С. 1 **Шелыгина С.Н.**, Толордава Э.Р., Данилов П.А., Настулявичус А.А., Сараева И.Н., Гончуков С.А., Римская Е.Н., Кузьмин Е.В., Заярный Д.А., Кудряшов С.И., «Способ инактивации патогенных бактерий (варианты)», RU 2802188C1 заявка № 2022131823 от 06.12.2022.

Список сокращений

АФК	Активные формы кислорода
УФ-А, -Б, -С	Ультрафиолетовое излучение типа А, Б, С
КОЕ	Колониеобразующая единица
ИК	Инфракрасный
СЭМ	Сканирующий электронный микроскоп
ПЭМ	Просвечивающий электронный микроскоп
УКИ	Ультракороткие импульсы
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ФДИ	Фотодинамическая инактивация
ФДТ	Фотодинамическая терапия
ИИВИ	Импульсное излучение высокой интенсивности
СВЧ	Сверхвысокие частоты
ВЧ	Высокие частоты
ЛИ	Лазерные импульсы
ЭДРС	Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
ЛСЭ	Лазер на свободных электронах
ДМФА	N,N-диметилформамид
ОПГ	Оптический параметрический генератор

ГРЧ Генератор разностной частоты

ПЭ Полиэтилен

Список литературы

1. Muteeb G. et al. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16, № 11. – P. 1615.
2. Murray C. J. L. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *The Lancet*. — 2022. — Vol. 399, № 10325. — P. 629-655. — DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
3. Demirci A., Feng H., Krishnamurthy K. (ed.). *Food safety engineering*. – Springer International Publishing, 2020. ISBN 978-3-03-042659-0, 978-3-03-042660-6
4. Hironobu I., Tetsuya O. The mechanisms of UV mutagenesis // *Journal of Radiation Research*. – 2011. – Vol. 52, № 2. – P. 115-125.
5. Yadav G. et al. Infrared heating and its application in food processing // *The Pharma Innovation Journal*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 142-151.
6. Qu W. et al. Research on tomato peeling using flame-catalytic infrared radiation // *Lwt*. – 2022. – Vol. 163. – P. 113542.
7. Krishnamurthy K. et al. Infrared heating in food processing: an overview // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. – 2008. – Vol. 7, №. 1. – P. 2-13.
8. Sandu C. Infrared radiative drying in food engineering: a process analysis // *Biotechnology progress*. – 1986. – Vol. 2, №. 3. – P. 109-119.
9. Oduola A. A. et al. Impacts of broadband and selected infrared wavelength treatments on inactivation of microbes on rough rice // *Journal of Food Safety*. – 2020. – Vol. 40, №. 2. – P. e12764.
10. Jun S., Irudayaraj J. Selective Far Infrared Heating System—Spectral Manipulation. II // *Drying Technology*. – 2003. – Vol. 21, № 1. – P. 69–82. DOI: 10.1081/DRT-120017284.
11. Dumitras D. C., Dutu D. C. A., Matei C. E. CO₂ laser ablation of biological tissue. In ROMOPTO'97: Fifth Conference on Optics (Vol. 3405, pp. 654-664). SPIE

12. Serebryakov V. S. et al. Mid-IR laser for high-precision surgery // Journal of Optical Technology. – 2015. – Vol. 82, № 12. – P. 781-788.
13. Guo J., Chen P., Xiang M., et al. In vivo keratotomy by mid-infrared femtosecond laser resonant with amide vibrational mode // Communications Medicine. – 2025. – Vol. 5, № 1. – P. 207. DOI: 10.1038/s43856-025-00928-1
14. Tian K., Xiang M., Wen X., Guo J., He L., Yu P., et al. Tissue Ablation with Multi-Millimeter Depth and Cellular-Scale Collateral Damage by a Femtosecond Mid-Infrared Laser Tuned to the Amide-I Vibration // Laser & Photonics Reviews. – 2024. – Vol. 18, № 2. – P. 2300421. DOI: 10.1002/lpor.202300421
15. Vogel A., Venugopalan V. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues // Chemical Reviews. – 2003. – Vol. 103, № 2. – P. 577–644. DOI: 10.1021/cr010379n.
16. Fernández L. Effective Methods for Disinfection and Sterilization // Antibiotic Drug Resistance. – 2019. – P. 567–587. DOI: 10.1002/9781119282549.ch22
17. Akhila P. P., Sunoj K. V., Aaliya B. et al. Application of electromagnetic radiations for decontamination of fungi and mycotoxins in food products: a comprehensive review // Trends in Food Science & Technology. – 2021. – Vol. 114. – P. 399–409. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.06.013
18. Codex General Standard for Irradiated Foods: Codex Stan 106-1983, Rev.1-2003. Rome: FAO/WHO, Codex Alimentarius Commission, 2003. 7 p.
19. Munir, M. T., Federighi, M. Control of Foodborne Biological Hazards by Ionizing Radiations // Foods. – 2020. – Vol. 9, № 7. – Article 878. DOI: 10.3390/foods9070878
20. Mukherjee R. N. Radiation: A Means of Sterilization // IAEA Bulletin. – 1975. – Vol. 17, № 6. – P. 28–37.
21. Adrovic F., Simmons A. Future trends for the sterilisation of biomaterials and medical devices // Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices / eds. F. Adrovic, A. Simmons. Cambridge: Woodhead Publishin. – 2012. – P. 310–320.

22. Guo Y., Zhao L., Ma Q., Ji C. Novel strategies for degradation of aflatoxins in food and feed: a review // Food Research International. – 2021. – Vol. 140. – Article 109878. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109878
23. Araújo E. S., Khoury H. J., Silveira S. V. Effects of γ -irradiation on some properties of Durolon polycarbonate // Radiation Physics and Chemistry. – 1998. – Vol. 53, № 1. – P. 79–84. DOI: 10.1016/S0969-806X(97)00300-9
24. Mukherjee R. N. Radiation: A Means of Sterilization // IAEA Bulletin. – 1975. – Vol. 17, № 6. – P. 28–37.
25. Harrell C. R., Djonov V., Fellabaum C., Volarevic V. Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin // International Journal of Medical Sciences. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 274–279. DOI: 10.7150/ijms.22644
26. Yang K., Li K., Pan L., Luo X., Xing J., Wang J., Wang L., Wang R., Zhai Y., Chen Z. Effect of Ozone and Electron Beam Irradiation on Degradation of Zearalenone and Ochratoxin A // Toxins. – 2020. – Vol. 12, № 2, – Article 138. DOI: 10.3390/toxins12020138
27. Lung H.-M., Cheng Y.-C., Huang H.-W., Yang B. B. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation // Trends in Food Science & Technology. – 2015. – Vol. 44, № 1. – P. 66-78. – DOI: 10.1016/j.tifs.2015.03.005
28. Mehta K. Trends in radiation sterilization of health care products. – Vienna: International Atomic Energy Agency. 2008. – 260 p. – Available from: <http://www.iaea.org/books> (accessed 29.09.2025)
29. Ricciardi E. F., Lacivita V., Conte A., Chiaravalle E., Zambrini A. V., Del Nobile M. A. X-ray irradiation as a valid technique to prolong food shelf life: the case of ricotta cheese // International Dairy Journal. — 2019. — Vol. 99. — Article 104547. — DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104547
30. Singh R., Singh D., Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: a review // World Journal of Radiology. — 2016. — Vol. 8, № 4. — P. 355–369. — DOI: 10.4329/wjr.v8.i4.355

31. Rahman N., Khan R., Badshah S. Effect of X-rays and gamma radiations on the bone mechanical properties: literature review // Cell and Tissue Banking. — 2018. — Vol. 19, № 4. — P. 457–472. — DOI: 10.1007/s10561-018-9736-8
32. McEvoy B., Maksimović A., Howell D., Reppert P., Ryan D., Rowan N., Michel H. Studies on the comparative effectiveness of X-rays, gamma rays and electron beams to inactivate microorganisms at different dose rates in industrial sterilization of medical devices // Radiation Physics and Chemistry. — 2023. — Vol. 208. — Article 110915. — DOI: 10.1016/j.radphyschem.2023.110915
33. Alternative Food Processing Technologies // Food Processing: Principles and Applications. — 2-е изд. / eds. P. Fellows. — Hoboken: John Wiley & Sons, 2014. — Chapter 7. — DOI: 10.1002/9781118846315.ch7
34. Cutler T. D., Zimmerman J. J. Ultraviolet irradiation and the mechanisms underlying its inactivation of infectious agents // Animal Health Research Reviews. — 2011. — Vol. 12, № 1. — P. 15–23. — DOI: 10.1017/S1466252311000016.
35. Gates F. L. A study of the bactericidal action of ultraviolet light. I and II // Journal of General Physiology. — 1929. — Vol. 13. — P. 231–248; 249–260.
36. Linden K. G., Shin G.-A., Faubert G., Cairns W., Sobsey M. D. UV disinfection of Giardia lamblia cysts in water // Water Research. — 2005. — Vol. 39, № 18. — P. 4658–4663. — DOI: 10.1016/j.watres.2005.10.030.
37. Falguera V., Pagán J., Garza S., Garvín A., Ibarz A. Ultraviolet processing of liquid food: A review. Part 2: Effects on microorganisms and on food components and properties // Food Research International. — 2011. — Vol. 44, № 6. — P. 1580–1588. — DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.025
38. Koutchma T. N. Ultraviolet light in food technology: Principles and applications. — Boca Raton: CRC Press, 2019. — 381 p.
39. Sinha R. P., Häder D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2002. — Vol. 1. — №. 4. — P. 225-236.
40. Narita K., Asano K., Naito K., Ohashi H., Sasaki M., Morimoto Y., Igarashi T., Nakane A. 222-nm UVC inactivates a wide spectrum of microbial pathogens // Journal

of Hospital Infection. — 2020. — Vol. 105 (Suppl. 1). — P. 459–467. — DOI: 10.1016/j.jhin.2020.03.030

41. Chan H. L. et al. Proteomic analysis of UVC irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis //FEBS letters. — 2006. — Vol. 580. — №. 13. — P. 3229-3236.
42. Pousty D. et al. Wavelength-dependent time–dose reciprocity and stress mechanism for UV-LED disinfection of *Escherichia coli* // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2021. — Vol. 217. — P. 112129.
43. Kawanishi S., Hiraku Y., Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging // Mutation Research – Reviews in Mutation Research. — 2001. — Vol. 488, № 1. — P. 65–76. — DOI: 10.1016/S1383-5742(00)00059-4
44. Sinha R. P., Häder D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2002. — Vol. 1, № 4. — P. 225–236. — DOI: 10.1039/B201230H
45. Kowalski W. Ultraviolet germicidal irradiation handbook: UVGI for air and surface disinfection. — New York: Springer Science & Business Media, 2010. — 501 p.
46. Naito K., Sawadaishi K., Kawasaki M. Photobiochemical mechanisms of biomolecules relevant to germicidal ultraviolet irradiation at 222 and 254 nm // Scientific Reports. — 2022. — Vol. 12. — Article 18217. — DOI: 10.1038/s41598-022-22969-5
47. Hoerter J. D., Arnold A. A., Kuczynska D. A. et al. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli* // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2005. — Vol. 81, № 3. — P. 171–180. — DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2005.07.005
48. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation // Photochemistry & Photobiology. — 2015. — Vol. 91, № 1. — P. 140-155. — DOI: 10.1111/php.12368

49. Martín-Sómer M., Pablos C., Adán C., van Grieken R., Marugán J. A review on LED technology in water photodisinfection // *Science of The Total Environment*. — 2023. — Vol. 885. — Art. 163963. — DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163963
50. Zhang W., Zhao W., Sun Y., Sun Y., Wang B., Liu M., Qiu Z., Wang Y., Sun Z., Hu P. Effects of multi-wavelength ultraviolet radiation on the inactivation and reactivation of *Escherichia coli* in recirculating water system // *Aquaculture Reports*. — 2025. — Vol. 41. — Article 102688. — DOI: 10.1016/j.aqrep.2025.102688
51. Wang C., Lu S., Zhang Z. Inactivation of airborne bacteria using different UV sources: performance modeling, energy utilization, and endotoxin degradation // *Science of the Total Environment*. — 2019. — Vol. 655. — P. 787–795. — DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.266
52. Bintsis T., Litopoulou-Tzanetaki E., Robinson R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry — a critical review // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. — 2000. — Vol. 80, № 6. — P. 637–645. — DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1
53. Gallagher R. P., Lee T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review // *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. — 2006. — Vol. 92, № 1. — P. 119–131. — DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.011
54. Dai T., Gupta A., Huang Y.-Y., Sherwood M. E., Murray C. K., Vrahas M. S., Kielian T., Hamblin M. R. Blue light eliminates community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected mouse skin abrasions // *Photomedicine and Laser Surgery*. — 2013. — Vol. 31, № 11. — P. 531–538. — DOI: 10.1089/pho.2012.3365
55. Hyun J.-E., Lee S. Blue light-emitting diodes as eco-friendly non-thermal technology in food preservation // *Trends in Food Science & Technology*. — 2020. — Vol. 105. — P. 284–295. — DOI: 10.1016/j.tifs.2020.09.008
56. Maclean M., MacGregor S. J., Anderson J. G., Woolsey G. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting

diode array // Applied and Environmental Microbiology. — 2009. — Vol. 75, № 7. — P. 1932–1937. — DOI: 10.1128/AEM.01892-08

57. MacLean M., Murdoch L. E., MacGregor S. J., Anderson J. G. Sporicidal effects of high-intensity 405 nm visible light on endospore-forming bacteria // Photochemistry & Photobiology. — 2013. — Vol. 89, № 1. — P. 120–126. — DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01202.x

58. Dragoni L. et al. Viricide activity of antimicrobial blue light (405 nm) against SARS-CoV-2 and influenza virus // European Journal of Public Health. — 2023. — Vol. 33, Suppl. 2. — DOI: 10.1093/eurpub/ckad160.1044

59. Kim B. F., Bohandy J. Spectroscopy of porphyrins // Johns Hopkins APL Technical Digest. — 1981. — Vol. 2, No. 3. — P. 153-163

60. Maclean M. et al. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array // Applied and environmental microbiology. — 2009. — T. 75. — №. 7. — C. 1932-1937.

61. Chen H., Cheng Y., Moraru C. I. Blue 405 nm LED light effectively inactivates bacterial pathogens on substrates and packaging materials used in food processing // Scientific Reports. — 2023. — Vol. 13, Article 15472. — DOI: 10.1038/s41598-023-42347-5

62. Tsutsumi-Arai C., Arai Y., Terada-Ito C. et al. Microbicidal effect of 405-nm blue LED light on *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* dual-species biofilms on denture base resin // Lasers in Medical Science. — 2022. — Vol. 37, № 2. — P. 857–866. — DOI: 10.1007/s10103-021-03323-z

63. Wu S., Subharat P., Brightwell G. A New Insight into the Bactericidal Mechanism of 405 nm Blue Light-Emitting-Diode against Dairy Sourced *Cronobacter sakazakii* // Foods. — 2021. — Vol. 10, № 9, Article 1996. — DOI: 10.3390/foods10091996

64. Dai T., Huang Y. Y., Hamblin M. R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art //Photodiagnosis and photodynamic therapy. — 2009. — Vol. 6. — №. 3-4. — P. 170-188.

65. Svenskaya, Y., Parakhonskiy, B., Haase, A., Atkin, V., Lukyanets, E., Gorin, D., Antolini, R. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer // *Biophysical Chemistry*. – 2013. – Vol. 182. – P. 11–15. DOI: 10.1016/j.bpc.2013.07.006
66. Cieplik F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 405.
67. Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes // *Current Opinion in Microbiology*. — 2016. — Vol. 33. — P. 67–73. — DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008
68. Тучина Е. С., Корченова М. В., Закоян А. А., Тучин В. В. Влияние штаммовых различий на устойчивость *Staphylococcus aureus* к фотодинамическому воздействию с использованием мезо-замещённых катионных порфиринов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, № 3. С. 216–227. DOI: 10.18500/1817-3020-2024-24-3-216-227
69. Sergeev I. S., Maksimova E. A., Moiseeva E. O., Griaznova O. Yu., Perkov S. A., Demina P. A., Zaytsev V. D., Koksharov Yu. A., Rider M. A., Zavidovskiy I. A., Rudakovskaya P. G., Romanov R. I., Khlebtsov B. N., Orlova A. O., Deyev S. M., Gorin D. A. Photoinduced toxicity caused by gold nanozymes and photodynamic dye encapsulated in submicron polymer shell // *Particle & Particle Systems Characterization*. – 2024. – Vol. 41. – No. 5. – P. 2300149. DOI: 10.1002/ppsc.202300149
70. Godage, O. S.; Bucharskaya, A. B.; Navolokin, N. A.; Maslyakova, G. N.; German, S. V.; Gorin, D. A. The Magnetite Nanoparticles in Theranostic Applications // *Journal of Nanomedicine Research*. – 2017. – Vol. 5. – No 3. – P. 00119. DOI: 10.15406/jnmr.2017.05.00119
71. Tuchina E. S., Tuchin V. V. Photothermal Effect of Infrared (808 nm) Laser Radiation and Gold Nanoparticles in Different Modifications on *S. aureus* // *Optics and Spectroscopy*. – 2020. – Vol. 128. – № 6. – P. 843–848. DOI: 10.1134/S0030400X20060223

72. Ghate V. S., Zhou W., Yuk H.-G. Perspectives and Trends in the Application of Photodynamic Inactivation for Microbiological Food Safety // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. — 2019. — Vol. 18, № 2. — P. 402–424. — DOI: 10.1111/1541-4337.12418
73. Sharma S. K., Dai T., Kharkwal G. B., Huang Y.-Y., Huang L., de Arce V. J. B., Tegos G. P., Hamblin M. R. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models // Current Pharmaceutical Design. — 2011. — Vol. 17, № 13. — P. 1303–1319. — DOI: 10.2174/138161211795703735
74. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2015. — Vol. 14. — P. 1518–1526. — DOI: 10.1039/C5PP00037H
75. Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., Arbia D., Fantetti L., Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2010. — Vol. 54, № 2. — P. 637–642. — DOI: 10.1128/AAC.00603-09
76. de Melo W. C. M. A., Avci P., de Oliveira M. N., Gupta A., Vecchio D., Sadasivam M., Chandran R., Huang Y.-Y., Yin R., Perussi L. R., Tegos G. P., Perussi J. R., Dai T., Hamblin M. R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection // Expert Review of Anti-Infective Therapy. — 2013. — Vol. 11, № 7. — P. 669–693. — DOI: 10.1586/14787210.2013.81186
77. Vohra F., Al-Rifaify M. Q., Lillywhite G., Abu Hassan M. I., Javed F. Efficacy of mechanical debridement with adjunct antimicrobial photodynamic therapy for the management of peri-implant diseases: a systematic review // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2014. — Vol. 13. — P. 1160–1168. — DOI: 10.1039/C4PP00083H
78. Ferreyra D. D., Reynoso E., Cordero P., Spesia M. B., Alvarez M. G., Milanesio M. E., Durantini E. N. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial

photosensitizers // Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology. — 2016. — Vol. 158. — P. 243-251. — DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.021

79. Gad F., Zahra T., Francis K. P., Hasan T., Hamblin M. R. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2004. — Vol. 3. — P. 451–458. — DOI: 10.1039/B311901G

80. Elm nasser N. et al. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review // Canadian journal of microbiology. — 2007. — Vol 53. — №. 7. — P. 813-821.

81. John D., Ramaswamy H. Pulsed light technology to enhance food safety and quality: a mini-review // Current Opinion in Food Science. — 2018. — Vol. 23. — P. 70-79. — DOI: 10.1016/j.cofs.2018.06.004

82. Mandal R. et al. Applications of pulsed light decontamination technology in food processing: An overview // Applied Sciences. — 2020. — Vol. 10. — №. 10. — P. 3606.

83. Anderson J. G. et al. Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light // IEEE Transactions on Plasma Science. — 2000. — Vol. 28. — №. 1. — P. 83-88.

84. Rowan N. J. et al. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms // Applied and environmental microbiology. — 1999. — Vol. 65. — №. 3. — P. 1312-1315.

85. Takeshita K. et al. Sterilization effect of pulsed light on various microorganisms // Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, Japan (Japan). — 2002. — Vol. 30. — №. 5.

86. Paskeviciute E., Buchovec I., Luksiene Z. High-power pulsed light for decontamination of chicken from food pathogens: A study on antimicrobial efficiency and organoleptic properties // Journal of Food Safety. — 2011. — Vol. 31. — №. 1. — P. 61-68.

87. McDonald K. F. et al. A comparison of pulsed and continuous ultraviolet light sources for the decontamination of surfaces // IEEE Transactions on Plasma Science. — 2000. — Vol. 28. — №. 5. — P. 1581-1587.

88. Ozer N. P., Demirci A. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment // International journal of food science & technology. – 2006. – Vol. 41. – №. 4. – P. 354-360.
89. Fine F., Gervais P. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders //Journal of food protection. – 2004. – Vol. 67. – №. 4. – P. 787-792.
90. Palgan I. et al. Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk //Food microbiology. – 2011. – Vol. 28. – №. 1. – P. 14-20.
91. Hwang H. J., Cheigh C. I., Chung M. S. Relationship between optical properties of beverages and microbial inactivation by intense pulsed light //Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2015. – Vol. 31. – P. 91-96.
92. Takeshita K. et al. Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation //International journal of food microbiology. – 2003. – Vol. 85. – №. 1-2. – P. 151-158.
93. Fine F., Gervais P. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders //Journal of food protection. – 2004. – Vol. 67. – №. 4. – P. 787-792.
94. Gomez-Lopez V. M. et al. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life // International Journal of Food Microbiology. – 2005. – Vol. 103. – №. 1. – P. 79-89.
95. Hwang H. J. et al. Effect of environmental water activity on microbial inactivation by intense pulsed light (IPL) // Food Science and Biotechnology. – 2024. – Vol. 33. – №. 2. – P. 485-490.
96. Niveditha A. et al. Application of cold plasma and ozone technology for decontamination of *Escherichia coli* in foods-a review // Food Control. – 2021. – Vol. 130. – P. 108338.
97. Konchekov, E. M.; Gusein-zade, N.; Burmistrov, D. E.; Kolik, L. V.; Dorokhov, A. S.; Izmailov, A. Yu.; Shokri, B.; Gudkov, S. V. Advancements in Plasma

Agriculture: A Review of Recent Studies. — International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 20, p. 15093. — DOI: 10.3390/ijms242015093.

98. Farber R. et al. Biofilm grown on wood waste pretreated with cold low-pressure nitrogen plasma: Utilization for toluene remediation //International Biodeterioration & Biodegradation. — 2019. — Vol. 139. — P. 62-69.

99. Konchekov E.M., Gudkova V.V., Burmistrov D.E., Konkova A.S., Zimina M.A., Khatueva M.D., Polyakova V.A., Stepanenko A.A., Pavlik T.I., Borzosekov V.D., Malakhov D.V., Kolik L.V., Gusein-zade N., Gudkov S.V. Bacterial Decontamination of Water-Containing Objects Using Piezoelectric Direct Discharge Plasma and Plasma Jet // Biomolecules. — 2024. — Vol. 14, No. 2. — Article 181. — DOI: 10.3390/biom14020181.

100. Vatansever F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond // FEMS microbiology reviews. — 2013. — Vol. 37. — №. 6. — P. 955-989.

101. Nwabor O.F., Onyeaka H., Miri T. et al. A Cold Plasma Technology for Ensuring the Microbiological Safety and Quality of Foods // Food Eng. Rev. 2022. — Vol. 14, № 4. — P. 535–554. DOI: 10.1007/s12393-022-09316-0.

102. Moisan M. et al. Plasma sterilization. Methods and mechanisms //Pure and applied chemistry. — 2002. — Vol. 74. — №. 3. — P. 349-358

103. Sureshkumar A. et al. Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma //International journal of pharmaceutics. — 2010. — Vol. 396. — №. 1-2. — P. 17-22.

104. Machala Z., Chládeková L., Pelach M. Plasma agents in bio-decontamination by dc discharges in atmospheric air //Journal of Physics D: Applied Physics. — 2010. — Vol. 43. — №. 22. — P. 222001.

105. Misra N. N., Tiwari B. K., Raghavarao K. S. M. S., Cullen P. J. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens // Food Engineering Reviews. — 2011. — Vol. 3, № 3-4. — P. 159–170. — DOI: 10.1007/s12393-011-9041-9

106. Critzer F. J., Kelly-Wintenberg K., South S. L., Golden D. A. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces // *Journal of Food Protection*. — 2007. — Vol. 70, № 10. — P. 2290–2296. — DOI: 10.4315/0362-028X-70.10.2290
107. Abea A., Gou P., Guàrdia M. D., Picouet P., Kravets M., Bañón S., Muñoz I. Dielectric Heating: A Review of Liquid Foods Processing Applications // *Food Reviews International*. — 2023. — Vol. 39, № 8. — P. 5684–5702. — DOI: 10.1080/87559129.2022.2092746
108. Tang J., Chan T. C., Wang Y. Radio-frequency heating in food processing // *Novel Food Processing Technologies* / eds. G. V. Barbosa-Canovas et al. — Boca Raton: CRC Press, 2004. — Chapter 24. — DOI: 10.1201/9780203997277.ch24
109. Menéndez J. A., Arenillas A., Fidalgo B., Fernández Y., Zubizarreta L., Calvo E. G., Bermúdez J. M. Microwave heating processes involving carbon materials // *Fuel Processing Technology*. — 2010. — Vol. 91, № 1. — P. 1–8. — DOI: 10.1016/j.fuproc.2009.08.021
110. Simo K. A., Tsirline V. B., Sindram D., McMillan M. T., Thompson K. J., Swan R. Z., McKillop I. H., Martinie J. B., Iannitti D. A. Microwave ablation using 915-MHz and 2.45-GHz systems: what are the differences? // *HPB (Oxford)*. — 2013. — Vol. 15, № 12. — P. 991–996. — DOI: 10.1111/hpb.12081
111. Orsat V. Radio-Frequency Processing // *Emerging Technologies for Food Processing* / ed. Sun D. W. — 2-е изд. — Oxford: Academic Press, 2014. — Ch. 21, c. 385–398. — DOI: 10.1016/B978-0-12-411479-1.00021-8
112. Wu Y., Yao M. Inactivation of bacteria and fungus aerosols using microwave irradiation // *Journal of Aerosol Science*. — 2010. — Vol. 41, № 7. — P. 682–693. — DOI: 10.1016/j.jaerosci.2010.04.004
113. Brace C. L. Radiofrequency and microwave ablation of the liver, lung, kidney, and bone: What are the differences? // *Current Problems in Diagnostic Radiology*. — 2009. — Vol. 38, № 3. — P. 135–143.

114. Culkin K. A., Fung D. Y. C. Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups // Journal of Milk and Food Technology. — 1975. — Vol. 38, № 1. — DOI: 10.4315/0022-2747-38.1.8
115. Deshmukh P. S., Megha K., Banerjee B. D., Ahmed R. S., Chandna S., Abegaonkar M. P., Tripathi A. K. Detection of Low-Level Microwave Radiation Induced Deoxyribonucleic Acid Damage Vis-à-vis Genotoxicity in Brain of Fischer Rats // Toxicology International. — 2013. — Vol. 20, № 1. — P. 19-24. — DOI: 10.4103/0971-6580.111549
116. Orsat V. Radio-Frequency Processing // Emerging Technologies for Food Processing / ed. D. W. Sun. — 2nd ed. — Oxford: Academic Press, 2014. — Ch. 21. — DOI: 10.1016/B978-0-12-411479-1.00021-8
117. Gadonna-Widehem P., Laguerre J.-C. Global Food Security and Wellness // In: Global Food Security and Wellness. New York: Springer, 2017.
118. Guzik P., Kulawik P., Zajac M., Migdał W. Microwave applications in the food industry: an overview of recent developments // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2022. — Vol. 62, № 29. — P. 7989–8008. — DOI: 10.1080/10408398.2021.1922871
119. Simo K. A., Tsirline V. B., Sindram D., McMillan M. T., Thompson K. J., Swan R. Z., McKillop I. H., Martinie J. B., Iannitti D. A. Microwave ablation using 915-MHz and 2.45-GHz systems: what are the differences? // HPB (Oxford). — 2013. — Vol. 15, № 12. — P. 991–996. — DOI: 10.1111/hpb.12081
120. Sobral M. M. C., Cunha S. C., Faria M. A., Martins Z. E., Ferreira I. M. P. L. V. Influence of oven and microwave cooking with the addition of herbs on the exposure to multi-mycotoxins from chicken breast muscle // Food Chemistry. — 2019. — Vol. 276. — P. 274–284. — DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.021
121. Peng J., Tang J., Luan D., Liu F., Tang Z. Microwave pasteurization of pre-packaged carrots // Journal of Food Engineering. — 2017. — Vol. 202. — P. 56–64. — DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.01.003

122. Marszałek K., Kowalska A., Kawa-Rygielska J., Lenart A. A comparative study of the quality of strawberry purée preserved by continuous microwave heating and conventional thermal pasteurization during long-term cold storage // Journal of the Science of Food and Agriculture. — 2016. — DOI: 10.1007/s11947-016-1698-x
123. Doymaz I., Kipcak A. S., Piskin S. Microwave drying of green bean slices: drying kinetics and physical quality // Czech Journal of Food Sciences. — 2015. — Vol. 33, № 4. — P. 367–376. — DOI: 10.17221/566/2014-CJFS
124. Krishnamurthy K., Demirci A., Irudayaraj J. Efficacy of infrared heat treatment for inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk // Journal of Food Process Engineering. — 2007. — Vol. 31, № 6. — P. 798–816. — DOI: 10.1111/j.1745-4530.2007.00191.x
125. Lian F. et al. Improving modification of structures and functionalities of food macromolecules by novel thermal technologies // Trends in Food Science & Technology. — 2022. — Vol. 129. — P. 327-338.
126. Endo M., Walter R. F. (ed.). Gas lasers. — CRC Press, 2018.
127. Das I. Infrared in Food Preservation and Processing // Conventional and Advanced Food Processing Technologies / ed. D. W. Sun. — Wiley, 2014. — Ch. 19. — DOI: 10.1002/9781118406281.ch19
128. Bingol G. et al. Infrared pasteurization of raw almonds // Journal of Food Engineering. — 2011. — Vol. 104. — №. 3. — P. 387-393.
129. Vatansever F., Hamblin M. R. Far-infrared radiation (FIR): its biological effects and medical applications // Photonics & Lasers in Medicine. — 2012. — Vol. 1, № 4. — P. 255–266. — DOI: 10.1515/plm-2012-0034
130. Aboud S.A., Altemimi A.B., Al-Hilphy A.R.S., et al. A Comprehensive Review on Infrared Heating Applications in Food Processing // Molecules. 2019. Vol. 24, № 22. P. 4125. DOI: 10.3390/molecules24224125.
131. Sawai J., Igarashi H., Hashimoto A., Kokugan T., Shimizu M. Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method //

Journal of Chemical Engineering of Japan. — 1995. — Vol. 28, № 3. — P. 288–293. — DOI: 10.1252/jcej.28.288

132. Jin M., Tong Q. Rhabdomyolysis secondary to COVID-19 infection and its management // Health. — 2020. — Vol. 12, № 8. — P. 1003–1009. — DOI: 10.4236/health.2020.128074.

133. Chavan P., Yadav R., Sharma P., Jaiswal A. K. Laser light as an emerging method for sustainable food processing, packaging, and testing // Foods. — 2023. — Vol. 12, № 16. — Article 2983. — DOI: 10.3390/foods12162983

134. Cai L. et al. Effects of ultrasonics combined with far infrared or microwave thawing on protein denaturation and moisture migration of *Sciaenops ocellatus* (red drum) // Ultrasonics Sonochemistry. — 2019. — Vol. 55. — P. 96-104.

135. Liu Y. et al. MD simulation to comprehend polygalacturonase inactivation mechanism during thermal and non-thermal effects of infrared processing // Food Chemistry. — 2024. — Vol. 441. — P. 138298.

136. Elliott W. H., Elliott D. C., Jefferson J. R. Biochemistry and molecular biology. — Oxford: Oxford University Press, 1997. — Vol. 2001. — P. 586.

137. Krishnamurthy K. et al. Infrared heating in food processing: an overview // Comprehensive reviews in food science and food safety. — 2008. — Vol. 7. — №. 1. — P. 2-13.

138. Mujumdar A. S. (ed.) Handbook of Industrial Drying. — 3-е изд. — Boca Raton: CRC Press, 2006. — 1312 p. — DOI: 10.1201/9781420017618

139. Sandu C. Infrared radiative drying in food engineering: a process analysis // Biotechnology progress. — 1986. — Vol. 2. — №. 3. — P. 109-119.

140. Coskun E. et al. Effect of far infrared heating process on surface decontamination and quality attributes of whole yellow and white onions // Food Control. — 2021. — Vol. 130. — P. 108376.

141. Hashimoto A. et al. Penetration of infrared radiation energy into sweet potato // Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. — 1990. — Vol. 37. — №. 11. — P. 887-893.

142. Liu C. M., Sakai N., Hanzawa T. Three-dimensional analysis of heat transfer during food thawing by far-infrared radiation // Food Science and Technology Research. – 1999. – Vol. 5. – №. 3. – P. 294-299.
143. Sawai J. et al. Pasteurization of bacterial spores in liquid medium by far-infrared irradiation // Journal of chemical engineering of Japan. – 1997. – Vol. 30. – №. 1. – P. 170-172.
144. Hamanaka D. et al. Effect of the wavelength of infrared heaters on the inactivation of bacterial spores at various water activities // International journal of food microbiology. – 2006. – Vol. 108. – №. 2. – P. 281-285.
145. Rosenthal I (1992), Electromagnetic radiations in food science, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
146. Huang L., Sites J. Elimination of *Listeria monocytogenes* on hotdogs by infrared surface treatment // Journal of food science. – 2008. – Vol. 73. – №. 1. – P. M27-M31.
147. Yang J., Bingol G., Pan Z., Brandl M. T., McHugh T. H., Wang H. Infrared heating for dry-roasting and pasteurization of almonds // Journal of Food Engineering. — 2010. — Vol. 101, № 3. — P. 273–280.
148. Sawai J. et al. Injury of *Escherichia coli* in physiological phosphate-buffered saline induced by far-infrared irradiation // Journal of Chemical Engineering of Japan. – 1995. – Vol. 28. – №. 3. – P. 294-299.
149. Sawai J., Sagara K., Miyagawa M., Kokugan T., Shimizu M. Injuries in exponential phase cells of *Escherichia coli* suspended in physiological phosphate buffered saline by far-infrared irradiation // Journal of Chemical Engineering of Japan. — 1997. — Vol. 30, № 4. — P. 669–676. — DOI: 10.1252/jcej.30.669
150. Sawai J., Kojima H., Igarashi H., Hashimoto A., Fujisawa M., Kokugan T., Shimizu M. Pasteurization of bacterial spores in liquid medium by infra-red irradiation // Journal of Chemical Engineering of Japan. — 1997. — Vol. 30, № 1. — P. 170–172
151. Sawai J., Matsumoto K., Saito T.-A., Isomura Y., Wada R. Heat activation and germination-promotion of *Bacillus subtilis* spores by infrared radiation //

International Biodeterioration & Biodegradation. — 2009. — Vol. 63, № 2. — P. 196–200.

152. Pan Z., Khir R., Lewis R., Godfrey L., Salim A., Thompson J. F. Simultaneous rough rice drying and disinfestations using infrared radiation // Proceedings of the American Society of Agricultural and Biological Engineering (ASABE) Meeting, Portland, OR, USA, 9–12 July 2006.

153. Tanaka F. et al. Investigation of far infrared radiation heating as an alternative technique for surface decontamination of strawberry //Journal of Food Engineering. — 2007. — Vol. 79. — №. 2. — P. 445-452.

154. Trivittayasil V., Tanaka F., Uchino T. Investigation of deactivation of mold conidia by infrared heating in a model-based approach //Journal of food engineering. — 2011. — Vol. 104. — №. 4. — P. 565-570.

155. Alden L. B. Method for cooking food in an infra-red conveyor oven: пат. 5223290 СІІІА. — 1993.

156. Sharpe, S. W., Johnson, T. J., Sams, R. L., Chu, P. M., Rhoderick, G. C., Johnson, P. A. Gas-Phase Databases for Quantitative Infrared Spectroscopy // Applied Spectroscopy. — 2004. — Vol. 58, № 12. — P. 1452–1461. — DOI: 10.1366/0003702042641281.

157. Jun S., Irudayaraj J. A dynamic fungal inactivation approach using selective infrared heating // Transactions of the ASAE. — 2003. — Vol. 46. — №. 5. — P. 1407.

158. Gonca S. et al. Investigation of diode laser effect on the inactivation of selected Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria and yeast and its disinfection on wastewater and natural milk //Environmental Technology. — 2023. — Vol. 44. — №. 9. — P. 1238-1250.

159. Kohmura Y. et al. Transient photothermal inactivation of *Escherichia coli* stained with visible dyes by using a nanosecond pulsed laser //Scientific Reports. — 2020. — Vol. 10. — №. 1. — P. 17805.

160. Yasmin N., Hameed S., Javed R., Ahmed S., Imran M. Inactivation of foodborne pathogens on food packaging and in cow milk by exposure to a Nd:YAG laser

// Canadian Journal of Physics. — 2017. — Vol. 95, № 7. — P. 704–710. — DOI: 10.1139/cjp-2016-0676

161. Marouf A., Sara I. E. Monitoring pH during pasteurization of raw cow's milk using Nd:YAG laser // International Journal of Advanced Research in Physical Science (IJARPS). — 2018. — Vol. 4, № 12. — P. 1–4.
162. Schoop U., Kluger W., Moritz A., Nedjelik N., Georgopoulos A., Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin // Lasers in Surgery and Medicine. — 2004. — Vol. 35, № 2. — P. 111–116. — DOI: 10.1002/lsm.20026
163. Y. P., Stoodley P., Hall-Stoodley L. Laser disruption of biofilm // Laryngoscope. — 2008. — Vol. 118, № 7. — P. 1168–1173. — DOI: 10.1097/MLG.0b013e31816ed59d
164. Kasahara I., Carrasco V., Aguilar L. Inactivation of Escherichia coli in goat milk using pulsed ultraviolet light // Journal of Food Engineering. — 2015. — Vol. 152. — P. 43–49. — DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.11.012
165. Smith W. L., Lagunas-Solar M. C., Cullor J. Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurization of bovine milk // Journal of Food Protection. — 2002. — Vol. 65, № 9. — P. 1480–1482. — DOI: 10.4315/0362-028X-65.9.1480
166. Macmillan J. D., Maxwell W. A., Chichester C. O. Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser // Photochemistry and photobiology. — 1966. — Vol. 5. — № 7. — P. 555–565.
167. Maktarie S., Watson I., Parton R. Synergistic effect of UV, laser and microwave radiation or conventional heating on *E. coli* and on some spoilage and pathogenic bacteria // Innovative Food Science & Emerging Technologies. — 2011. — Vol. 12, № 2. — P. 129–134. — DOI: 10.1016/j.ifset.2010.12.011
168. Starzycki M., Rybiński W., Starzycka E., Pszczoła J. Laser light as a physical factor enhancing rapeseed resistance to blackleg disease // Acta Agrophysica. — 2005. — Vol. 5. — P. 441–446.

169. Nenadić K., Jović F., Pliestić S. An investigation of automatic treatment of seeds with low power laser beam // Automatika: časopis za automatiku, mjerjenje, elektroniku, računarstvo i komunikacije. — 2008. — Vol. 49. — P. 127–134.
170. Dobrowolski J. W., Wachalewski T., Smyk B., Różycki E., Barabasz W. Experiments on the influence of laser light on some biological elements of the natural environment // Environmental Management & Health. — 1997. — Vol. 8, № 4. — P. 136–141. — DOI: 10.1108/09566169710180768
171. Moustafa M., Helal M., El-Dakar H. Effect of laser irradiation on seed borne fungi of rice // Journal of Plant Protection and Pathology / Journal of Plant Protection and Pathology. — 2004. — DOI: 10.21608/jppp.2004.239520
172. Vuerich R. et al. A new laser device for ultra-rapid and sustainable aerosol sterilization // Environment International. — 2022. — Vol. 164. — P. 107272.
173. Watson I., Yeo C. B. A., Stewart-Tull D. Scanning CO₂ laser bacterial inactivation systems // Journal of Applied Microbiology. — 2007. — Vol. 102, № 3. — P. 766–773. — DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03126.x
174. Waynant R. W., Ilev I. K., Gannot I. Mid-infrared laser applications in medicine and biology // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. — 2001. — Vol. 359. — №. 1780. — P. 635–644.
175. Toyama T. et al. Investigation of bactericidal effect of a mid-infrared free electron laser on *Escherichia coli* // Scientific reports. — 2022. — Vol. 12. — №. 1. — P. 18111.
176. Kawasaki T., Fujioka J., Imai T., Torigoe K., Tsukiyama K. Mid-infrared free-electron laser tuned to the amide I band for converting insoluble amyloid-like protein fibrils into the soluble monomeric form // Lasers in Medical Science. — 2014. — Vol. 29, № 5. — P. 1701–1707. — DOI: 10.1007/s10103-014-1577-5
177. Kawasaki T., Fujioka J., Imai T., Tsukiyama K. Effect of mid-infrared free-electron laser irradiation on refolding of amyloid-like fibrils of lysozyme into native form

// Protein J. — 2012. — Vol. 31, № 8. — P. 710–716. — DOI: 10.1007/s10930-012-9452-3

178. Kawasaki T., Tsukiyama K., Nguyen P. H. Disassembly of Amyloid Fibril with Infrared Free Electron Laser // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24, № 4, Art. 3686. — DOI: 10.3390/ijms24043686

179. Sara Abdulkaky et al. Femtosecond laser technology: A new approach for water disinfection // Journal of Water Process Engineering. — 2024. — Vol. 66. — Art. 105977. — DOI: 10.1016/j.jwpe.2024.105977

180. Ahmed E., El-Gendy A. O., Hamblin M. R., Mohamed T. The effect of femtosecond laser irradiation on the growth kinetics of *Staphylococcus aureus*: An in vitro study // Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology. — 2021. — Vol. 221. — Article 112240. — DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112240.

181. Tsen S. W. D., Wu T. C., Kiang J. G., Tsen K. T. Prospects for a novel ultrashort pulsed laser technology for pathogen inactivation // Journal of Biomedical Science. — 2012. — Vol. 19, № 1, Article 62. — DOI: 10.1186/1423-0127-19-62

182. Abdulkaky S., Taha S., El-Gendy A. O., Mohamed T., Abdel Wahed M. S. Femtosecond laser technology: A new approach for water disinfection // Journal of Water Process Engineering. — 2024. — Vol. 66. — Art. 105977. — DOI: 10.1016/j.jwpe.2024.105977

183. Morichika I., Tsusaka H., Ashihara S. Generation of high-lying vibrational states in carbon dioxide through coherent ladder climbing // The Journal of Physical Chemistry Letters. — 2024. — Vol. 15, No. 17. — DOI: 10.1021/acs.jpclett.4c00873.

184. Chemtube3D [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.chemtube3d.com/>

185. Strateva T., Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance // Journal of medical microbiology. — 2009. — Vol. 58. — №. 9. — P. 1133-1148.

186. Li X. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing //Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1114199.,
187. Foster T. J. *Staphylococcus aureus* //Molecular medical microbiology. – 2002. – C. 839-888.
188. Herigstad B., Hamilton M., Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria // Journal of Microbiological Methods. — 2001. — Vol. 44, № 2. — P. 121–129. — DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00241-4
189. Barone V. Anharmonic vibrational properties by a fully automated second-order perturbative approach // The Journal of Chemical Physics. – 2005. – Vol. 122, no. 1. – P. 014108. DOI: 10.1063/1.1824881.
190. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J. A., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas O., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J., Fox D. J. Gaussian 09. Wallingford: Gaussian, Inc., – 2009.
191. Shastri A.; Das A. K.; Krishnakumar S.; Singh P. J.; Raja Sekhar B. N. Spectroscopy of N,N-dimethylformamide in the VUV and IR regions: Experimental and computational studies // J. Chem. Phys.. 2017. – Vol. 147, № 22. – Art. 224305. DOI: 10.1063/1.5006126. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.5006126>.

192. Naumann D. Infrared Spectroscopy in Microbiology // Encyclopedia of Analytical Chemistry [Electronic resource]. – John Wiley & Sons, Ltd, 2006. – DOI: 10.1002/9780470027318.a0117.
193. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. – 2007. – Vol. 1767, Issue 9. – P. 1073–1101. – DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
194. Kochanov R.V., Gordon I.E., Rothman L.S., et al. Infrared absorption cross-sections in HITRAN2016 and beyond: Expansion for climate, environment, and atmospheric applications // Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer. – 2019. – Vol. 230. – P. 172–221. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2019.04.001.
195. Fabian H., Naumann D. (ed.). Protein folding and misfolding: Shining light by infrared spectroscopy. – Springer Science & Business Media, 2011.
196. Laenen R., Rauscher C., Laubereau A. Transient hole burning in the infrared in an ethanol solution // The Journal of Physical Chemistry A. – 1997. Vol. 101, № 18. P. 3201–3206. DOI: 10.1021/jp961718x.
197. Cervetto V., Pfister R., & Helbing J. Time-resolved infrared spectroscopy of thiopeptide isomerization and hydrogen-bond breaking // The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – Vol. 112, № 11, – P. 3540–3544. DOI: 10.1021/jp710611n.
198. Компанец В.О., Кудряшов С.И., Толордава Э.Р., Шелыгина С.Н., Соколова В.В., Сараева И.Н., Ковалев М.С., Ионин А.А., Чекалин С.В. Фемтосекундная лазерная ИК-спектроскопия характеристических молекулярных колебаний бактерий в области 6 мкм // Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики. 2021. Т. 113, № 6. С. 365–369. DOI: 10.31857/S1234567821060021.
199. Cowan M.L., Bruner B.D., Huse N., et al. Ultrafast memory loss and energy redistribution in the hydrogen bond network of liquid H₂O // Nature. 2005. Vol. 434, № 7030. P. 199–202. DOI: 10.1038/nature03383.

200. Lepock J.R. Protein denaturation during heat shock. *Advances in Molecular and Cell Biology*. – 1997. – Vol. 19. – P. 223-259. DOI: 10.1016/S1569-2558(08)60079-X.
201. Movasaghi Z., Rehman S., ur Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues // *Applied Spectroscopy Reviews*. – 2008. Vol. 43, № 2. – P. 134–179. DOI: 10.1080/05704920701829043.