

УДК 544.43

ДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА, ГЕНЕРИРУЕМЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМИ РАЗРЯДАМИ, НА ПЕРВИЧНУЮ СТРУКТУРУ БЕЛКА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

© 2025 г. И. М. Пискарев^{1, *}, И. П. Иванова^{2, **}

¹Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, (НИИЯФ МГУ), Москва, Россия

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: i.m.piskarev@gmail.com

**E-mail: ivanova.ip@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2024 г.

После доработки 24.10.2024 г.

Принята к публикации 20.11

Исследовано действие активных форм кислорода и азота, генерируемых холодной плазмой коронного электрического разряда, импульсным излучением горячей плазмы и УФ-излучением ртутной лампы низкого давления, на белок альбумин, аминокислоты тирозин, триптофан, фенилаланин и грамположительные, грамотрицательные бактерии и микромицеты. Степень деградации всех проб оценивалась по уменьшению флуоресценции, а выживаемость микроорганизмов - по величине КОЕ после культивирования. Установлено, что флуоресценция определяется первичной структурой белка, в то время как выживаемость микроорганизмов – структурами второго и более высокого порядка.

Ключевые слова: флуоресценция, АФК, АФА, выживаемость микроорганизмов

DOI: 10.31857/S0023119325020106 **EDN:** AMHRWL

ВВЕДЕНИЕ

Дезинфекция активными формами кислорода является одним из важных технологических приемов, используемых в фармакологической, пищевой промышленности, медицине и др. Для дезинфекции применяются химически активные частицы, генерируемые физическими методами, например ультрафиолетовое излучение, излучение искрового разряда и др. Плазма электрического разряда проявляет выраженные дезинфицирующие свойства. Дезинфицирующий эффект обеспечивается за счет образования в водном растворе химически активных частиц. Состав химически активных частиц, генерируемых в плазме, и их свойства анализируются в работах [1, 2]. Плазменные технологии используются в ряде отраслей производства, например в сельском хозяйстве [3]. Для анализа эффектов в биологических объектах, происходящих под действием химически активных частиц, нужны методы, позволяющие оперативно оценить результат. Таким методом является эмиссионная флуоресцентная спектроскопия [4, 5]. Флуоресценция является быстрым и чувствительным методом исследования структуры, динамики и функций биологических макромолекул - нуклеиновых кислот, белков и др.

Выживаемость и свойства микроорганизмов традиционно оценивается биологическими методами [6–13]. Эти методы трудоемки и занимают много времени. Детальное сравнение флуоресценции и выживаемости микроорганизмов до сих пор не проводилось.

Цель работы: анализ механизмов действия активных форм кислорода и азота (АФК и АФА), генерируемых электрическими разрядами, на флуоресценцию аминокислот, белков и микроорганизмов. Сравнение выживаемости бактерий и микромицетов с изменением их флуоресценции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для обработки проб использовались три источника активных частиц: генератор холодной плазмы коронного электрического разряда, генератор импульсного излучения горячей плазмы ИР10 и ртутная лампа низкого давления ДКБ-9. Характеристики приборов и постановка эксперимента были приведены в работе [14]. Характеристика активных частиц, создаваемых в пробах, приведена в табл. 1.

Для альбумина и аминокислот изучалась флуоресценция в зависимости от дозы, создаваемой источниками активных частиц. Дополнительно те же растворы нагревались до кипения, после охлаж-

Таблица 1. Характеристика источников активных частиц

Источник активных частиц	Объем пробы, мл	Мощность дозы, Дж (10 мл мин) ⁻¹	Состав активных частиц	Основной механизм действия
Генератор холодной плазмы коронного электрического разряда	50	30 ± 3	Радикалы ОН [•] ; Озон	Окисление
Генератор импульсного излучения горячей плазмы ИР10	10	35 ± 3	Радикалы НО ₂ [•] , NO [•] ; NO ₂	Нитрование
Непрерывное излучение ртутной лампы низкого давления	10	20 ± 2	Излучение λ = 253.7 нм	Прямое поглощение фотонов

дения сравнивалась флуоресценция исходных растворов и растворов после нагревания.

Обрабатывались свежеприготовленные водные растворы бычьего сывороточного альбумина концентрацией 700 мг/л (1.07×10^{-5} моль/л), L-триптофана 20 мг/л (9.8×10^{-5} моль/л), L-тирозина 20 мг/л (1.1×10^{-4} моль/л) и L-фенилаланина 220 мг/л (1.33×10^{-3} моль/л). Концентрацию растворов контролировали по выходу флуоресценции, калибровку осуществляли по стандартным растворам. Пробы обрабатывали в чашках Петри, объем проб в табл. 1. Спектры флуоресценции измерялись не позднее 5 мин после обработки проб.

Для микроорганизмов изучалась флуоресценция, бактерицидный и фунгицидный эффект. Бактерицидный эффект оценивали на бактериальных штаммах антибиотикорезистентных грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 5913, *Enterococcus faecalis*, смеси *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus brevis* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* 775-3, *Lemiorrella Richardii*, *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Для анализов предварительно готовили суточную культуру микроорганизмов. Затем бактериальные клетки ресуспендировали в растворе Хенкса до концентрации $(10-15) \times 10^6$ клеток в 1 мл. Концентрацию клеток оценивали по оптической плотности раствора при длине волны 600 нм. Исходную и обработанную суспензию высевали в чашки Петри на слой агар и инкубировали в термостате при 37°C в течение суток. Бактерицидный эффект определяли по изменению числа КОЕ (колониеобразующих единиц).

Фунгицидный эффект оценивали на культурах микромицетов: *Alternaria alternata* ВКМ F-1120, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Chaetomium globosum* ВКМ F-109, *Penicillium chrysogenum* ВКМ F-245 и *Saccharomyces cerevisiae*. Готовили суспензию спор в воде с концентрацией $(2-4) \times 10^6$ клеток в 1 мл. Обработанную суспензию высевали на чашки Петри со средой Чапека–Докса. Образцы инкубировали в термостате при 27°C в течение трех суток. Фунгицидный эффект определяли по изменению числа КОЕ.

Бактерицидный и фунгицидный эффекты продуктов обработки рассчитывали для всей поверх-

Таблица 2. Линии возбуждения и регистрации исследованных проб

Проба	Возбуждение, нм	Регистрация, нм
Триптофан	290	350
Тирозин	275	303
Фенилаланин	261	284
Альбумин	285	330
<i>Staphylococcus Aureus</i>	285	340
<i>Lemiorrella Richardii</i>	285	330
Смесь <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	290	340
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	290	350

ности пробы в соответствии с дозой облучения. Доза D10 соответствовала уменьшению количества КОЕ после обработки в 10 раз. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета программ Microsoft Excel. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, а m — стандартное отклонение.

Флуоресценцию измеряли спектрофлуориметром “Флуорат-02 Панорама”, фирма “Люмекс”, Санкт-Петербург. Длины волн возбуждения и регистрации, определенные экспериментально, приведены в табл. 2. Для каждой пробы измерялась зависимость выхода флуоресценции от концентрации. Для работы принималась концентрация, при которой самопоглощением излучения в пробе можно было пренебречь.

Спектры поглощения измерялись спектрофотометром “СФ-102” фирмы “Аквилон”, Москва. Использовались химически чистые реактивы фирмы “Лаверна”, Москва, и дистиллированная вода, рН 6.5. Все микроорганизмы были получены из коллекции ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана (Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Воздействие активных частиц всех источников на анализируемые пробы приводит к изменению характеристик растворов и взвесей, проявляющееся

Таблица 3. Доза, создаваемая источниками активных форм кислорода и азота, соответствующая уменьшению флуоресценции аминокислоты и белка альбумина в 10 раз, D10(Flu), Дж/10 мл

Образцы	Доза D10(Flu)		
	Плазма	ИР10	УФ
Альбумин	610 ± 50	2100 ± 150	250 ± 40
Тирозин	630 ± 50	5000 ± 350	400 ± 60
Триптофан	260 ± 40	2300 ± 50	500 ± 80
Фенилаланин	640 ± 60	4200 ± 300	450 ± 70

в уменьшении флуоресценции (Flu) и гибели микроорганизмов (уменьшению КОЕ). Дозы D10(Flu), создаваемые в пробах генератором холодной плазмы коронного электрического разряда, импульсным излучением горячей плазмы генератора ИР10 и УФ-излучением ртутной лампы низкого давления, при которых уменьшается в 10 раз флуоресценция альбумина и аминокислот, приведены в табл. 3. Кипячение проб альбумина и аминокислот не приводило к изменению выхода флуоресценции.

Те же характеристики, дозы D10(Flu), для испытанных микроорганизмов приведены в табл. 4. В табл. 5 приведены дозы D10(КОЕ), под действием которых величина КОЕ испытанных микроорганизмов уменьшается в 10 раз. Прочерк в таблицах означает, что в данных условиях результаты не были получены. Основные механизмы действия источников активных частиц, использованных в работе, были приведены в табл. 1.

Из табл. 3 видно, что величина D10(Flu) под действием холодной плазмы коронного электрического разряда для всех проб примерно одинакова. Это означает, что механизмы воздействия для всех проб одинаковы: окисление радикалами $\text{OH}^\cdot$. Гидроксильные радикалы являются универсальным окислителем, они почти одинаково взаимодействуют со всеми органическими веществами.

Для УФ-излучения дозы того же порядка, что и для холодной плазмы, за исключением альбумина, в котором доза меньше из-за возможного погло-

щения излучения другими нефлуоресцирующими аминокислотами, входящими в состав альбумина, и внутримолекулярной передаче возбуждения, которая наблюдалась ранее в тех же условиях [14].

Доза излучения D10(Flu) для излучения горячей плазмы генератора ИР10 существенно больше, чем в случае плазмы, так как радикалы $\text{HO}_2^\cdot$ менее активны, а нитрующие агенты распадаются медленно и сразу после обработки дают малый вклад.

Доза D10(Flu) для микромицетов (табл. 4) того же порядка, что и доза для отдельных аминокислот. Это означает, что механизм воздействия на свободные аминокислоты и аминокислоты, находящиеся внутри белковых структур клетки микроорганизма, примерно одинаков. То обстоятельство, что кипячение белка альбумина и аминокислот не приводит к изменению флуоресценции, означает, что флуоресценция белка определяется его первичной структурой (составом аминокислот).

Доза D10(КОЕ), табл. 5, в большинстве случаев существенно меньше доз D10(Flu). Под действием холодной плазмы величины D10(КОЕ) для всех проб примерно одинаковы и намного меньше доз D10(Flu).

Строение бактерий и микромицетов существенно отличается. Все микроорганизмы имеют клеточную оболочку той или иной сложности, но микромицеты, в отличие от бактерий, имеют ядро, микромицеты – это эукариотические клетки. В состав клеточной стенки микромицетов входят меланины и хитин, плохо проницаемые для излучения. Гидроксильные радикалы, генерируемые в холодной плазме, практически одинаково окисляют все органические соединения, поэтому механизм действия плазмы – окислительное разрушение стенки бактерии или оболочки микромицета. В случае генератора ИР10 активные частицы, образующиеся под действием излучения горячей плазмы, существенно менее реакционно-способны, чем гидроксильные радикалы, генерируемые холодной плазмой, поэтому для ге-

Таблица 4. Доза, соответствующая уменьшению флуоресценции микроорганизмов в 10 раз, D10(Flu) Дж/10 мл

Пробы	Характеристика	D10 (Фл), Дж/10 мл		
		Плазма	ИР10	УФ
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Грамположительная бактерия	310 ± 50	1100 ± 110	300 ± 40
<i>Lemiorrella Richardii</i>	Грамотрицательная бактерия	420 ± 70	750 ± 70	300 ± 40
Смесь <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Грамположительная бактерия	600 ± 100	2100 ± 210	1100 ± 120
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Дрожжи	Микромицет	450 ± 90	1300 ± 150	1900 ± 110

Таблица 5. Доза, соответствующая уменьшению CFU в 10 раз, D10(CFU), Дж/10 мл

Пробы	Характеристика	D10 (CFU), Дж/10 мл		
		Плазма	ИР10	УФ
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Грамположительная бактерия	6 ± 1.5	29 ± 3	1.6 ± 0.2
<i>Escherichia coli</i>	Грамотрицательная бактерия	6 ± 1.5	41 ± 5	0.7 ± 0.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	Грамотрицательная бактерия	8 ± 1.9	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Грамотрицательная бактерия	7 ± 1.1	—	2 ± 0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	Грамположительная бактерия	7 ± 1.3	—	—
<i>Aspergillus Niger</i>	Микромицет	9 ± 2	280 ± 25	2100 ± 250
<i>Alternaria Alternata</i>	Микромицет	6 ± 1.5	177 ± 16	1900 ± 240
<i>Chaetomium Globosum</i>	Микромицет	—	35 ± 5	2000 ± 210
<i>Penicillium Chrysogenum</i>	Микромицет	—	210 ± 23	1400 ± 160

нератора ИР10 дозы D10CFU больше, чем для холодной плазмы.

В случае УФ-излучения разница действия на бактерии и микромицеты сильно выражена. Для бактерий доза D10(Flu) минимальна и составляет порядка 1 Дж/10 мл, в то время как для микромицетов, имеющих клеточное ядро, меланины и хитин в структуре клеточной стенки, доза D10(KOE) на три порядка больше и близка дозе D10(Flu).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что флуоресценция аминокислот, белка альбумина, бактерий и микромицетов под воздействием АФК и АФА уменьшается. Флуоресценция определяется первичной структурой белка, свойствами аминокислот, входящих в состав белка, в то время как выживаемость микроорганизмов – структурами второго и более высокого порядков.

Уменьшение флуоресценции пробы микроорганизмов под действием различных факторов служит указанием на возможность бактерицидного и спорицидного эффекта. Механизмы, приводящие к уменьшению флуоресценции проб и к гибели микроорганизмов, разные, но во всех случаях обработка активными частицами приводит к уменьшению флуоресценции и уменьшению КОЕ, поэтому флуоресцентная спектроскопия может быть использована для оперативной оценки биологических эффектов под действием АФК и АФА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bruggeman P.J., Kushner M.J., Locke B.R. et al. // Plasma Sources Sci. Technol. 2016. V. 25. 053002.
2. van Gils C.A.J., Hofman S., Boekema B.K.H.I. et al // J. Phys. D: Appl. Phys. 2013. V. 46. 175203.
3. Konchekov E.M., Namik Gusein zade, Burmistrov D.E. et al // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. 15093.
4. Henrique dos Santos Rodrigues, Delgado G.G., Thyerre Santana da Costa et al // BBA Advances. 2023. V. 3. 100091.
5. Мурадова Г.Р., Абдуллаев В.Р., Черкасова Д.У., Рабаданова А.И. // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. Т. 16. № 1 (4). С. 1166.
6. Marrero M.C., Barrio-Hernandez I. // ACS Omega. 2021. V. 6. P. 5091.
7. Hickman-Brenner F.W., Vohra M.P., Huntley-Carter G.P. et al. // J. Clin. Microbiol. 1985. V. 21. № 2. P. 234.
8. Lee H.B., Patriarca A., Magan N. // Mycobiology. 2015. V. 43. № 2. P. 93.
9. Wu N., Xing M., Chan Y. et al // Biotechnol. Biofuel Bioprod. 2022. V. 15. P. 151.
10. Karruli A., Catalini C., Amore C.D. et al // Antibiotics. 2023. V. 12. P. 399.
11. Chegaray N., Yilmaz B., Sharma H. et al // Microbiol. Res. 2023. V. 268. 127289.
12. Soh Batzadeh F., Colagar A.H., Mirzaneihad S. et al // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V. 160. P. 1978.
13. Kasa R.A., Juswono U.P., Santjojo D.J.D.H. // Sci. Technol. Indonesia. 2023. V. 8. P. 45.
14. Piskarev I.M. // High Energy Chem. 2024. V. 58. № 5. P. 80.

THE EFFECT OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES GENERATED BY ELECTRIC DISCHARGES ON THE PRIMARY STRUCTURE OF PROTEIN AND BIOLOGICAL OBJECTS

I. M. Piskarev^{a, *}, I. P. Ivanova^{b, **}

^a*Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics (SINP MSU), M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia*

*E-mail: i.m.piskarev@gmail.com

**E-mail: ivanova.ip@mail.ru

The effect of reactive oxygen and nitrogen species generated by cold plasma of corona electric discharge, pulsed radiation of hot plasma and UV radiation of low-pressure mercury lamp on albumin protein, amino acids tyrosine, tryptophan, phenylalanine and Gram-positive, Gram-negative bacteria and micromycetes was investigated. The degree of degradation of all samples was assessed by fluorescence reduction and microbial survival by CFU value after culturing. It was found that fluorescence is determined by the primary protein structure, while microbial survival by second and higher order structures.

Keywords: fluorescence, ROS, RNS, microbial survival rate