

СПОРОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ИМПУЛЬСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ГОРЯЧЕЙ ПЛАЗМЫ

DOI: 10.17691/stm2022.14.4.02

УДК 579.83:537.531

Поступила 24.03.2022 г.



И.М. Пискарев, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына¹;
И.П. Иванова, д.б.н., профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии
Института биологии и биомедицины²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 2,
Москва, 119234;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950

Нитрование является одним из основных механизмов реакции создания долгоживущих активных частиц (продуктов кислорода и азота), образующихся под действием импульсного излучения горячей плазмы. Большое время жизни активных частиц, образующихся в зоне разряда (до нескольких суток), дает им возможность проникать вглубь объектов, покрытых защитной оболочкой. К таким объектам относятся споры.

Цель исследования — изучить спороцидную активность импульсного излучения горячей плазмы искрового электрического разряда по данным анализа активных продуктов, образующихся в водном растворе L-тирозина под воздействием этого разряда.

Материалы и методы. В работе использовали генератор искрового разряда «Пилимин ИР-10» — импульсное излучение горячей плазмы; генератор коронного разряда — источник холодной плазмы; ртутную лампу низкого давления ДКБ-9 — непрерывное излучение УФ-диапазона с длиной волны 253,7 нм. Пробы обрабатывали в чашках Петри диаметром 40 мм, объемом 4 и 10 см³. В исследовании использовали раствор L-тирозина в дистиллированной воде (концентрация — 160 мг/л), суспензии бактерий и спор микромицетов (концентрация ~10⁶ кл. в 1 мл). Продукты превращения L-тирозина идентифицировали спектрофотометрически до и после обработки. Биоцидный и спороцидный эффекты оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) после посева и инкубации при 27–37°.

Результаты. Установлено, что окисление тирозина радикалами NO₂ невозможно. Под действием соединений азота происходит нитрование с образованием 3-нитротирозина. Реакция нитрования идет медленно, занимает около 100 ч. Возможный механизм нитрования — через образование иона нитрония NO₂⁺ в кислой среде.

Биоцидное действие излучения горячей плазмы оказалось слабее, чем УФ-излучение лампы ДКБ-9. Это связано с разницей их спектров излучения. Спороцидный эффект излучения горячей плазмы более выражен: снижение количества КОЕ в 10 раз наблюдается при дозах излучения 200–280 Дж. Под действием УФ-излучения при тех же дозах уменьшение количества КОЕ составляет от 3 до ~30%. Спороцидный эффект излучения горячей плазмы обусловлен распадом долгоживущего комплекса ...ONOOH/ONOO⁻... с образованием оксида азота и иона нитрония в кислой среде.

Заключение. Проведенное исследование показало, что жизнеспособность спор под действием импульсного излучения горячей плазмы снижается. Излучение же УФ-лампы в изученных условиях практически не проникает через защитную оболочку споры. Спороцидный эффект излучения горячей плазмы обусловлен распадом долгоживущего комплекса ...ONOOH/ONOO⁻... с образованием оксида азота и иона нитрония в кислой среде. Процесс нитрования играет решающую роль в спороцидном действии излучения горячей плазмы искрового разряда. Принцип спороцидного действия излучения газоразрядной плазмы, основанный на нитровании, может быть использован при разработке дезинфицирующих устройств.

Ключевые слова: горячая плазма; УФ-излучение; L-тирозин; нитрование; биоцидный эффект; спороцидный эффект.

Как цитировать: Piskarev I.M., Ivanova I.P. Sporicidal action of pulsed radiation of hot plasma. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(4): 17, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.4.02>

Для контактов: Иванова Ирина Павловна, e-mail: ivanova.ip@mail.ru

Sporicidal Action of Pulsed Radiation of Hot Plasma

I.M. Piskarev, PhD, Leading Researcher, Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics¹;

I.P. Ivanova, DSc, Professor, Molecular Biology and Immunology Department,
Institute of Biology and Biomedicine²

¹Lomonosov Moscow State University, 1–2 Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina,
Nizhny Novgorod, 603950, Russia

Nitration is one of the main reaction mechanisms of long-living reactive species (oxygen and nitrogen products) formed under the action of pulsed radiation of hot plasma. The long lifetime of reactive species formed in a discharge zone (up to several days) enables them to penetrate deep into the objects covered with a protective coat. Spores are such objects.

The aim of the investigation was to study sporicidal activity of hot plasma pulsed radiation of spark electric discharge by the analysis findings of active products formed in an aqueous L-tyrosine solution under the effect of the discharge.

Materials and Methods. In the study, we used a Piliin IR-10 spark discharge generator as a source of pulsed radiation of hot plasma; a corona discharge generator — as a source of cold plasma; a DKB-9 low-pressure mercury lamp — as a source of continuous radiation of UV band, wavelength of 253.7 nm. The samples were processed in Petri dishes, 40 mm in diameter, their volume being 4 and 10 cm³. The study used an L-tyrosine solution in distilled water (the concentration: 160 mg/L), a suspension of bacteria and spores of micromycetes (its concentration being ~10⁹ cells per 1 ml). Tyrosine conversion products were identified spectrophotometrically before and after treatment. The biocidal and sporicidal effects were assessed by counting CFU (colony-forming units) after seeding incubation at 27–37°C.

Results. The oxidation of tyrosine by HO₂ radicals was found to be impossible. Under the action of nitrogen compounds, nitration proceeds with 3-nitrotyrosine formation. The nitration reaction is slow, taking about 100 h. A possible nitration mechanism is through the formation of the nitronium ion NO₂⁺ in an acidic medium.

The biocidal effect of hot plasma radiation turned out to be weaker than that of UV radiation of a DKB-9 lamp. This is due to the difference in their emission spectrum. The sporicidal effect of hot plasma radiation was more pronounced: a 10-fold decrease in the number of CFU was observed at radiation doses of 200–280 J. Under the action of UV radiation, at the same doses, the decrease in the number of CFU was from 3 to ~30%. The sporicidal effect of hot plasma radiation is due to the decay of a long-living ...ONOOH/ONOO⁻... complex with the formation of a nitric oxide and a nitronium ion in an acidic medium.

Conclusion. The study showed the viability of spores under the action of pulsed radiation of hot plasma to decrease. While the light radiation of a UV lamp, under studied conditions, slightly penetrates the protective coating of a spore. The sporicidal effect of hot plasma radiation is due to the decay of a long-living ...ONOOH/ONOO⁻... complex with the formation of a nitric oxide and a nitronium ion in an acidic medium. Nitration plays a decisive role in the sporicidal action of the hot plasma radiation of a spark discharge. The principle of the sporicidal effect of gas-discharge plasma radiation can be used to develop disinfecting devices.

Key words: hot plasma; UV radiation; L-tyrosine; nitration; biocidal effect; sporicidal effect.

Введение

Горячая плазма импульсного электрического разряда может воздействовать на исследуемые биологические и небиологические объекты дистанционно, не создавая термических повреждений. Плазма излучает как нагретое черное тело с температурой ~10⁴ К в ультрафиолетовом, видимом и красном диапазонах, максимум спектра излучения — 220 нм. В зоне разряда образуются активные формы кислорода и азота. Активные формы кислорода гибнут на месте образования ввиду высокой реакционной способности. Радикалы азота имеют большее время жизни (порядка нескольких секунд) и способны диффундировать до объекта. Кроме того, окись азота обладает высокой способностью к проникновению сквозь биологические мембраны [1]. При обработке жидкости радикалы могут

поглощаться через поверхность раздела газ–жидкость. В исследовании [2] показано, что роль частиц, диффундирующих из области разряда, мала. Установлено, что основную роль играет излучение плазмы: оно не только действует на поверхности, но и проникает в жидкость на значительную глубину. Поэтому далее речь будет идти об излучении горячей плазмы.

Активными формами, образующимися в воде под действием излучения, являются радикалы HO₂, перекись водорода H₂O₂, азотистая кислота HNO₂ и комплекс ...ONOOH/ONOO⁻..., образующийся во время импульса излучения и распадающийся в течение 15 сут на пероксинитрит и пероксиазотистую кислоту HOONO [3]. Из-за образования азотистой кислоты значение pH воды после обработки уменьшается. Поскольку для пары ONOOH/ONOO⁻ значение константы диссоциации кислоты pK_a=6,8, основную роль

при распаде комплекса в кислой среде играет пероксиазотистая кислота.

Основным окислителем, образующимся непосредственно под действием излучения, является радикал HO_2 [3]. Дополнительно при распаде пероксиазотистой кислоты могут образовываться гидроксильные радикалы. Восстановителями могут служить соединения азота. Установлено, что в случае воздействия импульсного излучения горячей плазмы на неорганические вещества выход окисления и восстановления примерно одинаков и абсолютная величина выходов (~5 молекул на 100 эВ затраченной энергии) близка выходу в радиационно-химическом процессе [4]. Поэтому импульсное излучение горячей плазмы может быть эффективным методом обработки жидкостей или поверхностей в различных технологических процессах.

Воздействие холодной плазмы и дистанционное воздействие горячей плазмы на водные растворы сильно различаются. Холодная плазма непосредственно контактирует с обрабатываемым объектом, и активные частицы проникают в раствор через поверхность раздела газ–жидкость [5]. Основной активной частицей холодной плазмы является гидроксильный радикал. Представляется интересным изучить воздействие продуктов, образующихся под действием излучения горячей плазмы, на органические соединения и сравнить его с изменениями под действием холодной плазмы.

Удобной моделью для изучения состояния белков являются ароматические аминокислоты, входящие в их состав (триптофан, тирозин, фенилаланин), так как они идентифицируются по спектрам поглощения и характеристическим линиям флуоресценции. Изменения, происходящие в структуре ароматических аминокислот, сразу проявляются в спектрах поглощения и флуоресценции [6]. В качестве объекта исследования в работе выбран тирозин, так как и он, и продукт его нитрования (3-нитротирозин) идентифицируются по спектрам поглощения, а сам тирозин — еще и по флуоресценции [7]. Механизм образования 3-нитротирозина изучался в работе [8], обзор результатов по нитрованию тирозина в составе белков дается в работе [9].

Цель работы — изучить спороцидную активность импульсного излучения горячей плазмы искрового электрического разряда по данным анализа активных продуктов, образующихся в водном растворе L-тирозина под воздействием этого разряда. Данные активные продукты определяют химические реакции.

Задачи исследования — сравнение изменений в растворе тирозина под действием холодной плазмы коронного электрического разряда и импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда, а также оценка роли процесса нитрования в биоцидном и спороцидном эффектах излучения горячей плазмы.

Материалы и методы

Общие условия. Эксперимент с L-тирозином выполнен с использованием двух приборов, гене-

рирующих активные частицы: источника импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда «Пилимин ИР-10» (НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), далее — ИР-10, и реактора коронного электрического разряда. С их помощью обрабатывали раствор L-тирозина в дистиллированной воде с концентрацией 160 мг/л ($8,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л), $\text{pH}=5,65$. Спектры поглощения растворов измеряли спектрофотометром СФ-102 («Аквилон», Россия), флуоресценцию — прибором «ФЛЮОРАТ-02-ПАНОРАМА» («ЛЮМЭКС», С.-Петербург), значение pH — прибором «Эксперт-001» («Эконикс», Москва). Во всех экспериментах использовали химически чистые реактивы и дистиллированную воду, $\text{pH}=6,5$. Пробы брали разного объема, поэтому значения дозы нормированы на фактический объем пробы (10 или 4 мл раствора).

Источник импульсного излучения горячей плазмы «Пилимин ИР-10» смонтирован в виде двух модулей: модуля разряда 1 и модуля источника питания 2 (рис. 1).

В разрядном модуле 1, изготовленном из фторопласта-4, помещены электроды из нержавеющей стали толщиной 2 мм, между которыми происходит разряд. Расстояние между электродами — 3 мм, что соответствует пробивному напряжению промежутка 6 кВ. Электроды соединены с конденсатором емкостью 3300 пФ. При включении высокого напряжения –11 кВ начинался самостоятельный искровой разряд. Полная длительность импульса тока — 100 мкс, передний фронт — 50 нс, энергия разряда импульса — 0,059 Дж, частота повторения импульсов — 10 Гц, мощность разряда — 0,59 Дж/с. Длительность импульса тока определялась временем рассасывания заряда. Ток, потребляемый от источника питания, — $0,70 \pm 0,02$ мА. В разряде выделялось ~5% энергии,

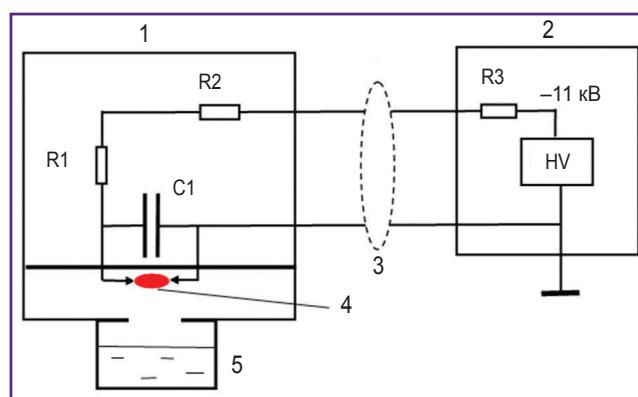


Рис. 1. Схема источника импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда «Пилимин ИР-10»:

1 — модуль излучателя; 2 — модуль источника питания; 3 — ВЧ-кабель, $\rho=75$ Ом; 4 — область разряда; 5 — чашка Петри с обрабатываемой пробой; R1, R2, R3 — резисторы; C1 — разрядный конденсатор; HV — источник высокого напряжения

потребляемой от источника питания. Горячая плазма излучала как черное тело, нагретое до температуры $\sim 10^4$ К, максимум спектра излучения находился при длине волны 220 нм [2].

Интенсивность УФ-излучения генератора ИР-10, определенная иодометрическим методом, на расстоянии 3 см от области разряда составляла $(1,26 \pm 0,20) \cdot 10^{-10}$ моль $(\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$ [2, 3]. Условия подбирали так, что плазма искрового разряда была слабо ионизирована, степень ионизации — менее 0,1%. Электронная плотность $\sim 10^{11}$ см $^{-3}$, энергия электронов не превышала 1 эВ [3, 4].

Часть модуля, в котором происходит разряд, отгорожена от остальной части непроницаемой фторопластовой перегородкой. Высокое напряжение подается в модуль разряда радиочастотным кабелем, волновое сопротивление $\rho = 75$ Ом. Заземленная жила кабеля соединена непосредственно с одной обкладкой конденсатора С1. Центральная жила кабеля соединена с другой обкладкой конденсатора через два резистора R1 и R2 (330 кОм, 2 Вт), установленных в разрядном модуле. Резисторы R1 и R2 предназначены для гашения отраженной волны, возникающей в момент разряда.

В модуле источника питания 2 помещен высоковольтный выпрямитель на 11 кВ. Отрицательный полюс выпрямителя соединен через балластный резистор R3=8МОм с центральной жилой кабеля. Напряжение 11 кВ подается на зарядку конденсатора С1 через резисторы R1, R2 и R3. Постоянная времени зарядной цепи определяется величиной $R3 \times C1$ с, так как $R1$ и $R2 \ll R3$. Разрядная полость через отверстие диаметром 2 см соединена со стеклянной чашкой Петри диаметром 40 мм, в которую помещается проба обрабатываемой жидкости объемом 10 или 4 мл. Расстояние от области разряда до поверхности жидкости — 30 мм. Энергия, выделяемая в искровом разряде за 20 мин, составляет 700 ± 40 Дж на 10 мл обрабатываемого раствора.

Реактор коронного электрического разряда (рис. 2) выполнен на базе стеклянной емкости 1 объемом 0,5 л, на дно которой наливали пробу обрабатываемой жидкости 3 — 50 мл. Через отверстие в дне пробу жидкости заземляли. На расстоянии 6 мм от поверхности жидкости располагались 7 разрядных электродов. Электроды закрепляли на расстоянии 25 мм друг от друга. На каждый электрод через набор резисторов общим сопротивлением 20 МОм (6 резисторов по 3,3 МОм, 2 Вт) подавалось высокое напряжение отрицательной полярности (–11 кВ) от источника питания 2. Ток разряда каждого электрода составлял 70 мкА, напряжение на каждом электроде относительно жидкости с учетом падения напряжения на резисторах — 9,6 кВ. Каждый электрод соединялся с землей через конденсатор 30 пФ.

Энергия, выделяемая в коронном разряде, составляла 1200 ± 60 и 2400 ± 120 Дж на 10 мл обрабатываемого раствора за 20 и 40 мин соответственно.

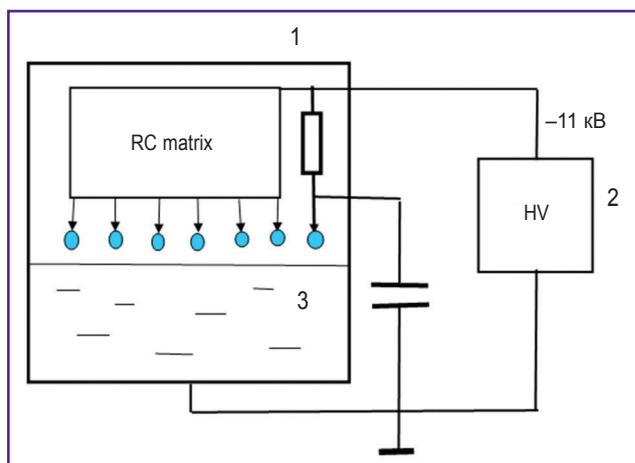


Рис. 2. Схема обработки проб холодной плазмой коронного электрического разряда:

1 — корпус реактора коронного электрического разряда; 2 — блок источника питания; 3 — обрабатываемая жидкость; HV — источник высокого напряжения; RC matrix — матрица резисторов и конденсаторов

Источник УФ-излучения. Непрерывное ультрафиолетовое излучение с длиной волны 253,7 нм генерировалось ртутной лампой низкого давления ДКБ-9 с корпусом из увиолевого стекла. Мощность лампы — 9 Вт. Плотность потока энергии на расстоянии 3 см от лампы составляла $2,6 \cdot 10^{-2}$ Дж $(\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$. Энергия на пробу жидкости объемом 10 мл составляла 19,6 Дж $(\text{мин})^{-1}$.

Измерение флуоресценции тирозина. Длины волн возбуждения и флуоресценции у тирозина известны, но они были уточнены в отдельном эксперименте для учета особенностей применяемого оборудования. Для определения длины волны возбуждения измеряли выход флуоресценции при длине волны 303 нм в диапазоне длин волн возбуждения 200–300 нм. Максимальный выход флуоресценции был получен при длине волны возбуждения 275 ± 1 нм. Для определения длины волны флуоресценции измеряли выход флуоресценции при длине волны возбуждения 275 нм в диапазоне длин волн регистрации 290–320 нм. Максимальный выход флуоресценции получен при длине волны регистрации 303 ± 1 нм.

Известно, что флуорофоры поглощают свое излучение. Самопоглощение растет с увеличением концентрации раствора. Исследование зависимости выхода флуоресценции от концентрации раствора тирозина в диапазоне концентраций от 1 до 20 мг/л показало, что интенсивность флуоресценции линейно растет с увеличением концентрации до 12 мг/л, далее выходит на плато и начинает падать. Поэтому для изучения уровня флуоресценции тирозина в данном эксперименте была принята концентрация его раствора 10 мг/л (обработанные растворы тирозина в концентрации 160 мг/л разбавлялись в 16 раз).

Обработка биологических образцов. Эксперимент с бактериями и спорами микромицетов выполнен с использованием генератора горячей плазмы ИР-10 и УФ-лампы низкого давления ДКБ-9. Биоцидный эффект оценивали на бактериальных штаммах антибиотикорезистентных грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 5913 и грамотрицательных микроорганизмов *Escherichia coli* 775-3. Бактериальные штаммы получены из музея кафедры эпидемиологии, микробиологии и иммунологии Приволжского медицинского исследовательского университета. Для анализов предварительно готовили суточную культуру микроорганизмов. Затем бактериальные клетки ресуспендировали в растворе Хенкса до концентрации $(10-15) \cdot 10^6$ кл. в 1 мл. Суспензию микроорганизмов объемом 4 мл обрабатывали импульсным излучением горячей плазмы генератора ИР-10 в течение времени (до 70 с) и УФ-излучением ртутной лампы низкого давления ДКБ-9 — до 10 с. Обработанную суспензию высевали на чашки Петри на слой агар и инкубировали в термостате при 37°C в течение суток. Биоцидный эффект определяли по числу КОЕ.

Спороцидный эффект излучений оценивали на культурах микромицетов: *Alternaria alternata* ВКМ F-1120, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Chaetomium globosum* ВКМ F-109, *Penicillium chrysogenum* ВКМ F-245, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Приготавливали суспензию спор в воде с концентрацией $(2-4) \cdot 10^6$ кл. в 1 мл. Пробы суспензии объемом 4 мл обрабатывали излучением генератора ИР-10 и лампы ДКБ-9 в течение времени до 10 мин. Обработанную суспензию высевали на чашки Петри со средой Чапека–Докса. Образцы инкубировали в термостате при 27°C в течение трех суток, спороцидный эффект рассчитывали по числу КОЕ.

Спороцидный и биоцидный эффекты продуктов импульсного излучения горячей плазмы и ртутной лампы низкого давления рассчитывали для всей поверхности пробы в соответствии с дозой облучения. Доза D10 соответствовала уменьшению количества КОЕ после обработки в 10 раз ($KOE_0/KOE_t=10$), где KOE_0 — количество колониеобразующих единиц в исходной пробе; KOE_t — после обработки в течение времени t.

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.

Результаты и обсуждение

Результаты обработки тирозина излучением горячей и холодной плазмы. Исходный раствор L-тирозина — нейтральный, pH=5,7. После обработки импульсным излучением горячей плазмы генератора искрового разряда ИР-10 pH раствора уменьшается: при дозе излучения 180 Дж — до 3,8, при дозе

700 Дж — до 3. Спектр поглощения раствора тирозина сразу после обработки представлен на рис. 3. Видно, что характеристики основного пика поглощения, связанного с фенольным кольцом, при $\lambda=274$ нм после обработки практически не изменились. В диапазоне длин волн 335–385 нм видны линии азотистой кислоты, образовавшейся под действием излучения.

Спектры поглощения раствора тирозина сразу после обработки холодной плазмой коронного электрического разряда при дозах излучения от 600 до 2400 Дж приведены на рис. 4. Величина pH после обработки не меняется. Видно, что основной пик поглощения при $\lambda=274$ нм далее уменьшается и при дозе излучения 2400 Дж пропадает совсем.

На следующий день спектр поглощения раствора, обработанного холодной плазмой искрового разряда, не меняется. В спектре раствора, обработанного

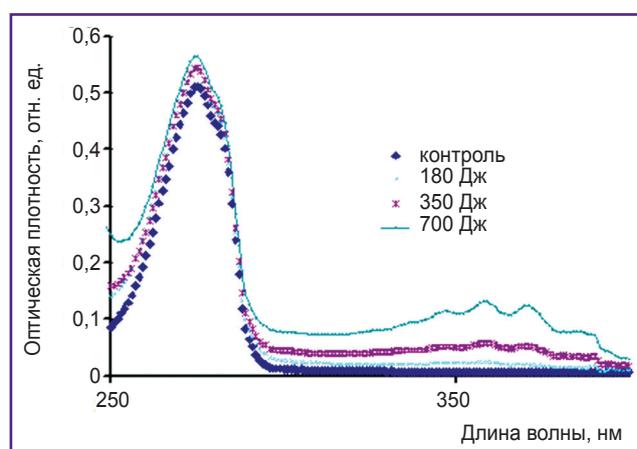


Рис. 3. Спектры поглощения раствора тирозина с концентрацией 160 мг/л сразу после обработки излучением горячей плазмы генератора ИР-10 дозы излучения — 180, 350 и 700 Дж (на 10 мл раствора)

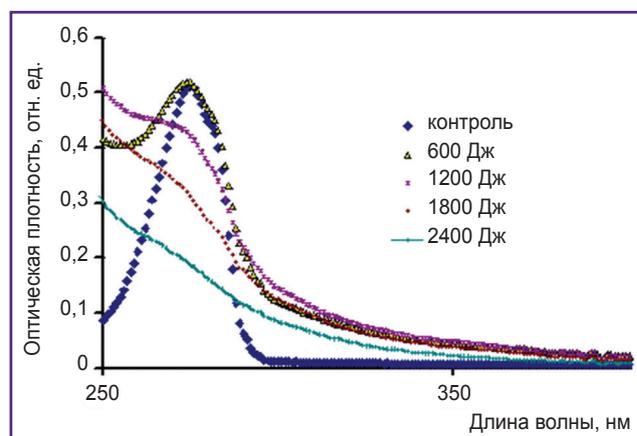


Рис. 4. Спектры поглощения раствора тирозина с концентрацией 160 мг/л сразу после обработки холодной плазмой коронного электрического разряда дозы излучения — 600, 1200, 1800 и 2400 Дж (на 10 мл раствора)

импульсным излучением горячей плазмы генератора ИР-10, пропадают линии азотистой кислоты и появляется пик 353 нм (рис. 5). Его оптическая плотность растет с увеличением дозы излучения. Можно предположить, что этот пик связан с образованием 3-нитротирозина. Для идентификации продукта в кислый раствор в первый день после обработки непосредственно перед измерением спектра вводили кристаллический NaOH, чтобы получить pH=12.

Спектры растворов с pH=3 и 12 на следующий день после обработки генератором ИР-10 изменились (рис. 6). Видно, что пик 353 нм сдвигается вправо до $\lambda=425$ нм. Согласно данным работы [6], пик 3-нитротирозина в кислой и щелочной средах в пределах возможных ошибок измерений находится примерно при тех же длинах волн (353 и 425 нм). Таким

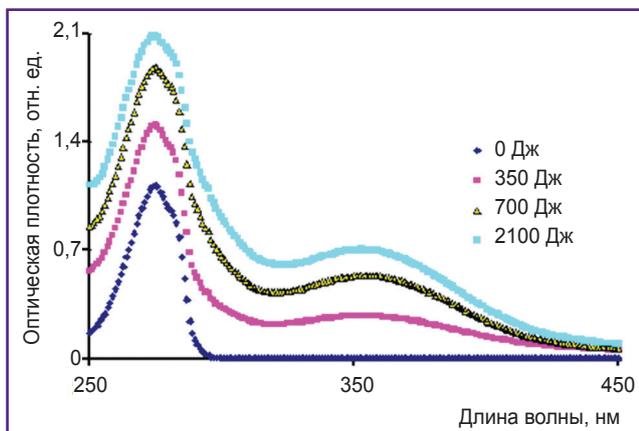


Рис. 5. Спектры поглощения раствора тирозина с концентрацией 160 мг/л через сутки после обработки излучением генератора ИР-10 дозы излучения — 0, 350, 700 и 2100 Дж (на 10 мл раствора)

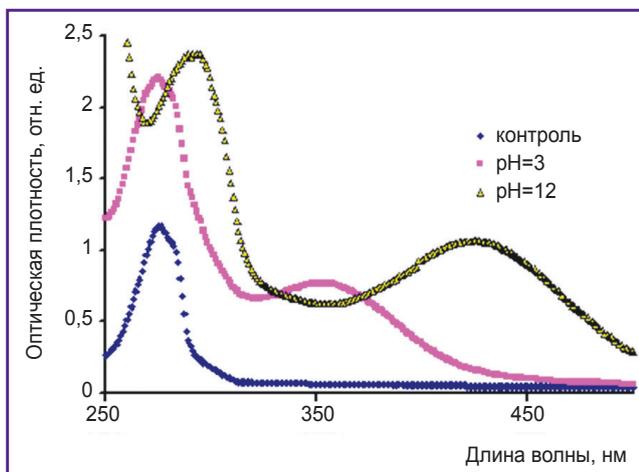


Рис. 6. Спектры поглощения раствора тирозина с концентрацией 160 мг/л: исходного, через сутки после обработки излучением горячей плазмы генератора ИР-10 (pH=3) и после введения щелочи (pH=12)

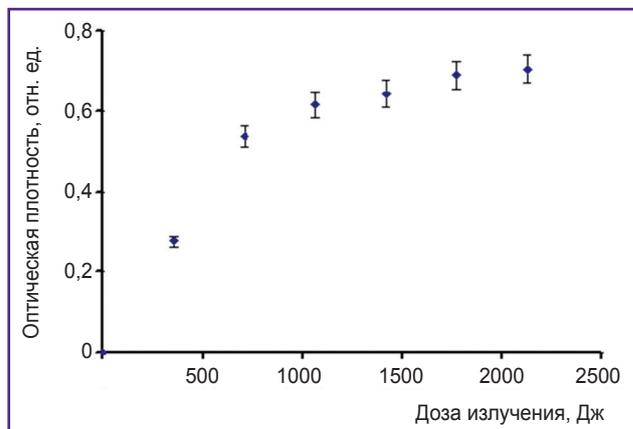


Рис. 7. Зависимость оптической плотности от дозы облучения для линии 3-нитротирозина ($\lambda=353$ нм) через сутки после обработки излучением горячей плазмы генератора ИР-10

образом, протекание процесса нитрования под действием импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда можно считать доказанным, так как обнаружен по крайней мере один продукт этой реакции. Идентификация других продуктов нитрования не входила в задачу данного исследования.

Продукт нитрования отчетливо наблюдается в первый и последующие дни после обработки. Введение щелочи сдвигает положение пика 3-нитротирозина. Однако, если ввести щелочь сразу после обработки, пик 3-нитротирозина не проявляется ни в первый, ни в последующие дни. Оптическая плотность пика 353 нм в первый день после обработки генератором ИР-10 растет с дозой излучения и в пределах ошибок выходит на плато при дозе больше 1800 Дж/10 мл (рис. 7).

Нитрование с образованием 3-нитротирозина может происходить под действием импульсного излучения горячей плазмы в реакции с азотистой кислотой, образующейся непосредственно в процессе обработки, и в реакции с пероксиазотистой кислотой, образующейся при распаде комплекса ...ONOOH/ONOO... после обработки. Для оценки роли разных каналов нитрования выполнен дополнительный эксперимент. Изучалась зависимость оптической плотности пиков 3-нитротирозина в кислой и щелочной средах от времени (до 120 ч) после обработки. Кислая среда создавалась в пробе непосредственно при обработке и сохранялась при выдержке в течение заданного времени. Щелочная среда создавалась введением в обработанный раствор после выдержки в течение заданного времени и непосредственно перед измерением спектра поглощения кристаллов NaOH. Результаты для растворов, обработанных генератором излучения плазмы ИР-10 в течение 20 мин при дозе 700 Дж/10 мл, представлены на рис. 8.

Для изучения процесса нитрования тирозина с использованием азотистой кислоты в раствор вводили

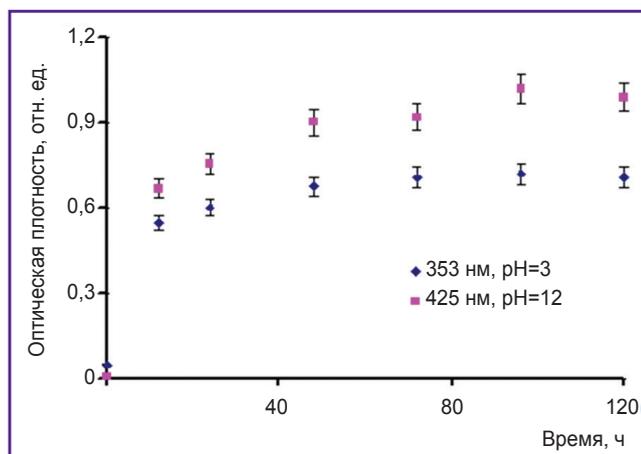


Рис. 8. Зависимость оптической плотности для линий 3-нитротирозина в кислой среде (pH=3, λ=353 нм) и в щелочной среде (pH=12, λ=425 нм) от времени после обработки раствора L-тирозина излучением горячей плазмы генератора ИР-10

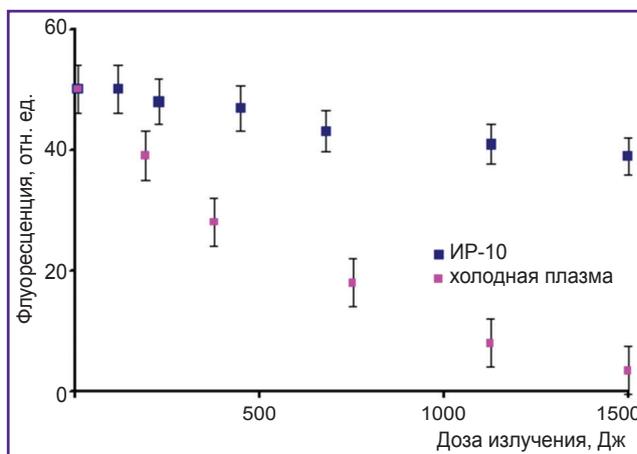


Рис. 10. Зависимость флуоресценции раствора тирозина от дозы излучения Дж/10 мл через сутки после обработки излучением горячей плазмы генератора ИР-10 и холодной плазмой коронного электрического разряда сразу после обработки

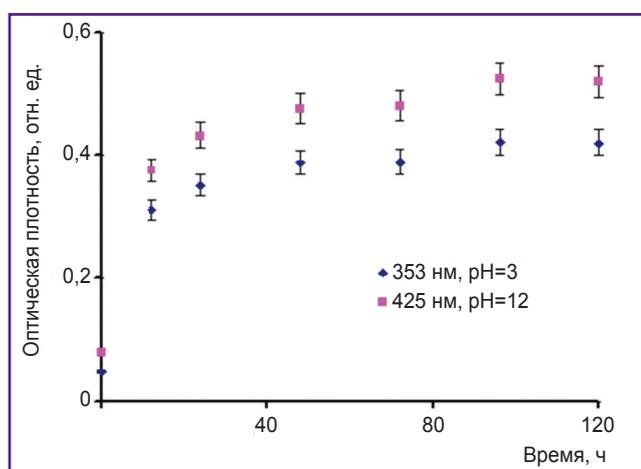


Рис. 9. Зависимость оптической плотности для линий 3-нитротирозина в кислой среде (pH=3) и щелочной среде (pH=12) от времени после введения в раствор L-тирозина NaNO₂ и H₂SO₄

азотистоокислый натрий NaNO₂ и серную кислоту H₂SO₄. Азотистая кислота образовывалась в реакции:



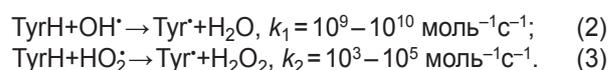
Реагенты были подобраны таким образом, чтобы концентрация азотистой кислоты в реакции (1) равнялась ее выходу за время облучения генератором ИР-10 в течение 20 мин (доза излучения — 700 Дж). Зависимость оптической плотности пиков 353 и 425 нм (в кислой и щелочной средах) от времени (до 120 ч) после введения азотистоокислого натрия и серной кислоты представлена на рис. 9.

Из рис. 8 и 9 видно, что реакция нитрования происходит медленно, оптическая плотность пика 3-нитротирозина растет со временем после обработки и

выходит в пределах ошибок на плато через ~100 ч. Сравнение рис. 8 и 9 показывает, что оптическая плотность пика 3-нитротирозина в растворе, обработанном импульсным излучением горячей плазмы, когда вклад в нитрование дают азотистая и пероксиазотистая кислота, примерно в два раза больше, чем в растворе с NaNO₂ + H₂SO₄, когда вклад в нитрование дает только азотистая кислота. Это может означать, что вклад в нитрование азотистой и пероксиазотистой кислот примерно одинаков.

Анализ зависимости флуоресценции тирозина от дозы облучения генератором ИР-10 через сутки после обработки и холодной плазмой коронного разряда сразу после обработки (рис. 10) показал, что при дозе 1000–1500 Дж/10 мл под действием плазмы коронного разряда тирозин разрушается практически полностью. Однако под действием излучения генератора ИР-10 при той же дозе флуоресценция уменьшается на 5–10%, что может практически никак не сказываться на спектре поглощения. Таким образом, результаты по флуоресценции соответствуют данным по спектрам поглощения (см. рис. 3 и 4).

Механизм окисления тирозина. Под действием излучения горячей плазмы искрового разряда в воде образуются как окислители, так и восстановители [4]. Под действием коронного электрического разряда в парах воды образуются гидроксильные радикалы, перекись водорода и озон [10]. Иницирование окисления органических веществ возможно радикалами OH[•] и HO₂[•]. Применительно к тирозину (Tyr) стадию иницирования можно выразить так:



Здесь и далее использованы данные по константам скорости реакций *k* из справочника [11]. В реакциях

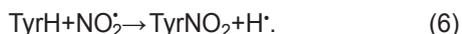
отрыва атома водорода от молекулы TyrH (формула (3)) выделяется энергия E , равная энергии связи образующейся молекулы:



Здесь и далее использованы данные по энергиям связи из справочника [12]. Энергия, высвобождающаяся в реакциях (4) и (5), может быть использована для отрыва атома водорода от молекулы. Энергия отрыва атома водорода в ароматическом кольце составляет 89 ккал/моль [13]. Отсюда видно, что ароматические вещества могут окисляться гидроксильными радикалами, образующимися в холодной плазме коронного разряда, и не могут окисляться радикалами HO_2^{\cdot} , образующимися в воде под действием импульсного излучения горячей плазмы. Рис. 3–5 подтверждают эти выводы.

Таким образом, окисление тирозина первичными активными частицами, образующимися под действием излучения плазмы, оказывается энергетически невозможным. Вторичные продукты распада комплекса являются сильными окислителями, при изомеризации пероксинитрита образуются гидроксильные радикалы [14]. Однако концентрация вторичных частиц намного меньше, чем первичных, и, как показывает эксперимент, роль этих вторичных частиц пренебрежимо мала. Поэтому окисления тирозина излучением горячей плазмы, приводящего к разрушению ароматического кольца, не наблюдается. Следовательно, основными активными частицами, определяющими реакционную способность излучения, будут радикалы NO_2^{\cdot} , образующиеся при распаде азотистой и пероксиазотистой кислот, которые активизируют процесс нитрования. Нитрование тирозина наблюдалось и в данном эксперименте.

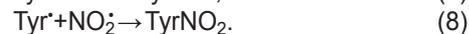
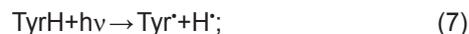
Механизм нитрования. Основными активными частицами, инициирующими нитрование в данном эксперименте, являются азотистая кислота, образующаяся непосредственно под действием излучения, и пероксиазотистая кислота, образующаяся при распаде комплекса $\dots\text{ONO}^{\cdot}\text{OH}/\text{ONO}^{\cdot}\text{O}^{\cdot}\dots$, формирующегося под действием излучения и распадающегося за время до 15 сут [2, 3]. Процесс нитрования можно записать через начальное и конечное состояние как



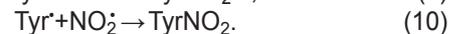
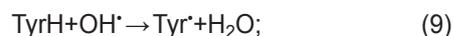
Энергия связи атома водорода в ароматическом кольце тирозина ~ 89 ккал/моль, энергия связи группы NO_2 , присоединившейся на место атома водорода, ~ 19 ккал/моль. Поэтому реакция нитрования — экзотермическая, выделяемая энергия ~ 70 ккал/моль [12]. Энергетически наиболее вероятно образование 3-нитротирозина [6–9].

В литературе обсуждаются два возможных механизма реакции: радикальный и через образование иона нитрония NO_2^+ . Радикальный механизм возможен, если под действием излучения образуется ради-

кал тирозина Tyr^{\cdot} . Тогда к нему может присоединиться радикал NO_2^{\cdot} :



Другой вариант радикального механизма возможен при распаде пероксиазотистой кислоты на радикалы OH^{\cdot} и NO_2^{\cdot} . Радикал тирозина образуется при взаимодействии молекулы тирозина с гидроксильным радикалом, после чего на это место присоединяется радикал NO_2^{\cdot} :



В принципе такой механизм возможен, так как оба радикала образуются в одном месте и при распаде одной молекулы пероксиазотистой кислоты [14].

Альтернативный канал связан с образованием иона нитрония NO_2^+ . Ион нитрония образуется в кислой среде при наличии кислотных остатков азотной или азотистой кислоты. Процесс можно представить следующим образом:



Далее образуется переходное состояние:



При распаде переходного состояния выделяется энергия A и образуется конечный продукт нитрования:



Образование переходного состояния — медленная стадия. Согласно экспериментальным данным, она может продолжаться 2–3 дня.

Для идентификации продукта нитрования в растворе, выдержанный не менее одного дня, после обработки излучением горячей плазмы искрового разряда вводили щелочь. Если щелочь вводили сразу после обработки, никаких изменений в спектре поглощения раствора через 1–2 дня не наблюдалось. Пик 3-нитротирозина не появлялся. Отсюда можно сделать два вывода. Ион нитрония не образуется в щелочной среде, поэтому механизм нитрования через ион нитрония вполне возможен. В щелочной среде время жизни пероксинитрита больше, чем пероксиазотистой кислоты в кислой среде. Поэтому продукты его распада — радикалы OH^{\cdot} и NO_2^{\cdot} — должны образовываться. Однако продукт нитрования не появляется. Значит, радикальный механизм нитрования в изучаемом процессе невозможен.

Спороцидный и биоцидный эффекты излучения плазмы генератора ИР-10 и УФ-излучения лампы ДКБ-9. Результаты эксперимента с бактериальными штаммами и культурами микромицетов представлены в таблице.

Механизмы биоцидного и спороцидного эффектов принципиально различаются. Бактериальные клетки погибают после поглощения молекулами ДНК энергии УФ-излучения с длиной волн в диапазоне 250–260 нм. УФ-лампа генерирует излучение с длиной

Спороцидный и биоцидный эффекты продуктов импульсного излучения горячей плазмы и ртутной лампы низкого давления ($M \pm m$)

Тип клеток	ИР-10 (горячая плазма)		УФ-лампа ДКБ-9		КОЕ ₀ /КОЕ _t
	Доза (D10), Дж	Время обработки	Доза, Дж	Время обработки	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29±3	50 с	1,6±0,2	5 с	10
<i>Escherichia coli</i>	41±5	70 с	0,7±0,1	2 с	10
<i>Aspergillus niger</i>	280±25	8 мин	200	10 мин	0,97±0,10
<i>Alternaria alternata</i>	177±16	5 мин	200	10 мин	0,88±0,10
<i>Chaetomium globosum</i>	35±4	1 мин	200	10 мин	0,90±0,10
<i>Penicillium chrysogenum</i>	210±23	6 мин	200	10 мин	0,65±0,15

Примечание: доза D10 — уменьшение количества КОЕ после обработки в 10 раз.

волны 253,7 нм, тем самым практически вся энергия излучения приходится на максимум поглощения молекулой ДНК. В то же время средний поток фотонов УФ-излучения, генерируемого искровым разрядом генератора ИР-10, намного меньше, чем УФ-лампы. И максимум теплового излучения искрового разряда приходится на длину волны 220 нм, т.е. не попадает в максимум полосы поглощения ДНК. Поэтому энергия, необходимая для уменьшения КОЕ бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в 10 раз, под действием излучения горячей плазмы намного больше (29±3 и 41±5 Дж соответственно), чем под действием излучения УФ-лампы (1,6±0,2 и 0,7±0,1 Дж соответственно).

Однако мгновенная плотность излучения генератора ИР-10 в момент вспышки разряда намного больше мгновенной плотности излучения ртутной лампы. Высокая мгновенная плотность излучения приводит к тому, что в водном растворе образуется комплекс ...ONOOH/ONOO⁻..., распадающийся за время до 14 сут на пероксинитрит и пероксиазотистую кислоту [2, 3]. Поскольку под действием излучения горячей плазмы водный раствор приобретает кислую реакцию, то основным продуктом распада комплекса является пероксиазотистая кислота. При распаде пероксиазотистой кислоты образуются продукты, инициирующие нитрование.

Споры микромицетов покрыты многослойной оболочкой, не пропускающей излучение. Поэтому УФ-излучение ртутной лампы действует на споры очень слабо. Из таблицы видно, что доза 200 Дж излучения ртутной лампы приводит к уменьшению КОЕ на уровне 10%. В то же время доза порядка 200 Дж импульсного излучения горячей плазмы приводит к уменьшению КОЕ в 10 раз. Как показал выполненный эксперимент, окисление сложных органических соединений продуктами, образующимися под действием излучения горячей плазмы, может оказаться маловероятным или вообще невозможным. Долгоживущий комплекс ...ONOOH/ONOO⁻... диффундирует через защитную оболочку [14, 15] и при распаде инициирует нитрование. Таким образом, нитрование может служить основным механизмом, вызывающим и опреде-

ляющим дезинфицирующее действие импульсного излучения горячей плазмы.

Заключение

Проведенное исследование показало, что жизнеспособность спор под действием импульсного излучения горячей плазмы снижается. Излучение УФ-лампы ДКБ-9 в изученных условиях практически не проникает через защитную оболочку споры. Спороцидный эффект излучения горячей плазмы обусловлен распадом долгоживущего комплекса ...ONOOH/ONOO⁻... с образованием оксида азота и иона нитрония в кислой среде.

Процесс нитрования играет решающую роль в спороцидном действии излучения горячей плазмы искрового разряда. Принцип спороцидного действия излучения газоразрядной плазмы, основанный на нитровании, может быть использован при разработке медицинских дезинфицирующих устройств.

Финансирование и конфликт интересов. Исследование не финансировалось никакими источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Nagababu E., Ramasamy S., Abernethy D.R., Rifkind J.M. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J Biol Chem* 2003; 278(47): 46349–46356, <https://doi.org/10.1074/jbc.m307572200>.
2. Piskarev I.M. Features of the impact of pulsed radiation of hot plasma on water and aqueous solutions. *Plasma Chem Plasma Process* 2021; 41(5): 1347–1361, <https://doi.org/10.1007/s11090-021-10188-1>.
3. Piskarev I.M., Ivanova I.P. Effect of spark electric discharge between solid electrodes in water. *Plasma Sources Sci Technol* 2019; 28(8): 085008, <https://doi.org/10.1088/1361-6595/aae35f>.
4. Piskarev I.M. Chemical transformation of aqueous solutions activated by remote plasma spark discharge in air, nitrogen or oxygen. *High Energy Chem* 2021; 55(2): 145–149, <https://doi.org/10.1134/s0018143921020119>.

5. Bruggeman P.J., Kushner M.J., Locke B.R., Gardeniers J.G.E., Graham W.G., Graves D.B., Hofman-Caris R.C.H.M., Maric D., Reid J.P., Ceriani E., Fernandez Rivas D., Foster J.E., Garrick S.C., Gorbanev Y., Hamaguchi S., Iza F., Jablonowski H., Klimova E., Kolb J., Krcma F., Lukes P., Machala Z., Marinov I., Mariotti D., Mededovic Thagard S., Minakata D., Neyts E.C., Pawlat J., Petrovic Z.L., Pflieger R., Reuter S., Schram D.C., Schröter S., Shiraiwa M., Tarabová B., Tsai P.A., Verlet J.R.R., von Woedtke T., Wilson K.R., Yasui K., Zvereva G. Plasma-liquid interactions: a review and roadmap. *Plasma Sources Sci Technol* 2016; 25(5): 053002, <https://doi.org/10.1088/0963-0252/25/5/053002>.
6. Warren J.J., Winkler J.R., Gray H.B. Redox properties of tyrosine and related molecules. *FEBS Lett* 2012; 586(5): 596–602, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.014>.
7. De Filippis V., Frasson R., Fontana A. 3-nitrotyrosine as a spectroscopic probe for investigating protein-protein interactions. *Protein Sci* 2006; 15(5): 976–986, <https://doi.org/10.1110/ps.051957006>.
8. Gopi A., Gupta A., Devaraju K.S. Spectrophotometric estimation of nitro tyrosine by azo-coupling reaction. *Int J Pharma Bio Sci* 2014; 5(1): 269–277.
9. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol* 2018; 14: 618–625, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009>.
10. Piskarev I.M. The formation of ozone-hydroxyl mixture in corona discharge and lifetime of hydroxyl radicals. *IEEE Trans Plasma Sci* 2019; 49(4): 1363–1372, <https://doi.org/10.1109/tps.2021.3064785>.
11. *Handbook of chemistry and physics*. 97th edition. Haynes W.M. (editor). Boca Raton, London, New York: CRC Press; 2016–2017.
12. Luo Y.R. *Handbook of bond dissociation energies in organic compounds*. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press; 2003.
13. Chandra A.K., Uchimaru T. The O-H bond dissociation energies of substituted phenols and proton affinities of substituted phenoxide ions: a DFT study. *Int J Mol Sci* 2002; 3(4): 407–422, <https://doi.org/10.3390/i3040407>.
14. Лобачев В.Л., Рудаков Е.С. Химия пероксинитрита. Кинетика и механизмы реакций. *Успехи химии* 2006; 75(5): 422–440.
Lobachev V.L., Rudakov E.S. The chemistry of peroxynitrite. Reaction mechanisms and kinetics. *Uspehi himii* 2006; 75(5): 422–440.
15. Пискарев И.М., Астафьева К.А., Иванова И.П. Воздействие импульсного излучения плазмы ультрафиолетового диапазона на жидкость через кожу крысы. *Биофизика* 2017; 62(4): 674–680.
Piskarev I.M., Astaf'eva K.A., Ivanova I.P. Effect of pulse plasma radiation in the ultra-violet range on liquid through the skin of the rat. *Biofizika* 2017; 62(4): 674–680.