

МЕХАНИЗМ ГИБЕЛИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ

С. А. ТОНОЯН, Р. А. САГАТЕЛЯН, Г. М. АВАКЯН, Ц. М. АВАКЯН,
А. В. АРАКЕЛЯН, Н. А. ДЖАНПОЛАДЯН, Н. В. СИМОНЯН, Л. Г. СТЕПАНИАН

Ереванский физический институт ГКАЭ, Ереван
Ереванское производственное объединение «Молоко».

Показано, что логарифм выживаемости бактерий *E. coli* K-12 при воздействии сильного электрического поля линейным образом зависит от длительности прямоугольного электрического импульса и согласуется с теоретической кривой. Гибель клеток бактерий является следствием появления в липидном матриксе мембраны дефекта типа инвертированной поры. Оценен коэффициент линейного натяжения кромки поры.

Исследован эффект сильного электрического поля на выживаемость бактерий *E. coli* K-12. Показано, что логарифм выживаемости клеток бактерий линейно зависит от длительности прямоугольного электрического импульса и согласуется с теоретической кривой. Гибель клеток бактерий является следствием появления в липидном матриксе мембраны дефекта типа инвертированной поры. Оценен коэффициент линейного натяжения кромки поры.

The effect of strong electric field on the survival of *E. coli* K-12 cells has been investigated. The linear relationship of logarithm of survival versus the longevity of electric pulse has been shown, thus confirming the theoretical curve. The death of bacterial cells is caused by development of the "inverted pore" type defect in the lipid matrix of membrane under the electric field. The linear tension coefficient of pore edge has been estimated.

Электрический пробой—бактерии *E. coli*—выживаемость

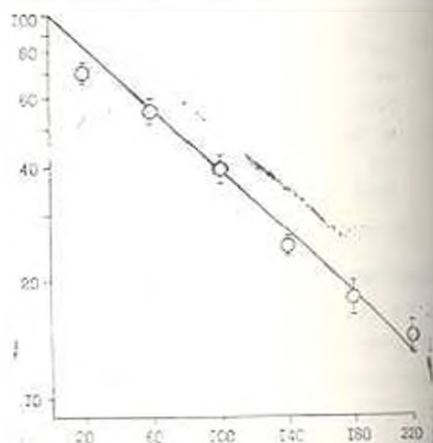
Известно, что кратковременное наложение сильного электрического поля на суспензию микроорганизмов приводит к их гибели [8—12]. Хотя считают, что гибель клеток в электрическом поле связана с электрическим пробоем мембран, однако детальный механизм гибели не исследован. Существует точка зрения, согласно которой гибель клеток наступает в результате развития после обратимого электрического пробоя клеточных мембран вторичных осмотических процессов. В данной работе нами показано, что в основе гибели микроорганизмов в электрическом поле и электрического пробоя плоских бислойных мембран лежит один и тот же общий механизм, а именно появление в липидном бислое в электрическом поле надкритического дефекта типа инвертированной поры.

Материал и методика. В работе использовали клетки бактерий *E. coli* K-12 штамма АВ1157 «дикого» типа из коллекции ЛИЯФ АН СССР. Бактериальные культуры выращивали в жидком питательном бульоне в течение 18 ч при 37° до стационарной фазы роста (2—3 · 10⁹ клеток в 1 мл). Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000 g) и ресуспендировали в жидкую питательную среду. Разведения клеточной суспензии для опыта готовили таким образом, чтобы исходя из концентра-

нии клеток, подвергавших воздействию электрического поля, была равна примерно $1-2 \cdot 10^6$ кл/мл. Для электрообработки был специально сконструирован генератор прямоугольных импульсов. Принцип работы генератора основан на накоплении энергии в конденсаторе с последующим быстрым ее разрядом. Коммутация осуществляется двумя мощными высоковольтными тиристорами. Один из них включен последовательно с ячейкой и при открывании формирует передний фронт импульса. Второй, открываясь, шунтирует первый тиристор вместе с ячейкой и тем самым формирует задний фронт импульса. Включение тиристов в нужный момент времени обеспечивается блоком управления, собранным на микросхемах. Генератор позволяет получать регулируемые амплитуду ($0,4 \div 1,6$ кВ) и длительность ($10 \div 220$ мкс) импульсов. Амплитуду и форму импульса контролировали с помощью запоминающего осциллографа. Суспензию обрабатывали в плексигласовой ячейке с электродами из нержавеющей стали, расположенными на расстоянии 1 мм. Объем ячейки составлял 0,1 мл. Число клеток, сохранявших жизнеспособность после обработки в рабочей ячейке высосавшего прибора, определяли подсчетом макроколоний, вырастающих на твердой питательной среде. Подсчет макроколоний проводили через сутки инкубации клеток при температуре 37° . В течение этого времени успевали сформироваться колонии из всех неповрежденных клеток.

Результаты и обсуждение. Для выяснения механизма гибели микроорганизмов под действием сильного электрического поля была исследована зависимость выживаемости клеток от длительности импульса. Амплитуда импульса (16 кВ/см) была подобрана таким образом, чтобы в широком интервале изменения длительности импульса (от 40 мкс до 220 мкс) иметь достаточно сильный эффект [11]. На рис. представлены экспериментальные точки этой зависимости. Видно, что точки хо-

Зависимость выживаемости клеток *E. coli* от длительности импульса. По оси абсцисс — длительность импульса (мкс), по оси ординат — выживаемость (%).



рошо ложатся на прямую. Отметим, что аналогичная зависимость получена также в работах [11, 12]. Для объяснения кривой на рис. будем исходить из детально разработанной теории электрического пробоя плоских бислойных мембран [1]. В первом приближении бактериальную клетку аппроксимируем сферической клеткой с радиусом r . Если поместить такую клетку во внешнее поле с напряженностью E , то потенциал на мембране будет иметь вид $\varphi = 1,5 E \cdot r \cos \theta$ [13], где θ — угол между направлением поля и нормалью к выбранному участку мембраны. Учитывая то обстоятельство, что толщина мембраны $\sim 100 \text{ \AA}$, т. е. намного меньше, чем радиус клетки ($r = 0,44 \text{ мкм}$) [2], а также то, что дефекты, приводящие к резкому уменьшению сопротивления мем-

браны, имеют размеры порядка толщины мембраны, можно считать плоским участок мембраны, где реализуется максимальное напряжение. Заметим, что максимальное напряжение падает на передний и задний участки (по отношению к вектору E) мембраны клетки и эти напряжения равны по величине. Если происходит пробой мембраны одного из участков, то все напряжение немедленно падает на второй участок, что приводит к пробоем мембраны также второго участка. Так что практически одновременно происходит пробой переднего и заднего участков мембраны клетки. Появление поры на любом из участков, где реализуется максимальное напряжение, можно описать формулами, полученными для плоских слоев. Отметим, что мембраны сферических замкнутых клеток, которые находятся в изотонических условиях, находятся в ненапряженном состоянии. Для достаточно больших клеток, имеющих размеры ~ 1 мкм, упругая энергия весьма мала и ее вкладом в свободную энергию порообразования можно пренебречь [3]. Принимая это во внимание и считая, что электрический ток через пору мал, можно, основываясь на результатах работы [1], получить следующее выражение для среднего времени жизни мембраны при потенциале

$$\tau = \frac{kT^{3/2}}{4\pi nD\gamma (0.5 C \varphi^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{\pi\gamma^2}{0.5 C \varphi - kT}\right). \quad (1)$$

Здесь k — постоянная Больцмана; T — температура; n — среднее число дефектов на участке мембраны; D — коэффициент диффузии дефектов; $C = C_0 \left(\frac{\epsilon_m}{\epsilon_{\text{см}}} - 1 \right)$, C_0 — удельная емкость мембраны; ϵ_m , $\epsilon_{\text{см}}$ — диэлектрические проницаемости раствора и мембраны соответственно; γ — линейное натяжение кромки поры. Для критического радиуса дефекта (r_*) и высоты энергетического барьера (Φ_*) имеем

$$r_* = \frac{\gamma}{0.5 C \varphi^2}, \quad \Phi_* = \frac{\pi\gamma^2}{0.5 C \varphi^2}. \quad (2)$$

Из (2) видно, что при $\varphi \rightarrow 0$ бесконечно увеличиваются r_* и Φ_* . Это означает, что появление дефектов критических размеров на мембране, на которой $\varphi = 0$, маловероятно. Формулы (2) показывают также резкую зависимость критических величин r_* и Φ_* от потенциала. Это важное обстоятельство может сыграть существенную роль при заживлении пор. При появлении на мембране дефекта критического размера уменьшается φ в области поры, а это в свою очередь приводит к резкому увеличению как r_* , так и Φ_* . Таким образом надкритическая пора может оказаться (после некоторого уменьшения φ) подкритической, т. е. фактически произойдет заживление пор [4]. Исходя из указанных обстоятельств, мы можем описать процесс кратковременной потери барьерной функции клеточной мембраны под действием электрического поля. Анализ литературы, проведенный в работе [8], показал, что лизис клетки в электрическом поле может быть «результатом временного (обратимого) увеличения проницаемости мембран». Вероятность пробоа участка мембраны за время t равна [1]

$$F(t) = 1 - \exp(-t/\tau), \quad (3)$$

где τ — задается формулой (1). Если имеем суспензию, в которой имеется N_0 — число клеток микроорганизмов, то, используя (3), можно показать, что число пробитых клеток N равно

$$N = N_0(1 - \exp(-t/\tau)). \quad (4)$$

Из (4) следует, что зависимость логарифма процента выживших клеток (т. е. $\ln\left(\frac{N_0 - N}{N_0} \cdot 100\%\right)$) от длительности импульса электрического

поля t должна быть линейной. Именно такая линейная зависимость и наблюдается в эксперименте (рис. 1, а также [11, 12]). Отметим, что тангенс угла наклона на рис. 1 есть τ^{-1} . Это позволяет оценить такой важный параметр устойчивости биологических мембран, как коэффициент линейного натяжения кромки поры γ . Примем, что $T = 300^\circ\text{K}$, $C_0 = 1$ мкф/см² [5], $\varphi = \varphi_{\text{max}} = 1,5$, $E \cos \theta \sim 1$ В ($r = 0,44$ мкм, $\theta = 0$). Поскольку величина pD для биологических мембран неизвестна, для оценок возьмем соответствующее значение $pD = 10^{-13}$ см²/с [6] для биосов. (Заметим, что если среднее число дефектов на мембране $p = 1$, то это означает, что коэффициент диффузии дефектов $D \sim 10^{-13}$ см²/с. Если же $D \sim 10^{-8}$ см²/с, то мембрана фактически бездефектна). Взяв экспериментальное значение τ^{-1} из рис. 1 и подставив соответствующие значения величин T , k , pD , C_0 в формулу (1), можно получить уравнение относительно γ . Численное решение этого уравнения дает значение $\gamma \approx 1,55 \cdot 10^{-11}$ Н. Эта величина хорошо вписывается в экспериментально определяемый диапазон значений γ для модельных биологов [7].

Таким образом, с одной стороны, то обстоятельство, что в экспериментах по исследованию гибели клеток бактерий в электрическом поле реализуется предсказанная теорией линейная зависимость выживаемости от длительности импульса, а с другой стороны, найденное значение γ , близкое к коэффициенту линейного натяжения биологов, указывает на то, что гибель клеток в электрическом поле связана с образованием на липидных участках их мембран надкритических дефектов типа инвертированных пор.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ариксаян И. Б. Канд. дисс., М., 1981.
2. Черномордик Л. В. Успехи современной биологии, 99, 67—80, 1985.
3. Пастушенко В. Ф. Биофизика, 28, 1036—1039, 1983.
4. Пастушенко В. Ф., Черномордик Л. В. В кн.: Биомембраны. 278—294, Рига, 1981.
5. Адамс В. В кн. Мембраны. 129—236, М., 1981.
6. Чизмаджев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф., Абидор И. Г. В кн.: Нто гтн науки и техники, Биофизика мембран, 2, 161—266, М., 1982.
7. Черномордик Л. В., Меликян Г. Б., Чизмаджев Ю. А. Биол. мембраны, 4, 117—161, 1987.

Постулило 10.VIII 1989г.