

УДК 579.234:579.23'314:533.9

ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ *E. coli*

© 2013 г. Е. Н. Кобзев*, Г. В. Киреев*, Ю. А. Ракицкий*, И. И. Марговецкая*, В. А. Чугунов*, В. П. Холоденко*, М. В. Храмов*, Ю. С. Акишев**, Н. И. Трушкин**, М. Е. Грушин**

* Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Московская обл., 142279, e-mail: kobzev_e@mail.ru

** Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований, г. Троицк, Московская обл., 142190, e-mail: akishev@triniti.ru

Поступила в редакцию 16.04.2012 г.

Исследовано воздействие холодной плазмы на микробные клетки *E. coli*. Показано, что при обработке холодной плазмой клеток *E. coli* происходило частичное либо полное нарушение целостности цитоплазматической мембраны (ЦПМ) клеток, что сопровождалось выходом внутриклеточных соединений во внеклеточную среду. Количественная оценка степени повреждения клеточной мембраны показала, что для гибели клеток достаточно потери не более 23.6% внутриклеточных соединений (рассчитано по доле выхода внутриклеточных нуклеотидов). Использование сред с различной ионной силой для создания осмотического шока показало, что обработка клеток *E. coli* холодной плазмой приводила к значительному снижению прочности их клеточной стенки.

DOI: 10.7868/S0555109913020074

Первые результаты исследований низкотемпературной (“холодной”) плазмы в области биомедицины позволяют предполагать, что плазменные технологии станут новым альтернативным способом борьбы с условно-патогенными и патогенными микроорганизмами (в том числе обладающими множественной лекарственной устойчивостью), которая представляет сейчас серьезную проблему для здравоохранения. Особенность низкотемпературной плазмы заключается в том, что в ходе плазменной обработки образуется широкий спектр активных агентов (заряженные частицы, свободные радикалы, активные формы кислорода и азота, ультрафиолет и т.д.), которые эффективно инактивируют различные виды микроорганизмов [1–2].

Однако несмотря на некоторый прогресс, достигнутый в испытаниях лабораторного масштаба, использование холодной плазмы для дезинфекции и стерилизации пока еще не получило широкого практического применения. Это связано, прежде всего, с недостаточной разработанностью научных и технических основ нового метода плазменной стерилизации. В частности, отсутствие ясного понимания механизмов инактивации микроорганизмов холодной плазмой затрудняет формулировку требований со стороны микробиологов к эффективным источникам плазмы.

В настоящее время выдвинуто несколько возможных моделей гибели клеток микроорганизмов под воздействием холодной плазмы. Моисан [3] предположил, что наиболее важную роль в инактивации микроорганизмов в условиях плаз-

мы низкого давления (вакуум) играет ультрафиолетовый свет (УФ), при этом инактивация, по его мнению, сопровождается эрозией и фотодесорбцией атомов микробных клеток. Однако, по мнению большинства исследователей, подобная модель не применима для холодной плазмы при атмосферном давлении, где УФ активно рассеивается молекулами воздуха [4].

Монти [5] была выдвинута гипотеза о том, что гибель микроорганизмов обусловлена тремя основными процессами: 1) перекисное окисление липидов мембраны гидроксильными радикалами, 2) инактивация белков вследствие окисления аминокислот; 3) окисление ДНК в результате взаимодействия с радикалами кислорода. Экспериментальное подтверждение или опровержение данного предположения до сих пор не получено. В то же время, в соответствии с данными работ [5–6], обработка клеток *E. coli* плазмой в течение 10–30 с приводила к нарушению целостности их мембраны и сопровождалась выходом внутриклеточного содержимого. При более длительных экспозициях наблюдалось полное разрушение клеток, что регистрировалось с помощью электронной микроскопии. Однако полной ясности в данном вопросе нет.

Цель работы — изучение повреждения цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и клеточной стенки *E. coli* низкотемпературной плазмой.

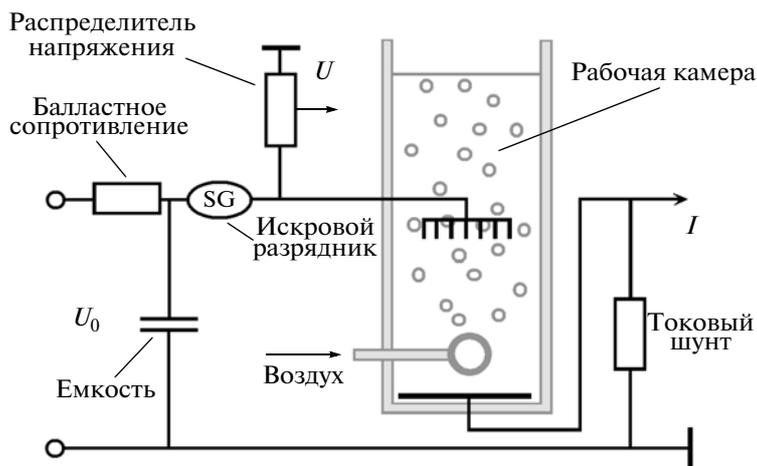


Рис. 1. Схема разрядного устройства для создания холодной плазмы в газовых пузырьках хорошо проводящей жидкости.

МЕТОДИКА

Культивирование микроорганизмов. Объектом исследований служил штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 #2393, полученный из коллекции ГНЦ ПМБ. В качестве основной питательной среды использовали гидролизат рыбно-костной муки («ГРМ-бульон» и «агаризованная среда ГРМ-1», производство ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Для экспериментов культуру выращивали на чашках с ГРМ-агаром при 37°C в течение 18 ч, после чего культуру смывали физиологическим раствором (ФР). Полученной суспензией инокулировали ГРМ-бульон и культивировали на качалке при 200 об/мин в течение 4 ч при 37°C . Перед обработкой холодной плазмой суспензию клеток разбавляли ФР до конечного титра 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Полученную рабочую суспензию микроорганизмов помещали в камеру генератора плазмы. В ходе обработки через определенные промежутки времени из рабочей камеры отбирали пробы суспензии и определяли в них количество живых микроорганизмов стандартным методом высева из десятикратных разведений на чашки Петри с ГРМ-агаром.

Характеристика газоразрядной системы, создающей холодную плазму в жидкости. В экспериментах была использована система [7], в которой импульсная плазма создавалась в газовых пузырьках, подаваемых в жидкость. Общая схема газоразрядной системы приведена на рис. 1. Жидкость объемом 300 мл заливалась в стеклянную трубу с внутренним диаметром 50 мм и высотой 500 мм. Объемный расход воздуха, используемого для создания газовых пузырьков, варьировался в пределах 20–120 мл/с. Секционированная электродная система состояла из 13 тонких штырей диаметром 1 мм, равномерно (через 3.5 мм) разнесенных друг от друга. Каждый штырь был нагру-

жен на индивидуальное балластное сопротивление, равное 1 МОм. Несекционированный электрод располагался на расстоянии 10–15 мм от кончиков штырей. Для поддержания разряда использовалось напряжение от высоковольтного источника амплитудой до 30 кВ, направление электрического тока было параллельно трубке, подающей воздух. Характерная мощность, вводимая газовым разрядом в пузырьки, составляла 30–90 Вт.

Оценка повреждения цитоплазматической мембраны. Методика основана на измерении выхода внутриклеточных соединений (преимущественно нуклеотидов) из клетки после нарушения барьерной функции цитоплазматической мембраны при воздействии на бактериальные клетки активных частиц холодной плазмы [5]. Для оценки повреждения цитоплазматической мембраны суспензию клеток *E. coli* обрабатывали плазмой в течение определенного времени (1–10 мин). Затем в обработанных и контрольных пробах определяли численность микроорганизмов методом высева на агаризованную среду ГРМ из десятикратных разведений. В оставшихся после высева пробах осаждали клетки на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) при 5000 g в течение 20 мин. После этого в супернатантах проб проводили измерение оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Япония) при 260 нм.

Степень повреждения ЦПМ клеток, обработанных плазмой, рассчитывали в соответствии с формулой:

$$\text{Степень повреждения} = \frac{(\text{ОП}_{\text{эксп}} - \text{ОП}_{\text{конт}})}{\text{ОП}_{\text{макс}}} \times 100\%, \text{ где}$$

$\text{ОП}_{\text{эксп}}$ – оптическая плотность супернатанта после обработки клеток холодной плазмой.

$ОП_{\text{конт}}$ — оптическая плотность супернатанта в контрольном образце без обработки холодной плазмой.

$ОП_{\text{макс}}$ — для определения максимальной оптической плотности (максимальное количество внутриклеточных соединений, поглощающих при 260 нм), клетки подвергали такому воздействию повреждающего фактора, при котором барьерная функция клеточной мембраны полностью нарушалась, в результате чего весь пул внутриклеточных соединений выходил из клетки в окружающую среду. Для этого клеточную суспензию подвергали тепловому шоку при 70°C в течение 20 мин на водяной бане. После этого в пробе осаждали клетки на центрифуге (5000 g в течение 20 мин при 4°C) и измеряли ОП в супернатанте при 260 нм, как описано выше.

Оценка снижения прочности клеточной стенки.

Разработанный нами метод оценки прочности клеточной стенки после воздействия холодной плазмы основан на том, что снижение осмотического давления среды приводит к увеличению тургора клеток. Поскольку тургор обуславливается тремя факторами: 1) внутренним осмотическим давлением клетки, которое вызывает напряжение клеточной стенки, 2) внешним осмотическим давлением, 3) упругостью клеточной стенки, то снижение внешнего осмотического давления приводит к избыточному давлению на клеточную стенку. В свою очередь, осмотическое давление раствора (π) равно:

$$\pi = iCRT,$$

где i — изотонический коэффициент раствора; C — молярная концентрация раствора; R — универсальная газовая постоянная ($8.31441 \pm \pm 0.00026$ Дж моль⁻¹ К⁻¹); T — термодинамическая температура раствора.

Если пренебречь незначительным изменением изотонического коэффициента в ходе разбавления, то изменение осмотического давления ($\Delta\pi$) при постоянной температуре раствора равно:

$$\Delta\pi = C_{\text{кон}}/C_{\text{исх}},$$

где $C_{\text{кон}}$ и $C_{\text{исх}}$ — конечная и исходная молярные концентрации раствора соответственно.

Таким образом, путем разбавления суспензии микроорганизмов дистиллированной водой можно снижать осмотическое давление среды и увеличивать давление на клеточную стенку. Если клеточная стенка при этом повреждена, то снижение внешнего осмотического давления среды может привести к ее разрыву и гибели клетки. Поэтому в ходе оценки снижения прочности клеточной стенки, образцы клеточной суспензии помещали в среду с гипотоническим осмотическим давлением. Для этого клеточную суспензию обрабатывали плазмой в течение определенного вре-

мени (1–10 мин). Затем суспензию из каждой экспозиции делили на три пробы. В первую пробу вносили ФР в соотношении 1 мл суспензии + 9 мл ФР (изотоническая проба). Во вторую пробу вносили дистиллированную воду в соотношении 1 мл суспензии + 9 мл дистиллированной воды (гипотоническая проба 1/10). В третью пробу вносили дистиллированную воду в соотношении 0.1 мл суспензии + 9.9 мл дистиллированной воды (гипотоническая проба 1/100). Через 1 ч инкубирования при 37°C в каждой пробе определяли численность микроорганизмов методом посева на агаризованные среды из десятикратных разведений. Также в исследуемых пробах измеряли количество свободных нуклеотидов в супернатантах методом, описанным выше. В ходе анализа полученных данных учитывали разбавление, которое возникало при снижении осмотического давления среды в варианте гипотоническая проба 1/100.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Энергия, выделяемая одной активной частицей холодной плазмы при взаимодействии с молекулами, составляет в среднем 5 эВ [1]. При этом энергии разрыва химических связей в органических молекулах имеют близкие значения: от 2.7 эВ (энергия разрыва связи C—C) до 6.8 эВ (для связи C=O в кетонах) [8]. Скорее всего активные частицы плазмы действуют на молекулярном уровне, разрушая либо трансформируя биомолекулы. Взаимодействие активных частиц с биомолекулами неспецифично и воздействию могут подвергнуться любые биополимеры — белки, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты. При этом, на наш взгляд, возможны следующие реакции: 1) разрыв связей в биомолекулах (в том числе, образование одно- и двунитевых разрывов в молекулах ДНК), 2) присоединение новых функциональных групп к биомолекулам (например, гидроксигирование, нитрирование), 3) образование межмолекулярных и внутримолекулярных сшивок. Любой из этих процессов носит вероятностный характер и может привести к изменению конформации и физико-химических свойств молекул, после чего молекулы уже не могут в полной мере выполнять свои функции.

На наш взгляд, клеточная стенка и ЦПМ первыми подвергаются воздействию активных частиц плазмы. И лишь после того как активные частицы прошли сквозь поврежденные клеточную стенку и мембрану, они могут инициировать повреждение ДНК и ключевых ферментов клетки.

Оценка степени повреждения ЦПМ клеток холодной плазмой. УФ с длиной волны 260 нм преимущественно поглощают нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, однако некоторый вклад в оптическую плотность также вносит присутствие в среде

аминокислот, белков и некоторых ароматических соединений [9]. Нас не интересовала природа соединений, поглощающих свет с длиной волны 260 нм, а изучалась динамика изменения оптической плотности при данной длине волны. В связи с этим увеличение оптической плотности супернатанта (при 260 нм) в ходе эксперимента интерпретировалось, как появление в среде различных внутриклеточных соединений (преимущественно нуклеотидов) вследствие частичного либо полного нарушения целостности ЦПМ.

В ходе исследований было отмечено, что обработка суспензии *E. coli* плазмой приводила к значительному увеличению количества внутриклеточных веществ в супернатанте по сравнению с контролем, не подвергавшихся обработке плазмой (рис. 2). Уже после 6 мин обработки плазмой в образцах не выявлялось наличие КОЕ, в то же время ОП супернатанта увеличивалась линейно на протяжении всего эксперимента, и достигала максимума к 10 мин обработки (0.323 ед. ОП). Наблюдаемое различие между динамикой инактивации микроорганизмов и динамикой увеличения ОП позволяет предположить, что даже частичное нарушение целостности ЦПМ приводило к гибели микроорганизмов. В связи с этим мы предприняли попытку оценить степень повреждения ЦПМ в ходе эксперимента.

Как мы уже отмечали, ОП обработанных плазмой образцов увеличивалась линейно на протяжении всего эксперимента. Предположительно, при больших экспозициях ОП будет замедляться и она должна стабилизироваться на определенном уровне, соответствующем максимальной концентрации внутриклеточных веществ в супернатанте. Однако в ходе наших экспериментов плато для ОП достигнуто не было, что свидетельствует о том, что процесс выхода внутриклеточных веществ из клеток продолжался, в том числе, и после гибели клеток. Экстраполяция полученных результатов позволила предположить, что данное плато может быть достигнуто к 25–30 мин обработки. Если учитывать, что уже после 6 мин обработки плазмой живые клетки не обнаруживались методом высева, то, по нашему мнению, при столь длительных экспозициях обработки клеток плазмой (25–30 мин) мы могли бы получить искаженные результаты за счет плазменной деструкции биополимеров. Поэтому для определения максимальной концентрации внутриклеточных веществ, определяемых при 260 нм, не обработанные плазмой клетки подвергали тепловому шоку при 70°C в течение 20 мин на водяной бане. Полученные данные по общему пулу внутриклеточных веществ (определяемых при 260 нм) в клетках исследуемой культуры *E. coli* позволили нам рассчитать степень повреждения ЦПМ в зависимости от времени обработки плазмой. В ходе эксперимента степень повреждения ЦПМ клеток *E. coli*, об-

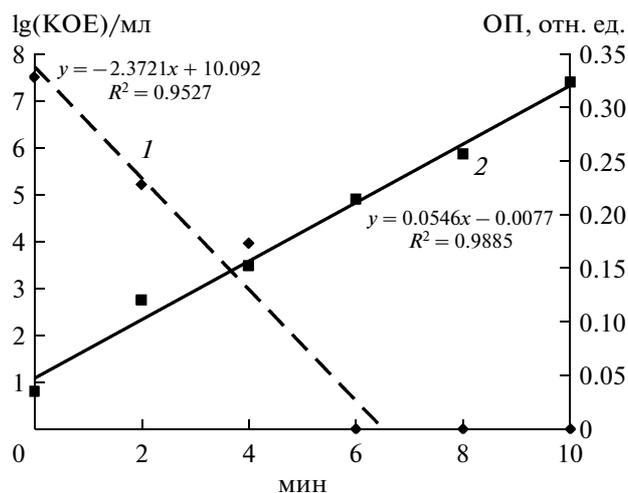


Рис. 2. Динамика выживаемости клеток *E. coli* (1) и оптическая плотность (2) супернатанта после обработки холодной плазмой.

работанных холодной плазмой, повышалась практически линейно с 0% в контроле (без обработки) до 11.2% после 2 мин обработки, 15.4% после 4 мин, 23.6% — 6 мин, 29.1% — 8 мин, достигая максимума в 37.9% к 10 мин.

В нашем случае, степень повреждения ЦПМ отражала долю внутриклеточных веществ (преимущественно нуклеотидов), оказавшихся во внеклеточной среде вследствие частичного либо полного нарушения барьерной функции ЦПМ. Поскольку уже после 6 мин обработки плазмой живые клетки в пробах отсутствовали, можно предположить, что для гибели клеток достаточно потери не более 23.6% внутриклеточных веществ. Скорее всего, эта величина должна быть значительно меньше 23.6%, поскольку в ходе наших экспериментов учитывались одновременно и частичное повреждение ЦПМ (когда только часть содержимого клетки выходило в среду), и полное повреждение ЦПМ (когда выходило все содержимое клетки). Используемый нами подход не позволял разделить вклад частичного и полного повреждения ЦПМ в процесс инактивации микроорганизмов.

Оценка воздействия плазмы на прочность клеточной стенки/мембраны. Анализ данных, полученных нами ранее, показал, что эффективность инактивации микроорганизмов активными частицами холодной плазмой во многом зависит от таксономического положения микроорганизмов [7]. Так, в ходе обработки плазмой исследуемых культур, нанесенных на поверхность агаризованных сред, было обнаружено, что грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens* и *E. coli* оказались более чувствительными к обработке, чем вегетативные формы грамположительных культур *B. subtilis* и *Mycobacterium flavescens*. Поскольку одним из

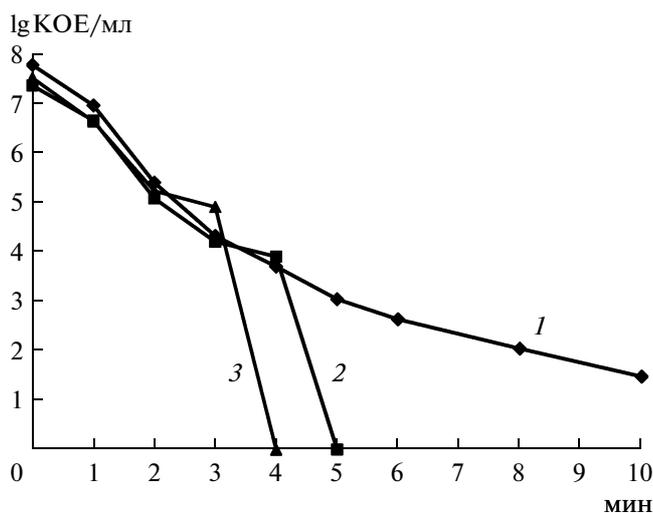


Рис. 3. Численность клеток *E. coli*, помещенных после обработки холодной плазмой в среды с разным осмотическим давлением:

1 – изотоническая среда, 2 – гипотоническая среда 1/10; 3 – гипотоническая среда 1/100.

наиболее ярко выраженных отличий грамположительных и грамотрицательных бактерий является строение клеточной стенки, то можно предположить, что инактивация микроорганизмов плазмой, прежде всего, связана с воздействием на клеточную стенку микроорганизмов, которая принимает первый удар активных частиц плазмы. Очевидно, что многослойная клеточная стенка грамположительных бактерий обладает, по сравнению с более тонкой клеточной стенкой грамотрицательных бактерий, более выраженным защитным действием и тормозит проникновение активных частиц в цитоплазму. С другой стороны, и сама клеточная стенка, скорее всего, повреждается частицами плазмы, что, в свою очередь, может приводить либо к нарушению ее целостности и гибели клетки, либо к нарушению процесса роста и деления клетки. И в том и в другом случае многослойная клеточная стенка грамположительных микроорганизмов обуславливает их заметно большую устойчивость к воздействию активных частиц плазмы, по сравнению с грамотрицательными микроорганизмами.

На наш взгляд, в любом случае при воздействии активных частиц плазмы на клеточную стенку должна снижаться ее прочность. Для проверки данного предположения был проведен ряд экспериментов, в ходе которых образцы клеточной суспензии *E. coli* после обработки плазмой при различных экспозициях помещали в среды с пониженным (гипотоническим) осмотическим давлением на 1 ч.

Анализ результатов посева на агаризованную среду ГРМ обработанных таким образом клеток

показал плавное снижение численности клеток микроорганизмов в изотонических условиях (рис. 3, 1). После 10 мин обработки плазмой численность микроорганизмов снизилась с 6.0×10^7 до 3.0×10^1 КОЕ/мл.

В то же время, в случае, когда после обработки плазмой клетки помещали в гипотоническую среду со сниженной в 10 раз концентрацией солей, наблюдалась несколько другая картина (рис. 3, 2). При экспозиции до 4 мин численность микроорганизмов в вариантах “изотоническая среда” и “гипотоническая среда 1/10” снижалась практически одинаково. Однако после 4 мин обработки плазмой выживаемость в гипотонической среде (1/10) резко снижалась, и к 5 мин в этой среде живые клетки не обнаруживались. Сходная тенденция была отмечена и для гипотонической среды “1/100” (рис. 3, 3). В связи с этим мы предположили, что поврежденные воздействием активных частиц плазмы клетки не смогли выжить в условиях увеличения внутриклеточного давления на клеточную стенку, которое, в свою очередь, повысилось из-за снижения осмотического давления внешней среды.

Подтверждением справедливости нашего предположения о том, что гибель микроорганизмов в гипотонической среде после обработки плазмой связана именно со снижением прочности клеточной стенки, являются следующие факты. Во-первых, кривые гибели микроорганизмов в первые 2 мин обработки плазмой для всех использованных сред были практически идентичны, то есть изменение осмотического давления практически не оказывало влияния на выживаемость микроорганизмов, обработанных плазмой в течение 2 мин (рис. 3). В то же время снижение осмотического давления в 10 раз (рис. 3, 2) приводило к увеличению процента гибели клеток после 4 мин обработки плазмой, а снижение осмотического давления в 100 раз (рис. 3, 3) приводило к увеличению гибели клеток уже после 3 мин обработки. Таким образом, выживаемость микроорганизмов в результате обработки плазмой зависела от того, в какую среду их помещали после обработки. Чем ниже было осмотическое давление среды, тем ниже была выживаемость *E. coli*.

Во-вторых, само по себе снижение осмотического давления среды не приводило к полной гибели исследуемой культуры, не обработанной плазмой, даже в случае инкубирования микроорганизмов в гипотонической среде в течение 1 сут и более (рис. 4). Так, за 1 сут инкубирования культуры *E. coli* в среде со сниженным в 100 раз осмотическим давлением (суспензия *E. coli* была разбавлена бидистиллированной водой в 100 раз) наблюдалось падение численности микроорганизмов в исследуемых образцах всего на 1.5 порядка (с 3.0×10^5 до $6.1-10.0 \times 10^3$ КОЕ/мл). При этом интенсивное пе-

ремешивание в ходе инкубирования на качалке при 200 об/мин оказывало лишь незначительное влияние на динамику численности бактерий. В дальнейшем, численность микроорганизмов в ходе инкубации только повышалась, достигнув к 6 сут значения $4.0\text{--}4.5 \times 10^4$ КОЕ/мл. Таким образом, снижение осмотического давления среды само по себе не приводило к быстрой и полной гибели исследуемой культуры. В то же время снижение прочности клеточной стенки после обработки плазмой могло интенсифицировать процесс гибели клеток, помещенных после обработки в гипотоническую среду.

В ходе изучения динамики прочности клеточной стенки *E. coli* мы также оценивали влияние осмотического давления среды, в которой были суспендированы клетки после обработки плазмой, на степень повреждения клеточной стенки микроорганизмов. Исследования показали, что ОП супернатантов при 260 нм в гипотонической среде была значительно выше оптической плотности супернатантов в изотонической среде (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении выхода внутриклеточных веществ из клеток в гипотонических условиях. Однако в отличие от данных, полученных для изотонических условий (рис. 2), какой-либо закономерности в распределении величин ОП в гипотонической среде выявлено не было. Кроме того, было отмечено довольно высокое значение ОП супернатанта в гипотонических условиях в контрольном варианте, который не подвергался обработке плазмой. На основании перечисленных фактов мы сделали вывод, что высокая оптическая плотность супернатантов в гипотонической среде связана не столько с нарушением целостности клеточной стенки плазмой, сколько с диффузией внутриклеточных веществ во внешнюю среду с пониженным осмотическим давлением. Это никоим образом не противоречит выдвинутой нами гипотезе, что обработка клеток *E. coli* холодной плазмой приводит к снижению прочности их клеточной стенки.

Таким образом, в ходе наших исследований было показано, что при обработке холодной плазмой клеток *E. coli* происходило частичное либо полное нарушение целостности ЦПМ. Количественная оценка степени повреждения клеточной

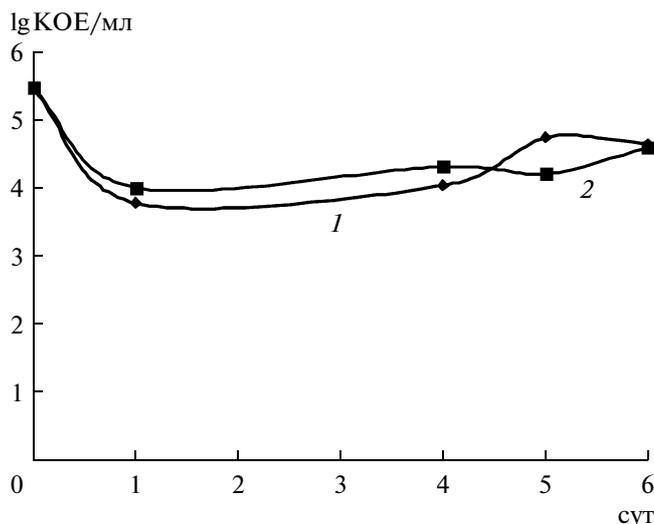


Рис. 4. Выживаемость клеток *E. coli* в гипотонической среде:

1 – на качалке, 2 – без перемешивания.

мембраны показала, что для гибели клеток достаточно потери не более 23.6% внутриклеточных веществ. Использование сред с различной ионной силой в ходе исследований позволило сделать вывод, что обработка микроорганизмов холодной плазмой также приводила к значительному снижению прочности их клеточной стенки.

Исследование механизма инактивации микроорганизмов холодной плазмой находится на начальном этапе. Ясное понимание этого явления позволит повысить эффективность плазменной стерилизации и тем самым ускорит широкое внедрение нового метода стерилизации. В свою очередь, широкое внедрение плазменных технологий может помочь в решении актуальных проблем в сфере биобезопасности и в других областях, где требуется быстрая и эффективная биодеконтаминация объектов.

Авторы выражают глубокую признательность С.А. Ермолаевой, руководителю лаборатории экологии возбудителей инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, за внимательное прочтение статьи и ряд важных критических замечаний.

Оптическая плотность супернатантов суспензий *E. coli*, обработанных плазмой и помещенных в среды с различным осмотическим давлением

Оптическая плотность супернатантов при 260 нм, отн. ед.	Время воздействия плазмы, мин					
	0	1	2	3	4	5
Изотоническая среда	0.55	0.60	0.61	0.66	0.72	0.70
Гипотоническая среда (1/10)	1.24	1.45	1.38	1.25	1.56	1.32

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора “Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Холоденко В.П., Акишев Ю.С., Кобзев Е.Н., Чугунов В.А., Жиркова Н.А., Ирхина И.А., Грушин М.Е., Каральник В.Б., Трушкин Н.И. // Химическая и биологическая безопасность. 2006. № 5 (29). С. 3–13.
2. Акишев Ю.С., Грушин М.Е., Каральник В.Б., Мониц А.Е., Панькин М.В., Трушкин Н.И., Холоденко В.П., Чугунов В.А., Жиркова Н.А., Ирхина И.А., Кобзев Е.Н. // Физика плазмы. 2006. Т. 32. № 12. С. 1142–1152.
3. Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L.H. // Int. J. Pharmaceut. 2001. V. 226. № 1–2. P. 1–21.
4. Laroussi M. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2002. V. 30. № 4. P. 1409–1415.
5. Montie T.C., Kelly-Wintenberg K., Roth J.R. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2000. V. 28. № 1. P. 41–50.
6. Laroussi M., Sayler G., Galscock B., McCurdy B., Pearce M., Bright N., Malott C. // IEEE Trans. Plasma Sci. 1999. V. 27. P. 34–35.
7. Akishev Yu., Grushin M., Karalnik V., Petryakov A., Trushkin N., Kholodenko V., Chugunov V., Irkhina I., Kobzev E., Zhirkova N., Kireev G. // Pure and Appl. Chem. 2008. V. 80. № 9. P. 1953–1969.
8. Зонис С.А. Справочник химика. Т. 1 / Ред. С.А. Зонис, Г.А. Симонов. М.: Химия, 1966, С. 902.
9. Glasel J. // Biotechniques. 1995. V. 18. № 1. P. 62–63.

Effect of Cold Plasma on the *E. coli* Cell Wall and Plasma Membrane

E. N. Kobzev^a, G. V. Kireev^a, Yu. A. Rakitskii^a, I. I. Martovetskaya^a, V. A. Chugunov^a, V. P. Kholodenko^a, M. V. Khramov^a, Yu. S. Akishev^b, N. I. Trushkin^b, and M. E. Grushin^b

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia
e-mail: kobzev_e@mail.ru

^b Troitsk Institute for Innovation and Thermonuclear Research, Troitsk, Moscow oblast, 142190 Russia
e-mail: akishev@triniti.ru

Received April 16, 2012

Abstract—The effect of cold plasma on *E. coli* cells was studied. It was shown that the treatment of *E. coli* cells with cold plasma caused partial or total disruption of the plasma membrane integrity, which was accompanied by a release of intracellular substances into the extracellular environment. A quantitative assessment of the extent of the damage to the cell membrane showed that a loss of no more than 23.6% of intracellular substances (calculated by the proportion of the intracellular nucleotide release) is sufficient to lead to cell death. The use of media with different ionic strength levels to create osmotic shock showed that the treatment of *E. coli* cells with cold plasma significantly decreased the cell wall strength.