

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՄՆԱՑԱԿԱՆՅԱՆ ՆԱՐԻՆԵ ՍԵԼԲԵՐՏԻ

ԿՈԼՈԻԴ ԱՐԾԱԹԻ ԵՎ ՆԱՆՈԿՈՄՊՈԶԻՏ ՖԻԼՏՐԵՐԻ ՀԱԿԱՄԱՆՐԷԱՅԻՆ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ՝ ԷՖԵԿՏՆԵՐԸ, ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ
ՄԵԽԱՆԻԻՋՄՆԵՐԸ ԵՎ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ

Գ.00.07 – «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2020

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

МНАЦАКАНЯН НАРИНЕ СЕЛБЕРТОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА И
НАНОКОМПОЗИТНЫХ ФИЛЬТРОВ: ЭФФЕКТЫ, МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ
И ПРИМЕНЕНИЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 - «Микробиология. биотехнология»

ЕРЕВАН 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ա. Հ. Թռչունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ. Գ. Հովհաննիսյան
կ.գ.դ. Կ. Օ. Հովնանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Հայաստանի ազգային ագրարային
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2020 թ. նոյեմբերի 27-ին ժամը 15⁰⁰ - ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ./ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2020թ. հոկտեմբերի 19-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.



Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель:

член-корреспондент НАН РА
д.б.н., профессор А. А. Трчунян

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Г. Г. Оганесян
д.б.н. К. О. Овнанян

Ведущая организация:

Национальный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 27 ноября 2020 г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА. г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./факс (374 10) 65 41 80:

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 19 октября 2020г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н.



Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Растущая устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам требует разработки альтернативных подходов. Для борьбы с бактериями, устойчивыми к антибиотикам, необходим активный поиск соединений с высокой биологической активностью, которые могли бы успешно конкурировать с антибиотиками и химиотерапевтическими средствами. В настоящее время перспективными считаются материалы наноразмеров [Assa et al., 2016]. Воздействие наночастиц (НЧ) на различные микроорганизмы привлекает большое внимание, поскольку они могут быть использованы в качестве альтернативы антибиотикам [Stankic et al., 2016; Wang et al., 2017; Trchounian et al., 2018]. НЧ могут проникать через мембраны в клетку, изменяя их функции, связываться с белками и нуклеиновыми кислотами [Seil & Webster, 2012; Arakha et al., 2015; Vardanyan et al., 2015].

Различные бактерии проявляют разную чувствительность к НЧ, что зависит от различных факторов, таких как структура, форма, размер НЧ, метод их синтеза, тип стабилизатора и т.д., которые могут приводить к различным эффектам [Lee et al., 2008; Chatterjee et al., 2011; Assa et al., 2016; Wang et al., 2017]. Способность различных металлических НЧ изменять метаболическую активность бактерий представляет собой ключевое преимущество для подавления бактерий при лечении различных заболеваний [Ficai et al., 2014; Wang et al., 2017]. Исследования показали, что НЧ некоторых тяжелых металлов проявляют антибактериальный эффект против различных Gr- и Gr+ бактерий [Seil & Webster, 2012; Vardanyan et al., 2015; Lu et al., 2017; Mnatsakanyan & Trchounian, 2018]. Металлические НЧ имеют также противогрибковое действие [Мнацаканян и Трчунян, 2017; Zhang et al., 2016]. Наиболее часто используемыми являются НЧ серебра (Ag), так как известно, что подавляющее действие Ag на бактерии сильнее, чем других металлов [Мнацаканян и Трчунян, 2016; Ruparelia et al., 2008; Zhou et al., 2012; Vardanyan et al., 2015]. Антибактериальные свойства НЧ проявляются также при воздействии на антибиотикорезистентные микроорганизмы [Ayala-Nunez et al., 2009]. Однако эти эффекты нуждаются в дальнейшем исследовании.

Относительно механизма воздействия Ag на микробную клетку нет единого мнения. Среди теорий, объясняющих механизм действия НЧ на микроорганизмы, наиболее распространенной является адсорбционная теория, согласно которой воздействие на клетку начинается с адсорбции НЧ на клеточной оболочке, после чего запускаются механизмы, приводящие к торможению деления клетки, что заканчивается ее гибелью [Choi et al., 2008; Gabrielyan and Trchounian, 2019]. Предполагается также их проникновение к клетку [Choi et al., 2008; Gabrielyan and Trchounian, 2019]. Таким образом механизмы действия НЧ Ag на микробную

клетку включают разные процессы, обеспечивающие выраженный антимикробный эффект.

По мере развития нанотехнологий области применения наноматериалов продолжают расширяться. В результате возникает необходимость различных исследований для понимания механизмов воздействия НЧ на живые клетки, изучения их воздействия на организм человека и на экосистему в целом, что позволит использовать НЧ более целенаправленно и с большей эффективностью, без нанесения вреда живым организмам.

Цели и задачи исследований. Целью данной работы было изучение антимикробных свойств коллоидного Ag по отношению к определенным микроорганизмам, изучение антимикробных свойств НЧ Ag в составе матриц, а также изучение молекулярно-клеточных механизмов антимикробного действия коллоидного Ag. Были поставлены следующие задачи:

1. Изучение антибактериальных и антигрибковых свойств разных концентраций коллоидного Ag на определенные микроорганизмы, а также на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) коллоидного Ag по отношению к данным микроорганизмам.

2. Изучение антимикробных свойств коллоидного Ag в составе молочного пищевого продукта - сметаны по отношению к дрожжевым и плесневым грибам, вызывающим порчу продукта, что даст основание рассматривать коллоидное Ag в качестве консерванта пищевых продуктов.

3. Изучение воздействия коллоидного Ag как в отдельности, так и в сочетании с DCCD (*N,N'*-дициклогексилкарбодиимид) на АТФазную активность мембран Гр+ и Гр- бактерий.

4. Получение нанокомпозитного фильтра из природного минерала туфа и НЧ Ag. Изучение антимикробной активности фильтра по отношению к Гр+ и Гр- бактериям, а также по отношению к смешанной культуре микроорганизмов.

Научно-практическая новизна и значение. Было подтверждено, что коллоидное Ag обладает выраженным антимикробным действием по отношению к различным Гр+ и Гр- бактериям. Показано, что антибиотикоустойчивые штаммы *E. coli*, проявляют чувствительность по отношению к коллоидному Ag, более того, было выяснено, что коллоидное Ag вызывает более выраженную задержку роста антибиотикоустойчивых микроорганизмов по сравнению с микроорганизмами, не имеющими устойчивости к антибиотикам (на 37,0% больше), что дает возможность рассматривать НЧ Ag в качестве альтернативного средства антибиотикам, а также в качестве средства для борьбы с бактериями, имеющими резистентность к антибиотикам.

Было показано, что НЧ Ag подавляют АТФазную активность мембран Гр+ и Гр- бактерий. Также было показано, что НЧ Ag в комбинации с DCCD вызывают

более сильное ингибирование АТФазной активности, чем каждая в отдельности, так ингибирующее действие 10 мг/л НЧ Ag на АТФазную активность мембран *E. faecalis* в присутствии DCCD усилилось на 86,2%, а ингибирующее действие 20 мг/л НЧ Ag в присутствии DCCD - на 90,9%. Предполагается, что в основе молекулярно-клеточных механизмов ингибирования АТФазной активности мембран, вызванное воздействием НЧ Ag, лежат конформационные изменения DCCD-чувствительной субъединицы «с» Fo комплекса.

Изучение антимикробных свойств НЧ Ag в составе сметаны, дало основание полагать, что его можно использовать в качестве консервирующего средства пищевых продуктов, с учетом количества суточного потребления. Было показано, что НЧ Ag вызывают уменьшение количества дрожжей в сметане на 73,5 %.

Внедрив НЧ Ag в матрицу бытового фильтра из минерала туфа, получили нанокompозитный фильтр, который имеет выраженную антибактериальную активность (97,09% по отношению к *E. coli*, 92,2% по отношению к *E. faecalis*).

Таким образом, было показано, что в составе различных матриц НЧ Ag сохраняют свои антибактериальные свойства, что позволяет его использовать в качестве средства для придания антибактериальных свойств различным материалам, тем самым расширяя область их применения.

Личный вклад соискателя. Собственный вклад включает решение основных задач исследований, поиск и анализ научной литературы по теме, выполнение экспериментальных работ, обобщение результатов исследований и оформление диссертации. Постановка основных задач и разработка методологии прорабатывались под руководством научного руководителя, д.б.н., проф. А.А. Трчуняна. Отдельные разделы исследований проводились совместно с к.б.н. Л.С. Габриелян, к.б.н. Н.Ж. Саакян и к.б.н. Д.Р. Согомонян.

Апробация работы. Результаты, вошедшие в работу, были доложены на 1-ой Южно-Кавказской пищевой аналитической конференции (Тбилиси, Грузия, 29-30 марта 2018 г.), Международной конференции по наноматериалам и нанотехнологиям (Вена, Австрия, 3-5 сентября 2018 г.), конгрессе Американского общества микробиологии ASM Microbe 2020 (22 июля – 22 августа 2020 г.). По теме диссертации опубликовано 6 статей, 3 тезиса и глава в книге.

Место выполнения работы. Работа выполнена в Ереванском государственном университете, Национальном политехническом университете Армении и в «ЭФ ДИ ЭИ Лаборатории» (Котайкский марз, Армения).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах, состоит из списка изложенных сокращений, введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 17 рисунков и 11 таблиц.

Глава 1. Литературный обзор

В литературном обзоре дается подробное описание НЧ тяжелых металлов, их классификация на основе физических, химических и морфологических свойств. Обсуждаются антибактериальные и противогрибковые свойства НЧ металлов и их возможные клеточные механизмы. Представлены сферы применения НЧ тяжелых металлов и наноматериалов. Указываются также предосторожности применения серебра.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Коллоидное серебро. В исследованиях было использовано коллоидное Ag, известное под торговым названием «Silverton» [ГОСТ Р 51577-2000; ГОСТ Р 51579-2000], полученного электрохимическим синтезом [Khaydarov et al., 2009].

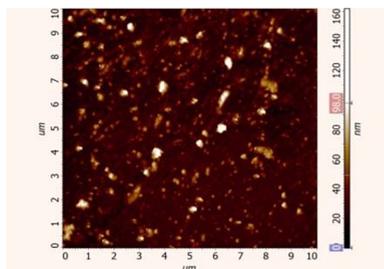


Рис. 1. Микроскопия коллоидного Ag полученного электрохимическим синтезом

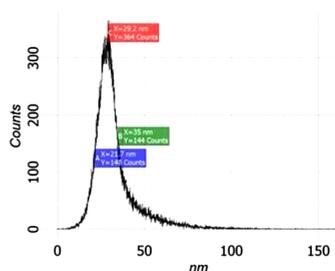


Рис. 2. Функция распределения НЧ по размерам.

Коллоидное Ag - это мелкие, размером от 1 нм до нескольких мкм частицы металлического Ag, диспергированные в жидкой среде и образующие коллоидный раствор Ag [Bhatia, 2016; Buzea and Pacheco, 2017]. Для определения размеров НЧ Ag в коллоидном растворе осуществили исследование атомно-силовым сканирующим микроскопом (NT-MDT Nanoeducator 2). Показано, что НЧ Ag не имеют строго определенной формы (Рис. 1). Размеры варьируют в пределах от 10 нм до 70 нм, средний размер НЧ составил $29,20 \pm 0,08$ нм (Рис. 2). Концентрацию коллоидного Ag определяли пламенным методом (ацетилен - воздух) с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра (Shimadzu серии AA-7000/ААС, Япония).

Микроорганизмы. В исследованиях использованы Г⁻ палочковидные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; Г⁺ кокковые бактерии *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (KWIK-STIK™, Microbiologics Inc., USA) и дрожжеподобный диморфный гриб *Candida albicans* (выделен из клинического материала). Также использовали две

антибиотикорезистентные тест культуры, *E. coli* pARG-25 (резистентен к канамицину) и *E. coli* DH5 α -pUC18 (резистентен к ампициллину).

Приготовление инокулята. Из суточной культуры тест микроорганизма готовили раствор мутностью 0,5 ед. MacFarland с оптической плотностью (ОП) от 0,08 до 0,13 при длине волны 625 нм, что соответствует 10⁸ КОЕ/мл [EUCAST 2015. Disk diffusion method]. Измерения осуществляли с помощью спектрофотометра (Spectro UV 18-PC, MRC, Israel). Далее из разведения 10⁸ КОЕ/мл получали разведение 10⁶ КОЕ/мл, что и использовали для инокулирования питательной среды.

Антимикробная активность коллоидного серебра. Для определения антимикробной активности разных концентраций коллоидного Ag (от 10 мг/л до 100 мг/л) применяли диск-диффузионный метод [Patel et al., 2014] и проверяли по отношению к тест-культурам. Диаметры зон подавления роста тест-культур измеряли с помощью штанген-циркуля [EUCAST 2014. Reading guide].

Определение АТФ-азной активности мембран бактерий. Для определения АТФазной активности мембран, бактериальные клетки сначала подвергали лизису для получения мембранных «пузырьков» или везикул [Konings & Kaback, 1973]. Затем определяли количество белков, содержащихся в мембранных пузырьках бактерий [Lowry et al., 1951]. После чего колориметрическим методом, предложенным Таускии и Шор [Soghomonyan et al., 2018] определили количество высвобожденного неорганического фосфата (Φ_H), которое образовывалось в результате реакции АТФ с мембранными белками, с помощью которого и вычисляли АТФ-азную активность, которую выразили в нМоль Φ_H /мин/мкг белка.

Консервирующие свойства коллоидного серебра. В эксперименте использовалась сметана местного производства. В качестве исследуемого показателя были выбраны дрожжевые и плесневые грибы. К сметане было добавлено коллоидное Ag, в результате чего количество НЧ Ag в сметане составило 10 мг/л или 20 мг/л. По 1 мл соответствующего разведения образца сразу же были посеяны в Sabouraud CAF агар в чашках Петри (начальная точка экспозиции). Через каждые два - три дня повторяли посев образцов. Чашки инкубировали при температуре 25 °С в течение 5-7 дней [ГОСТ ISO 6611-2013]. После инкубации подсчитывали КОЕ микроскопических грибов.

Приготовление нанокompозитного фильтра. Была разработана технология внедрения НЧ Ag в матрицу бытового фильтра, который изготовлен в соответствии с техническим регламентом (ТУ РА 23477755.1918-99 «Фильтр бытовой, для питьевой воды из природных пород») из туфа Ервандакертского месторождения в Армении, разрешенного для применения в практике хозяйственно-питьевого водоснабжения. Картриджи имеют гигиенический сертификат (Минздрав Республики Армения, № 72 от 22.09.99 г.), прошли сертификацию в НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.

Цыцина РАМН (ныне – РАН) (г. Москва, Россия) и получили Санитарно-эпидемиологическое заключение (РФ, № 77.99.10.234.Д.004597.06.04) о возможности применения фильтра для доочистки питьевой воды от повышенной мутности (65-88%), цветности (85%) и железа (70%).

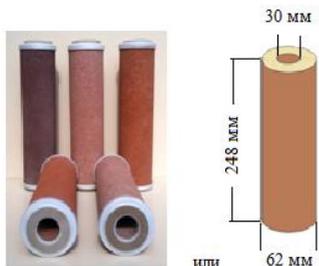


Рис. 3. Фильтр изготовленный из туфа: слева - фото, справа – схема от руки.

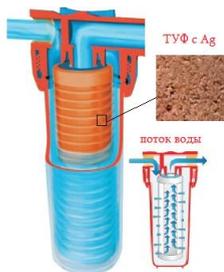


Рис. 4. Схематическое изображение направления потока воды в фильтре.

В исследовании использовали цилиндрические картриджи, имеющие высоту 248 мм, диаметр 62 мм, вес около 1,2 кг (Рис. 3). Площадь фильтрующей поверхности картриджа (S) составляет 482,806 см². Фильтр имеет упорядоченно структурированную пористость, и размер пор по мере продвижения к центру фильтрующего элемента уменьшается. В процессе фильтрации вода снаружи направляется внутрь (Рис. 4), в результате осуществляется механическая фильтрация. Но вместе с тем, туф является минералом, имеющий высокие сорбционные свойства [Cho et al., 1997; Lee et al., 2006], в результате чего фильтрация осуществляется также за счет сорбции вредных веществ, растворенных в воде. В результате добавления к фильтру НЧ Ag были получены нанокомпозитные фильтры, которые вместе с выше перечисленными фильтрующими свойствами, обладают ещё и высокой биологической активностью.

Фильтрация малых объемов воды. В лабораторных условиях была собрана фильтрационная система с установленным нанокомпозитным фильтром, через которую пропускали воду, загрязненную микроорганизмами, в частности *E. coli* и *E. faecalis*, с нагрузкой 100 КОЕ/мл. Далее по 1 мл воды до и после фильтрации проверяли на содержание микроорганизмов. На основе полученных результатов вычисляли степень бактерицидности нанокомпозитного фильтра по отношению к *E. coli* и *E. faecalis*.

Фильтрация больших объемов воды. Для изучения антимикробной активности нанокомпозитного фильтра по отношению к высокой концентрации смешанной культуры микроорганизмов, а также для изучения его фильтрующего ресурса

соорудили конструкцию (Рис. 5), которая позволяла осуществить фильтрацию больших объемов воды с большой микробиологической нагрузкой. Для этого контейнер ёмкостью в 3 т заполняли водой, загрязненной микроорганизмами (100 г почвы). На выходе контейнера воды смонтировали две разобценные трубы, на каждой из которых установили фильтрующие колбы с одинаковыми фильтрующими картриджами, одна из которых содержит НЧ Ag, другая - не содержит Ag.

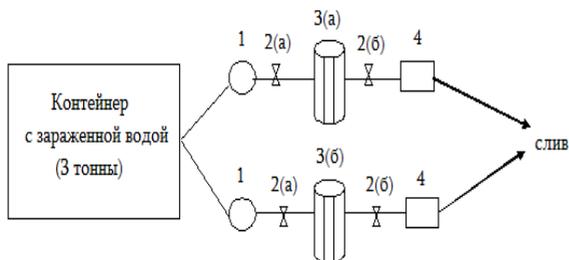


Рис. 5. Схема конструкции для фильтрации воды: 1- счётчик воды, 2- пробоботборники: 2(a)-до фильтрации, 2(б)- после фильтрации, 3- колбы с фильтрующими картриджами: 3(a)-фильтрующий картридж без Ag, 3(б)- фильтрующий картридж с Ag, 4- вакуумный насос.

Загрязненную воду одновременно прокачивали через оба фильтра: с Ag и без Ag. Прослеживая фильтруемый объём воды, отбирали пробы воды до и после фильтрации 100 л, 500 л и 1000 л воды. По 1 мл с каждой пробы глубоко сеяли в питательную среду (Nutrient agar). После инкубации подсчитывали количество КОЕ, вычисляли среднее значение.

Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение

3.1. Минимальная ингибирующая концентрация коллоидного серебра по отношению к определенным микроорганизмам.

Антибактериальные и антигрибковые свойства проявляются в виде зон задержки роста тест культур вокруг наложенных дисков, смоченных разными концентрациями коллоидного Ag, результаты измерений приведены на Рис. 6. Видно, что коллоидное Ag с концентрацией в 10 мг/л имело подавляющее воздействие лишь на *E. coli* и *P. aeruginosa*. У *S. aureus* и *E. faecalis* задержка роста проявляется, начиная с концентрации 20 мг/л, а у *C. albicans* – начиная с концентрации 40 мг/л. При сравнении зон задержки роста Гр+ и Гр- бактерий видно, что Гр- бактерии более чувствительны к воздействию НЧ Ag.

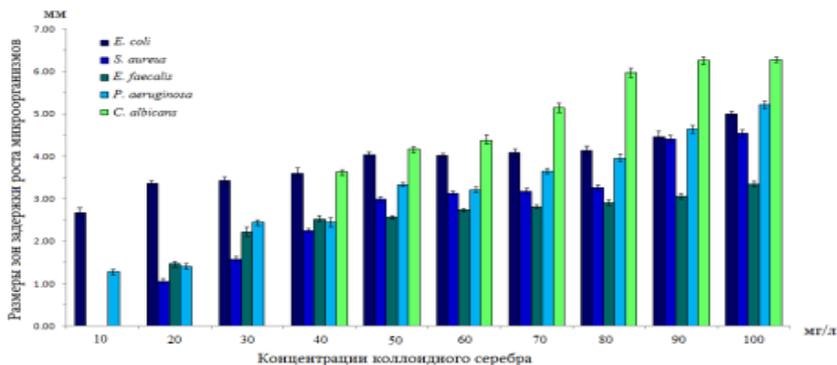


Рис. 6. Зоны задержки роста тест культур в зависимости от концентрации коллоидного Ag “Silverton”.

Таким образом коллоидное Ag подавляет рост микроорганизмов в разной степени, что зависит как от концентрации коллоидного Ag, так и от вида микроорганизма. Разные микроорганизмы имеют различную чувствительность по отношению к Ag, одним из объяснений которого является строение клеточной стенки. Наблюдается зависимость степени задержки роста микроорганизма от концентрации коллоидного Ag, чем выше концентрация, тем сильнее выражена задержка роста, и эта зависимость проявляется у всех микроорганизмов, используемых в данном эксперименте.

3.2. Минимальная ингибирующая концентрация коллоидного серебра по отношению к антибиотикоустойчивым микроорганизмам.

Были осуществлены исследования, направленные на изучение воздействия разных концентраций коллоидного Ag на антибиотикоустойчивые штаммы *E. coli*. Для сравнения результатов также использовали *E. coli* ATCC 25922, в качестве контрольного штамма, который не имеет резистентности к какому-либо из антибиотиков.

Таблица 1.

Величины зон задержки роста тест-культур (мм) в зависимости от концентрации коллоидного Ag.

Бактерии	Концентрации коллоидного Ag (мг/л)				
	5	10	20	30	40
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	1,55 ± 0,09	2,02 ± 1,03	2,52 ± 0,06	3,18 ± 0,52
<i>E. coli</i> pARG-25	0	2,26 ± 0,99	4,55 ± 0,88	4,90 ± 0,54	5,05 ± 0,57
<i>E. coli</i> DH5α-pUC18	0	0	0	4,75 ± 0,80	5,05 ± 0,93

P=0.95

Из результатов, приведенных в таблице 1, видно, что подавление роста тест-культур проявляется, начиная с концентрации 10 мг/л коллоидного Ag. Наиболее

выраженная задержка роста проявляется у антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli* по сравнению с контрольной тест-культурой, что проявляется при всех концентрациях коллоидного Ag (начиная с 10 мг/л). Несмотря на то, что МИК для *E. coli* DH5 α -pUC18 является 30 мг/л, а для *E. coli* pARG-25 – 10 мг/л, но при концентрации 40 мг/л у обеих культур наблюдается одинаковое подавление роста, которое на 37,0% превышает зону подавления роста контрольного штамма *E. coli* (Табл. 1). Можно заключить, что коллоидное Ag сохраняет антибактериальные свойства по отношению к антибиотикорезистентным микроорганизмам, более того, вызывает более выраженную задержку роста антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli* по сравнению с контрольной тест культурой, что проявляется при всех концентрациях коллоидного Ag, используемых в данном эксперименте.

3.3. Влияние разных концентраций коллоидного серебра на АТФазную активность мембран бактериальных клеток.

Для выявления молекулярно-клеточных механизмов антимикробного действия коллоидного Ag изучили АТФазную активность плазматической мембраны *E. coli* и *E. faecalis*, воздействуя на них разными концентрациями коллоидного Ag. Так как известно, что DCCD является ингибитором протонной FoF₁-АТФазы и также известны механизмы его воздействия [Azzi et al., 1984; Trchounian & Vassilian, 1994; Mnatsakanyan et al., 2002]. Исследуя изменения ингибирующего воздействия DCCD на АТФазную активность мембран, после их обработки разными концентрациями коллоидного Ag, можно сделать предположения о молекулярных механизмах антимикробного воздействия НЧ Ag на микроорганизмы.

Таблица 2.

АТФазная активность мембранных везикул *E. coli* ATCC 25922 и *E. faecalis* ATCC 29212, обработанных разными концентрациями коллоидного Ag, с добавлением и без добавления DCCD (конечная концентрация 0,1 мМ).

Бактерии	DCCD	АТФазная активность, нМоль Ф _i /мин/мкг белка		
		Контроль – без коллоидного Ag	Концентрации коллоидного Ag	
			10 мг/л	20 мг/л
<i>E. coli</i> ATCC 25922	- DCCD	247,0±13,2	129,2±7,4	80,0±3,8
	+ DCCD	126,0±6,0	71,0±3,6	27,0±1,6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	- DCCD	94,0 ± 5,0	75,3±3,6	69,0±3,2
	+ DCCD	13,0±0,6	10,4±0,5	6,3±0,3

P=0,95

Для того чтобы исследовать влияние НЧ Ag и DCCD на АТФазную активность мембранных везикул, до внесения АТФ мембранные везикулы предварительно инкубировали с разными концентрациями коллоидного Ag в течение 10 мин при температуре 37°C, так чтобы конечная концентрация НЧ Ag

была 10 мг/л или 20 мг/л, а также в сочетании с DCCD с конечной концентрацией 0,1 мМ. После чего определяли их АТФазную активность.

Из результатов видно (Табл. 2), что НЧ Ag оказывают подавляющее действие на АТФазную активность мембранных везикул *E. coli*. С повышением концентрации наблюдается усиление эффекта. Также видно, что подавляющее воздействие НЧ Ag намного усиливается после добавления DCCD. Так, ингибирующее действие 10 мг/л НЧ Ag в присутствии DCCD усилилось на 45,1%. То же самое наблюдается при добавлении DCCD к 20 мг/л НЧ Ag, в этом случае ингибирующее действие усилилось на 66,3%.

В случае с *E. faecalis* наблюдаются такие же эффекты, что и в случае с *E. coli*, с той лишь разницей, что в этом случае воздействие как НЧ Ag, так и комбинированный эффект НЧ Ag и DCCD выражены сильнее. С повышением концентрации коллоидного Ag наблюдается усиление эффекта как в отдельности, так и в сочетании с DCCD (Табл. 2). Также усиливается подавляющее воздействие НЧ Ag после добавления DCCD. Так, подавляющее действие 10 мг/л НЧ Ag в присутствии DCCD усилилось на 86,16%, а подавляющее действие 20 мг/л НЧ Ag в присутствии DCCD усилилось на 90,94%.

Таблица 3.

DCCD-чувствительная АТФазная активность мембранных везикул *E. coli* и *E. faecalis*.

Бактерии	АТФазная активность, нМоль F_1 /мин/мкг белка		
	Контроль – без коллоидного Ag	Концентрации коллоидного Ag	
		10 мг/л	20 мг/л
<i>E. coli</i> ATCC 25922	121,0±6,1	58,2 ±2,1	53,0±2,3
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	81,0±4,3	64,9±3,2	62,8±3,3

P=0,95

Также вычислили ингибирование F_0F_1 -АТФазной активности мембранных везикул обеих тест культур, вызванное воздействием только DCCD (Табл. 3). Из результатов видно, что DCCD имеет ингибирующее действие на F_0F_1 -АТФазную активность обеих тест-культур. При обработке мембран только DCCD, DCCD-чувствительная АТФазная активность намного больше, чем при обработке мембран, предварительно обработанных НЧ Ag. Получается, что НЧ Ag приводят к уменьшению DCCD-чувствительной АТФазной активности, но в комбинации с DCCD вызывают более сильное ингибирование АТФазной активности, чем каждая в отдельности (Табл. 2; 3). Из результатов также видно, что, увеличивая концентрацию коллоидного Ag, можно усилить комбинированный подавляющий эффект на АТФазную активность, причем в усилении комбинированного ингибирующего воздействия доля, приходящая на DCCD, наоборот уменьшается,

что указывает на то, что усиление обеспечивается за счет увеличения концентрации НЧ Ag.

Можно сделать предположение, что в механизме антибактериальной активности НЧ Ag возможно задействованы те же функциональные субъединицы FoF₁-АТФазного комплекса, или затрагиваются те же молекулярные механизмы, что и при воздействии DCCD. Возможно, что НЧ Ag, также как DCCD, приводят к конформационным изменениям «с» субъединицы Fo комплекса, с которой взаимодействует DCCD, что приводит к снижению АТФазной активности мембран.

3.4. Изучение действия коллоидного серебра на рост и развитие микроскопических грибов в сметане.

Целью добавления коллоидного Ag к сметане являлось выявление антимикробной активности НЧ Ag в составе пищевой матрицы, изучение эффективности антимикробного воздействия по отношению к микроорганизмам, вызывающим порчу продукта, что даст возможность удлинить срок хранения скоропортящихся пищевых продуктов.

Добавление НЧ Ag к сметане так, чтобы его конечное содержание было 10 мг/л, не вызвало подавления роста и развития микроскопических грибов, даже на 3-ий день экспозиции. При добавлении же коллоидного Ag в сметану в большем количестве, когда конечное содержание НЧ Ag в сметане составило 20 мг/л, сразу же наблюдалось изменение в количестве дрожжей *Saccharomyces* по сравнению с пробой без добавления коллоидного Ag, и чем дольше длилась экспозиция, тем сильнее было выражено воздействие НЧ Ag на дрожжевые и плесневые грибы.

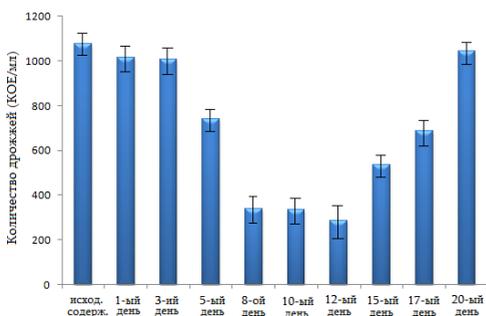


Рис. 7. Изменение количества дрожжевых грибов *Saccharomyces* в сметане, содержащей НЧ Ag в количестве 20 мг/л в течение хранения при температуре +4°.

Наиболее высокий результат воздействия НЧ Ag на дрожжевые грибы *Saccharomyces* наблюдался на 12-ый день экспозиции, когда их количество уменьшилось на 73,5% по сравнению с исходным содержанием. После наблюдалось увеличение количества дрожжей и на 20-ый день экспозиции в пробе, содержащей НЧ Ag, достигло почти своего первоначального количества, вероятно в результате приобретения

микроорганизмами устойчивости по отношению к токсичному воздействию Ag (Рис. 7) [Percival et al., 2005; Li et al., 2019].

В пробе, не содержащей НЧ Ag, на 20-ый день экспозиции количество дрожжевых грибов увеличилось в 63,3 раз по сравнению с исходным содержанием и в 65 раз превышало количество дрожжей, содержащихся в сметане с добавлением коллоидного Ag (Рис. 8А).

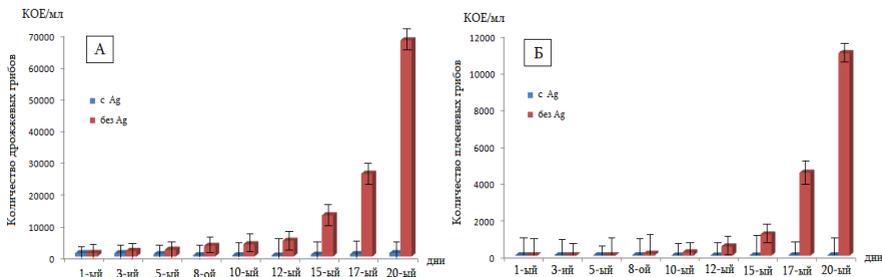


Рис. 8. Изменение количества дрожжевых грибов *Saccharomyces* (А) и плесневых грибов (Б) в сметане, содержащей НЧ Ag в количестве 20 мг/л и без НЧ Ag в течение хранения при температуре +4°C.

В сметане, содержащей НЧ Ag с концентрацией 20 мг/л, на 20-ый день экспозиции количество плесневых грибов не превышало допустимые нормы микробиологической безопасности [ТР ТС 033/2013] и осталось почти неизменным по сравнению с исходным содержанием, т.е. ≤ 10 КОЕ/мл. В сметане, не содержащей НЧ Ag, на 20-ый день хранения, количество плесеней по сравнению с исходным содержанием, а также по сравнению с количеством плесеней в сметане с добавлением Ag, увеличилось в 1100 раз (Рис. 8Б).

3.5. Антимикробная активность нанокompозитного фильтра по отношению к чистым культурам микроорганизмов.

Для выявления наличия бактерицидных свойств нанокompозитного фильтра был использован диск-диффузионный метод в некоторой модификации.

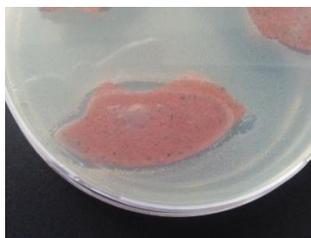


Рис. 9. Кусок нанокompозитного фильтра с Ag на газоне *E. coli* ATCC 25922 в чашке Петри с питательной средой. Вокруг и под куском нанокompозитного фильтра с Ag видна зона задержки роста тест-культуры.

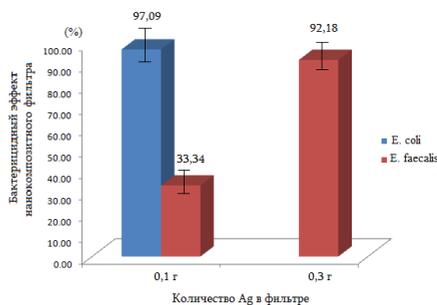
Для этого поверхность питательной среды в чашках Петри была засеяна суспензией тест-

микроорганизма *E. coli* ATCC 25922. Сразу же после посева на пластинку агара были поставлены кусочки нанокompозитного фильтра. После инкубации агаровой пластины с кусочками фильтров осуществили визуальную оценку. Вокруг кусков фильтра с Ag четко виднелись 2-4 мм зоны задержки роста тест-микроба (Рис. 9).

Из-за невозможности изучения влияния нанокompозитного фильтра на весь спектр микроорганизмов, выбор микроорганизмов был произведен, исходя из особенностей строения клеточной стенки и плазматической мембраны бактерий. Исходя из этого, эксперимент был проведен как на Gr⁺ бактерии дикого типа *E. faecalis* ATCC 29212, так и на Gr⁻ бактерии дикого типа *E. coli* ATCC 25922. Кроме разницы в строении клеточной стенки [Derouaux et al., 2014], эти бактерии интересны также тем, что являются санитарными показателями качества питьевой воды [WHO, Geneva 1997].

При фильтрации воды, зараженной *E. coli* ATCC 25922 через фильтр с Ag, эффективность фильтрации составила в среднем 97,1% (Рис. 10). В случае с *E. faecalis* ATCC 29212 бактерицидность фильтра с Ag упала до 33,3%. При увеличении количества НЧ Ag в фильтрующем картридже в 3 раза, бактерицидность нанокompозитного фильтра по отношению к *E. faecalis* увеличилась до 92,2% (Рис. 10). Разность бактерицидного эффекта фильтра по отношению к *E. coli* и *E. faecalis*, вызванная одинаковым количеством Ag, в данном случае составляет 63,8%, что указывает на то, что разные микроорганизмы имеют разную чувствительность по отношению к Ag. Разность бактерицидного эффекта фильтра по отношению к *E. faecalis*, вызванная увеличением количества Ag в три раза, составляет 58,9% (Рис. 10), что еще раз показывает взаимосвязь степени антибактериальной активности от концентрации НЧ Ag, и эта взаимосвязь сохраняется также при внедрении НЧ Ag в матрицу.

Рис. 10. Бактерицидный эффект фильтра в зависимости от количества Ag и типа микроорганизма.



3.6. Антимикробная активность нанокompозитного фильтра по отношению к смешанной культуре микроорганизмов. На основе данных с пропуском загрязненной воды через собранную конструкцию (см. Рис. 5) рассчитали пропускоспособность и бактерицидный эффект фильтра с Ag и без Ag в процентах,

после фильтрации разных объемов воды, загрязненной высокой концентрацией смешанной культурой микроорганизмов.

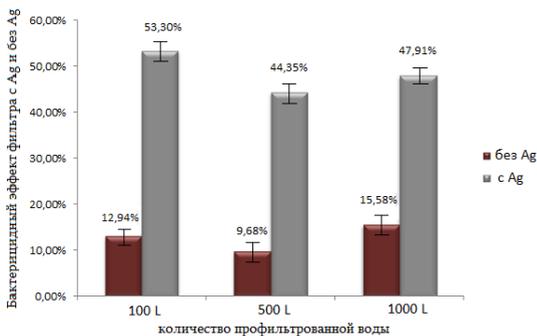


Рис. 11. Бактерицидный эффект фильтра без Ag и с Ag по отношению к смешанной культуре микроорганизмов после фильтрации 100 л, 500 л и 1000 л воды.

По мере увеличения объемов фильтруемой воды, антимикробная активность нанокомпозитного фильтра постепенно уменьшается; так, после фильтрации 100 л сильно загрязненной воды, бактерицидный эффект нанокомпозитного фильтра, содержащего 0,3 г Ag, составил в среднем 53,3%, после фильтрации 500 л – 44,4%, а после фильтрации 1000 л - 47,9% (Рис. 11).

Можно сделать заключение, что антибактериальное действие нанокомпозитного фильтра в основном зависит от количества Ag, количества и качества микробиологической нагрузки фильтруемой воды, а также от общего и органического загрязнения воды. Антибактериальная активность фильтра также способна предотвратить возможность роста микроорганизмов внутри самого фильтрующего картриджа, в результате чего сам фильтр не станет источником вторичного загрязнения воды. Известно, что в процессе фильтрации воды, в фильтрах накапливаются много органических веществ, что создает благоприятные условия для развития и размножения микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

На основе результатов, полученных в настоящем исследовании, сделаны следующие выводы:

1. Коллоидное Ag подавляет рост исследованных Гр+ и Гр- микроорганизмов в разной степени, что зависит как от концентрации коллоидного Ag, так и от вида и штамма микроорганизма. Степень задержки роста микроорганизма пропорциональна концентрации коллоидного Ag. Коллоидное Ag обладает антибактериальным воздействием также по отношению к антибиотикоустойчивым бактериям. При этом, оно вызывает более выраженную задержку роста антибиотикоустойчивых микроорганизмов по

сравнению с микроорганизмами, не имеющими выработанной устойчивости к антибиотикам (на 37% больше).

2. НЧ Ag оказывают ингибирующее действие на АТФазную активность мембран тест-культур *E. coli* ATCC 25922 и *E. faecalis* ATCC 29212. С повышением концентрации коллоидного Ag наблюдается усиление подавляющего эффекта на АТФазную активность.
3. Добавление DCCD к мембранным везикулам уже обработанных с помощью НЧ Ag, приводит к усилению подавления АТФазной активности мембран, которая намного больше, чем ингибирующий эффект DCCD или НЧ Ag в отдельности. НЧ Ag приводят к уменьшению DCCD-чувствительной АТФазной активности, что делает возможным предположение, что при антибактериальной активности НЧ Ag затрагиваются те же молекулярные механизмы или функциональные единицы FoF₁-АТФазного комплекса, что и при воздействии DCCD.
4. НЧ Ag сохраняют свои антимикробные свойства также в составе пищевых продуктов. Показано подавляющее действие разных концентраций коллоидного Ag (10 мг/л, 20 мг/л) на дрожжевые грибы *Saccharomyces* и плесневые грибы, вызывающие порчу молочного продукта – сметаны, что дает основание полагать, что его можно использовать в качестве консервирующего средства пищевых продуктов, для продления срока их хранения (на 12-ый день количество дрожжей уменьшилось на 73,5%).
5. Сочетая НЧ Ag с пористым минералом туфом, получен нанокompозитный материал, который наряду с механическими и сорбционными свойствами проявляет также бактерицидные свойства. Показано наличие антибактериальной активности нанокompозитного фильтра по отношению к чистым культурам Гр+ и Гр- бактерий, а также по отношению к смешанной культуре микроорганизмов.
6. Нанокompозитный фильтр был использован для обеззараживания воды от микроорганизмов. При этом эффективность фильтрации воды, зараженной *E. coli*, составила 97,09%, а в случае с *E. faecalis* - 92,2%. Антимикробная активность фильтра также предотвращает возможность развития микроорганизмов в самом фильтрующем картридже, в результате чего сам фильтр не становится источником вторичного загрязнения воды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мнацаканян Н.С., Трчунян А.А. Обеззараживающие свойства нанокompозитного фильтра на основе пористого минерала туфа и наночастиц серебра и его применение для фильтрации больших объемов воды. Биол. журн. Армении, 2016; 68 (2): 75-81.

2. **Мнацаканян Н.С.**, Трчунян А.А. Антибактериальная активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий нанокompозитного фильтра на основе пористого минерала туфа и наночастиц серебра: различные эффекты и зависимость от концентрации серебра. Доклады Национальной Академии Наук Армении, 2016; 116 (4), 327-334.
3. **Мнацаканян Н.С.**, Трчунян А. А. Консервация сметаны коллоидным серебром. Пищевая промышленность, 2017; N2: 20-23.
4. **Мнацаканян Н.С.** Антимикробная активность коллоидного серебра “Silverton”. Биолог. журн. Армении, 2018; 70 (2): 33-38.
5. **Mnatsakanyan N.**, Trchounian A. Nanocomposite filter made from porous mineral tuff with absorbed silver nanoparticles and its application for disinfection of water. Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA, 2018; 67 (2), 127-136.
6. Gabrielyan L., **Mnatsakanyan N.**, Vardanyan Z., Trchounian A. Antibacterial activities of silver and iron oxide nanoparticles, their probable cellular targets and applications. Int. Conf. on Functional Nanomaterials and Nanodevices. Vienna (Austria), Abstracts, 2018, P. 82-83.
7. **Mnatsakanyan N.**, Trchounian A. Antibacterial and antifungal effects of colloidal Ag nanoparticles and their applications. 1st South Caucasus Food Analytical Conference. Tbilisi (Georgia), Abstracts, 2018, P. 4-5.
8. Trchounian A., Gabrielyan L., **Mnatsakanyan N.** Nanoparticles of Various Transition Metals and Their Applications as Antimicrobial Agents. In: Nanotechnology Science and Technology. Metal nanoparticles. Properties, synthesis and applications. Ed.: Y. Saylor, V. Irby. Nova science publishers Inc., New York, 2018, P. 161-210. ISBN: 978-1-53614-115-3.
9. Soghomonyan D.R., **Mnatsakanyan N.S.**, Trchounian A.A. To the mechanism of antibacterial action of colloidal silver: changes in membrane-associated proton ATPase activity in *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. Biolog. J. Armenia, 2019, 3 (71): 73-78.

ՄՆԱՏԱԿԱՆՅԱՆ ՆԱՐԻՆԵ ՍԵԼԲԵՐՏԻ

ԿՈՆՈՒԴ ԱՐԾԱԹԻ ԵՎ ՆԱՆՈԿՈՄՊՈԶԻՏ ԶՏԻՉՆԵՐԻ ՀԱԿԱՄԱՆՐԷԱՅԻՆ ԱՂԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ՝ ԷՖԵԿՏՆԵՐԸ, ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ԵՎ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ Ag նանոմասնիկներ, կոլոիդ Ag, հակամանրէային և հակասնկային ակտիվություն, նանոկոմպոզիտ գոլիչ (ֆիլտր), ջրի ֆիլտրում, կոնսերվացում, Գր+ և Գր- միկրոորգանիզմեր, խմորասնկեր և բորբոսասնկեր, ԱԵՖազային ակտիվություն:

Ատենախոսության աշխատանքի նպատակն է կոլիդ. Ag հակամանրէային ակտիվության ուսումնասիրությունը տարբեր թեստ կուլտուրաների, նաև հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն մանրէների նկատմամբ, նվազագույն արգելակող կոնցենտրացիայի (MIC) որոշումը տվյալ մանրէների նկատմամբ: Նպատակն է նաև ուսումնասիրել Ag նանոմասնիկների (ՆՄ) հակամանրէային ակտիվությունը տարբեր մատրիցների կազմում և պարզաբանել հակամանրէային ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմները:

Կոլիդ. Ag տարբեր կոնցենտրացիաների **հակաբակտերիային և հակասնկային ակտիվությունը** հետազոտվել է Գր- (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027) և Գր+ (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212) բակտերիաների, նաև մանրադիտակային սնկի (*C. albicans*) նկատմամբ: Որոշվել են կոլիդ. Ag-ի **նվազագույն արգելակող կոնցենտրացիաները** վերը թվարկված մանրէների նկատմամբ: Պարզվել է, որ կոլիդ. Ag-ը ճնշում է մանրէների աճը տարբեր աստիճանով, ինչը կախված է ինչպես կոլիդ. Ag-ի կոնցենտրացիայից, այնպես էլ միկրոօրգանիզմի տեսակից: Արդյունքները ցույց են տվել, որ կոլիդ. Ag-ը պահպանում է **հակամանրէային ակտիվությունը հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն *E. coli*-ի շտամների նկատմամբ**, մասնավորապես կանամիցինի նկատմամբ կայուն *E. coli* pARG-25 և ամպիցիլինի նկատմամբ կայուն *E. coli* DH5a-pUC18 շտամների նկատմամբ և առաջացնում է առավել արտահայտված աճի ճնշվածություն համեմատած ստուգիչի՝ *E. coli* ATCC 25922, որը չունի կայունություն որևէ հակաբիոտիկի նկատմամբ:

Կոլիդ. Ag-ի հակամանրէային ազդեցության բջջամոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ Ag ՆՄ-ը առաջացնում են Գր+ (*E. faecalis* ATCC29212) և Գր- (*E. coli* ATCC25922) բակտերիաների պլազմային թաղանթների **ԱԵՖազային ակտիվության** ճնշում, ընդ որում Ag ՆՄ-ը դիցիկլոհեքսիլկարբոդիմիդի (*ԴՅՏԴ*) հետ համատեղ առաջացնում են ԱԵՖազի ակտիվության ավելի ուժեղ արգելակում: Հայտնի է, որ *ԴՅՏԴ*-ն պրոտոնային ԱԵՖազի արգելակիչ է, նաև հայտնի են նրա ազդման մեխանիզմները: Համակցված ազդեցության մեջ Ag ՆՄ-ի կոնցենտրացիան որքան մեծանում է, այնքան ուժեղանում է ԱԵՖազի ակտիվության ճնշումը, որում *ԴՅՏԴ*-ի չափաբաժինը ընդհակառակը՝ նվազում է: Դրանից կարելի է ենթադրել, որ Ag ՆՄ-ի հակամանրէային ազդեցության բջջամոլեկուլային մեխանիզմներում հնարավոր է ներառված լինեն FoF_1 -ԱԵՖազի միևնույն ֆունկցիոնալ ենթամիավորները, որոնք ներառված են *ԴՅՏԴ*-ի ազդման ժամանակ և առաջացնում են Fo համալիրի «c» ենթամիավորի կոնֆորմացիոն փոփոխություններ, ինչի հետևանքով նվազում է ԱԵՖազի ակտիվությունը:

Ag ՆՄ-ը պահպանում են հակամանրէային ակտիվությունը տարբեր մատրիցների կազմում: Ցույց է տրվել կոլիդ. Ag-ի ճնշող ազդեցությունը *Saccharomyces* խմորասնկերի և բորբոսասնկերի նկատմամբ, որոնք առաջացնում են կաթնաթթվային մթերքի՝ թթվասերի փչացում: Ինչը

հնարավորություն կտա երկարացնել արագ փչացող սննդամթերքի պահպանման ժամկետը և այս տեսանկյունից կլուիդ Ag-ը կարելի է դիտարկել որպես **կոնսերվանտ**: Մշակվել է **կենցաղային զտիչի (Ֆիլտրի) մատրիցի** մեջ Ag ՆՄ-ը ներդնելու տեխնոլոգիա: Մանրէներով ախտոտված ջրի ֆիլտրման արդյունքում ցույց է տրվել **Նանոկոմպոզիտ ֆիլտրի հակամանրէային ակտիվությունը մանրէների մաքուր կուլտուրայի նկատմամբ**, ընդ որում *E. coli* ATCC 25922 նկատմամբ այն կազմել է 97,09%, իսկ *E. faecalis* ATCC 29212 նկատմամբ՝ 33,34%: Ֆիլտրի մեջ ավելացնելով Ag ՆՄ-ի քանակը 3 անգամ, հնարավոր եղավ բարձրացնել նանոկոմպոզիտ ֆիլտրի հակամանրէային ակտիվությունը *E. faecalis* նկատմամբ մինչև 92,18%: **Նանոկոմպոզիտ ֆիլտրի հակամանրէային ակտիվությունը խառը կուլտուրաներով աղտոտված ջրի մեծ ծավալների ֆիլտրման ընթացքում** կազմել է 48,52%: Ամփոփելով արդյունքները կարելի է եզրակացնել, որ նանոկոմպոզիտ ֆիլտրի հակամանրէային ակտիվությունը կախված է ինչպես Ag ՆՄ-ի քանակից, այնպես էլ ֆիլտրվող ջրում առկա մանրէների տեսակից և քանակից: Նանոկոմպոզիտ ֆիլտրի հակաբակտերիային ակտիվությունը կարող է նաեւ կանխել միկրոօրգանիզմների աճն անմիջապես ֆիլտրի քարթիջի ներսում, որի արդյունքում ֆիլտրը չի դառնա ջրի երկրորդային աղտոտման աղբյուր:

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս դիտարկել Ag ՆՄ-ը որպես հակաբակտերիային և հակասնկային միջոց ախտածին մանրէների, նաև հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն մանրէների դեմ պայքարելու համար և կարող է դիտարկվել որպես հակաբիոտիկների այլընտրանքային միջոց: Ag ՆՄ-ը պահպանում են հակամանրէային ակտիվությունը տարբեր մատրիցների կազմում, ինչը հնարավորություն է տալիս ընդլայնել նրա կիրառման ոլորտը և օգտագործել այն որպես միջոց, տարբեր նյութերին հակամանրէային հատկություն շնորհելու համար: Ag ՆՄ-ի հակամանրէային ակտիվության բջջամոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ Ag ՆՄ-ի հակամանրէային ազդեցությունը սկսվում է արդեն իսկ բջջաթաղանթից, մինչև բջիջ ներթափանցելը: Այս մեխանիզմների ամբողջական պարզաբանումը հնարավորություն կտա օգտագործել Ag ՆՄ-ն ավելի ուղղորդված, ինչը կբարձրացնի նրա էֆեկտիվությունը և կնվազեցնի վնասակար ազդեցությունը շրջակա միջավայրի վրա:

MNATSAKANYAN NARINE SELBERT

**THE STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTION OF COLLOIDAL SILVER AND
NANOCOMPOSITE FILTERS: EFFECTS, MEMBRANE MECHANISMS AND
APPLICATION**

SUMMARY

Key words: Ag nanoparticles, colloidal Ag, antibacterial and antifungal activity, nanocomposite filter, water filtration, conservation, Gr + and Gr -microorganisms, yeasts and molds, ATPase activity.

The aim of our research was the investigation of the antibacterial activity of colloidal Ag on various test cultures, as well as on microbes which have resistance to antibiotics and determination of the Minimal inhibitory concentration (MIC) in relation to these bacteria. The aim of the study was also to explore the antimicrobial activity of Ag nanoparticles (NP) in composition of various matrices and to clarify the molecular cellular mechanisms of antibacterial action.

The antibacterial and antifungal activity of various concentrations of colloidal Ag were investigated in relation to Gr- bacteria (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027) and on Gr + bacteria (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212), also in relation to microscopic yeast (*C. albicans*). The **MICs** of colloidal Ag were determined in relation to microorganisms listed above. It has been found that colloidal Ag inhibited the growth of microorganisms in varying degrees, which depend on both the concentration of colloidal Ag, as well as the type of microorganisms.

The results showed that colloidal Ag retains the **antibacterial activity against *E. coli* strains which have resistance to antibiotics**, in particular *E. coli* pARG-25 strain which are resistant to kanamycin and *E. coli* DH5a-pUC18 strain which are resistant to ampicillin, and they causes a more pronounced growth inhibition compared with the *E. coli* ATCC 25922, which has no resistance to any of the antibiotics.

The studies of the molecular and cellular mechanisms of the antibacterial effects of colloidal Ag have shown that Ag NP cause the inhibition of the membrane-associated **ATPase activity** of the Gr+ (*E. faecalis* ATCC29212) and Gr- (*E. coli* ATCC25922) bacterial cytoplasmic membrane, moreover, Ag NP cause the more significant inhibition of the ATPase activity together with dicyclohexylcarbodiimide (DCCD). DCCD is known to be an inhibitor of proton ATPase, also they are known the mechanisms of its action. In the combined effect, with the increase of Ag NP concentration, there is an increase in the suppression of ATPase activity, in which the

part coming from DCCD, on the contrary, decreases. We can surmise that in the molecular and cellular mechanisms of antibacterial effects of Ag NP, possibly the same functional subunits of the FoF1-ATPase complex are involved, which are involved in the case of DCCD impact and lead to conformational changes of the "c" subunit of F_o complex, resulting in the decrease of the ATPase activity.

Ag NPs in composition of different matrices keep their antibacterial activity.

The inhibitory effect of colloidal Ag on yeasts *Saccharomyces* and on molds, which cause the spoilage of sour cream dairy product, has been shown. This will make it possible to extend the shelf life of perishable food products, and from this point of view, colloidal Ag can be considered as a **preservative**.

The technology of introducing of Ag NP into the **household filter matrix** has been developed. The filtration of water contaminated by microorganisms has demonstrated the **antimicrobial activity of the nanocomposite filter in relative to the pure cultures of microorganisms**, in relative to *E. coli* ATCC 25922 it was 97,09% and in relative to *E. faecalis* ATCC 29212 – 33,34%. By tripling the amount of Ag NP in the filter, it became possible to increase the antibacterial activity of the nanocomposite filter in relative to *E. faecalis* to 92.18%. The **antimicrobial activity of the nanocomposite filter during filtration of large volumes of water contaminated by mixed culture of microorganisms** was 48.52%. Summarizing the results, we can conclude that the antimicrobial activity of the nanocomposite filter depends on both, the quantity of Ag NP and the type and amount of bacteria present in the filterable water. Antibacterial activity of the nanocomposite filter will also prevent the growth of microorganisms inside the filter cartridges; hence the filter itself will not become a source of secondary water pollution.

The results obtained allow considering Ag NPs as an antibacterial and antifungal agent against pathogenic bacteria, also against the bacteria that have resistance to antibiotics, and Ag NP can be considered as an alternative agent to antibiotics. Ag NP retain antibacterial activity in the composition of various matrices, which allows to expand the range of its application and use it as an agent to giving antimicrobial properties to different materials. Our studies of the cellular and molecular mechanisms of the antibacterial activity of Ag NPs have shown that the antimicrobial action of Ag NP begins already from the cell membrane, before it penetrates the cell. A full explanation of these mechanisms will allow the more targeted use of Ag NPs, which will increase the efficiency of use and reduce the harmful effects on the environment.