

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.63

Н. С. Мнацаканян¹,
член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян²

Антибактериальная активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий нанокompозитного фильтра на основе пористого минерала туфа и наночастиц серебра: различные эффекты и зависимость от концентрации серебра

(Представлено 15/1 2016)

Ключевые слова: *обработка воды, фильтрация, наночастицы Ag, антимикробная активность, E. coli, E. faecalis.*

Введение. В течение тысячелетий качество вод постоянно ухудшалось и ныне достигло таких уровней загрязнения, что использование воды в разных целях сильно ограничилось и поставило под угрозу здоровье человека. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, 80% заболеваний обусловлены недостаточным качеством и антисанитарным состоянием воды [1]. От заболеваний, связанных с антисанитарным состоянием воды, на земном шаре страдает около 500 млн. человек. Ежегодно около 25 млн. человек умирают от заболеваний, которые разносит вода.

Актуальным становится вопрос фильтрации и обеззараживания от микроорганизмов воды, используемой человеком в разных целях. Сейчас выпускаются множество бытовых фильтров. Они сильно отличаются и по степени очистки, и по методу фильтрации, и по удобству применения. Фильтры, которые осуществляют лишь механическую очистку воды, сами становятся источником заражения воды микроорганизмами, которые могут накапливаться и размножаться в фильтрах. В этом случае их количество в питьевой воде может существенно увеличиваться. Решить эту проблему позволяет дополнительное обеззараживание питьевой воды или использование фильтров, которые обладают бактерицидными свойствами.

Обеззараживание воды осуществляется химическими и физическими методами. Среди физических методов обеззараживания известны кипячение; ультразвуковое воздействие; воздействие электрическим разрядом;

ультрафиолетовое облучение [2]. Химические методы обеззараживания включают обработку воды сильными окислителями: озоном, хлорсодержащими веществами; олигодинамию (воздействие ионами тяжелых металлов – Ag, Cu и др.) [3]. Обычно для очистки питьевой воды используют комбинацию вышеописанных методов.

Были осуществлены исследования, направленные на усовершенствование способов очистки воды, которые включали бы в себе сразу несколько методов обработки воды, в частности обеззараживание. Для этого использовался фильтрующий картридж, изготовленный из экологически чистого природного пористого минерала туфа. Фильтр, изготовленный в соответствии с техническим регламентом [4], имеет упорядоченно структурированную пористость с размерами пор до 1 мкм, т.е. осуществляет *механическую* фильтрацию. Но вместе с тем туф является минералом, имеющим высокие сорбционные свойства, в результате чего фильтрация осуществляется также за счет *сорбции* вредных веществ, растворенных в воде.

Ещё с древних времён известны бактерицидные свойства Ag и его соединений [5]. Показано подавляющее действие Ag на бактерии, причем это действие Ag сильнее, чем других металлов [6 – 8]. Имеются также данные о том, что чувствительность разных микроорганизмов к Ag неодинакова [7, 9, 10]. Добавление к фильтру наночастиц Ag может привести к получению нанокомпозитного фильтра, который вместе с вышеперечисленными фильтрующими свойствами будет обладать ещё и *бактерицидными* свойствами, исследование которых и является целью настоящей работы.

Материал и методика. Фильтры и их получение. В исследованиях использовали фильтрующие картриджи, изготовленные из экологически чистого природного пористого минерала туфа (Ервандакертское месторождение, Армения) в соответствии с техническим регламентом [4]. Картриджи имеют гигиенический сертификат (Минздрав РА, № 72 от 22.09.99 г.), прошли сертификацию в НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Цыцина РАМН (Россия) и получили Санитарно-эпидемиологическое заключение (РФ, 77.99.10.234.Д.004597.06.04). Это заключение касается возможности применения фильтра из природных пород в практике хозяйственно-питьевого водоснабжения для доочистки питьевой воды из артезианских скважин от повышенной мутности, цветности и железа. Однако данные фильтры не осуществляют микробиологическую очистку.

Во время технологического процесса изготовления фильтрующего картриджа **добавляли** наночастицы Ag, которые встраивались и фиксировались в структуру природного минерала.

Бактерии. Из-за невозможности изучения влияния нанокомпозитного фильтра на весь спектр микроорганизмов выбор микроорганизмов был произведен исходя из особенностей строения клеточной стенки и плазматической мембраны бактерий. Выяснено, что степень воздействия Ag на грамположительные (Гр+) и грамотрицательные (Гр-) бактерии разная [9, 10]. Исходя из этого, эксперимент был проведен как на Гр+ бактерии *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (штамм дикого типа), так и на Гр- бак-

терии *Escherichia coli* ATCC 25922 (штамм дикого типа). Кроме разницы в строении клеточной стенки, эти бактерии интересны также тем, что являются санитарными показателями качества питьевой воды [11].

Взаимодействие наночастиц Ag с фильтром. Для определения прочности взаимодействия наночастиц Ag с фильтром через фильтр пропускали дистиллированную воду и после фильтрации 5, 10 или 20 л воды отбирали образцы, которые вместе с исходной пробой воды проверяли на содержание Ag пламенным методом (ацетилен – воздух) с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра (Shimadzu серии AA-7000/ААС, Япония). Результаты анализа показали отсутствие даже следовых количеств Ag во всех фильтрах. Нижний предел чувствительности спектрофотометра составляет 0.2 мкг/мл.

Изучение обеззараживающих свойств фильтра по отношению к определенным микроорганизмам. В лабораторных условиях была собрана фильтрационная система, через которую пропустили 5 л воды, зараженной *E. coli*, и 5 л воды, зараженной *E. faecalis*. Из суточной бактериальной культуры готовили бульон мутностью 0.5 ед. МакФарленд, из которого путем 10-кратных разбавлений получили разведение 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. В итоге получили воду, зараженную *E. coli* с нагрузкой 100 КОЕ/мл. Эту воду фильтровали через нанокompозитный фильтр и весь фильтрат собирали в стерильную тару. Далее по 1 мл воды до и после фильтрации вносили в чашки Петри диаметром 90 мм и заливали 20 мл неселективной питательной среды [12], охлажденной до 40-45°C. Из каждого образца делали посев на среды параллельно в шести чашках, которые инкубировали при температуре 37°C в течение 24-48 ч. После подсчитывали число выросших колоний до и после фильтрации с помощью счетчика колоний. Вычисляли также степень бактерицидности фильтра по отношению к *E. coli* и *E. faecalis*.

Эксперименты проводили в трёхкратной повторности для каждого штамма бактерий в отдельности; приведены средние значения результатов со стандартной ошибкой.

Результаты и обсуждение. При фильтрации воды, зараженной *E. coli* ATCC 25922 через фильтр с Ag, эффективность фильтрации составила в среднем 97.09% (табл.1, рис. 1). В случае с *E. faecalis* ATCC 29212 бактерицидность фильтра с Ag упала до 33.34%. При увеличении количества наночастиц Ag в фильтрующем картридже в 3 раза увеличили бактерицидность нанокompозитного фильтра по отношению к *E. faecalis* до 92.18% (табл. 1, рис. 2).

Разность бактерицидного эффекта фильтра по отношению к *E. coli* и *E. faecalis*, вызванная одинаковым количеством Ag, в данном случае составляет 63.75% (рис. 3). Разность бактерицидного эффекта фильтра по отношению к *E. faecalis*, вызванная увеличением количества Ag в три раза, составляет 58.84% (рис. 4) Известно, что высвобождающиеся из окисленных наночастиц Ag ионы летальны для бактерий. Среди теорий, объясняющих механизм действия Ag на микроорганизмы, распространенной является адсорбционная теория, согласно которой клетка теряет жизнеспособ-

ность в результате взаимодействия электростатических сил, возникающих между клетками бактерий, имеющих отрицательный заряд, и положительно заряженными ионами Ag при адсорбции последних бактериальной клеткой [13]. Они могут воздействовать на активность ключевых транспортных систем и ферментов мембраны [7] и допускают ингибирование трансмембранного транспорта H^+ , Na^+ и Ca^{2+} и активности протонной АТФазы, вызываемое Ag [14].

Таблица 1

Результаты подсчёта колоний до и после фильтрации воды, зараженной *E. coli* и *E. faecalis* через фильтр с Ag

<i>E. coli</i> ATCC 25922	I опыт		II опыт		III опыт	
	Количество КОЕ/мл		Количество КОЕ/мл		Количество КОЕ/мл	
	до фильтр.	после фильтр.	до фильтр.	после фильтр.	до фильтр.	после фильтр.
Среднее значение	102	0	119	6	145	6
В %	100	0	100	4.92	100	3.80
Фильтруемость, %	100		100 - 4.92 = 95.08		100 - 3.80 = 96.20	
Фильтруемость = 97.09 ± 1.94%						
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	I опыт		II опыт		III опыт	
	Количество КОЕ/мл		Количество КОЕ/мл		Количество КОЕ/мл	
	до фильтр.	после фильтр.	до фильтр.	после фильтр.	до фильтр.	после фильтр.
Среднее значение	108	10	112	8	116	9
В %	100	8.84	100	6.81	100	7.78
Фильтруемость, %	100 - 8,84 = 91,16		100 - 6,81 = 93.18		100-778 = 92.21	
Фильтруемость = 92.18± 0.68%						
Общая фильтруемость = 94.63±1.3 %						

Некоторые исследователи особое значение придают физико-химическим процессам; в частности, окислению компонентов цитоплазмы бактерий и ее разрушению кислородом, растворенным в воде, причем Ag играет роль катализатора [15]. Имеются данные, свидетельствующие об образовании комплексов нуклеиновых кислот с тяжелыми металлами, вследствие чего нарушается стабильность ДНК и, соответственно, жизнеспособность

бактерий [13,16]. Существует также мнение, что Ag не оказывает прямого воздействия на ДНК клеток, а действует косвенно, увеличивая количество внутриклеточных свободных радикалов, которые снижают концентрацию внутриклеточных активных соединений кислорода [3]. Доказано, что наночастицы Ag сами по себе менее токсичны для бактерий, чем ионы, высвобождаемые при окислении наночастиц Ag [17].

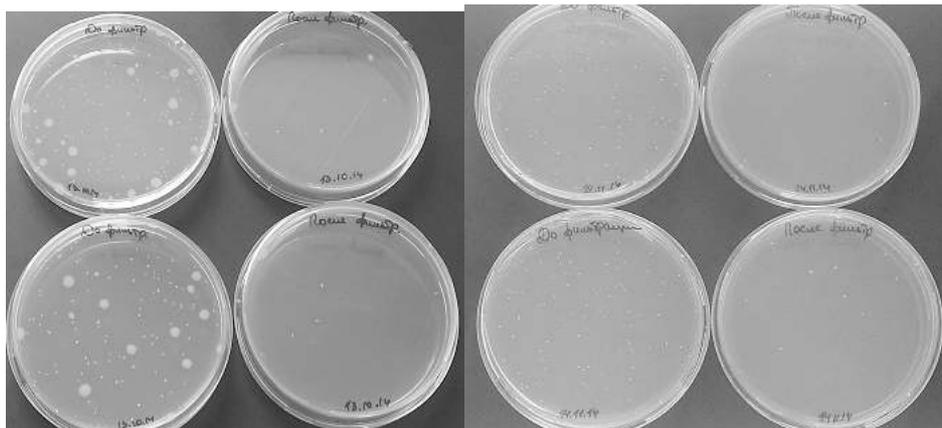


Рис. 1.

Рис. 2.

Рис. 1. Чашки Петри с посевами воды, зараженной *E. coli* в неселективную питательную среду. В первых двух чашках Петри (левая верхняя и левая нижняя) сделан посев воды до фильтрации, в двух других чашках Петри – после фильтрации через фильтр с Ag.

Рис. 2. Чашки Петри с посевами воды, зараженной *E. faecalis* в неселективную питательную среду. В первых двух чашках Петри (левая верхняя и левая нижняя) сделан посев воды до фильтрации, в двух других чашках Петри – после фильтрации через фильтр с Ag.

Таким образом, механизмы действия наночастиц Ag на микробную клетку включают разные процессы, обеспечивающие выраженный антимикробный эффект.

Заключение. Обобщая полученные результаты, можно сделать выводы о том, что Ag в составе фильтра по-разному воздействует на микроорганизмы, которые отличаются друг от друга строением клеточной стенки. При одинаковом содержании Ag антимикробное воздействие нанокompозитного фильтра по отношению к *E. coli* (Гр-) на 63.75% превышает антимикробное воздействие против *E. faecalis* (Гр+). Однако при увеличении концентрации серебра (в три раза) в фильтре можно усилить антимикробное воздействие нанокompозитного фильтра по отношению к *E. faecalis* на 58.84%.

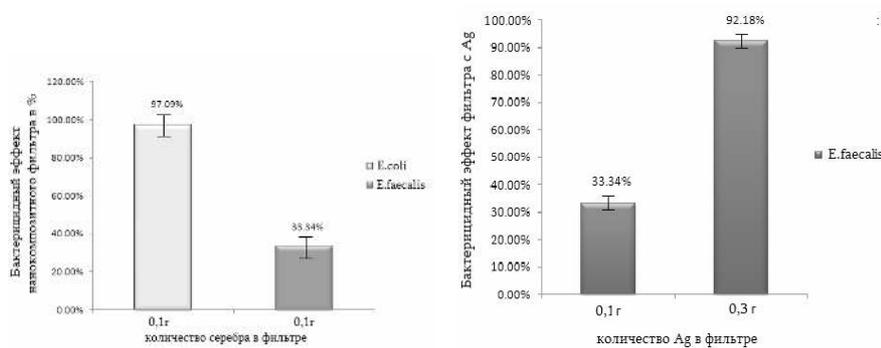


Рис. 3.

Рис. 4.

Рис. 3. Разница бактерицидного эффекта фильтра с Ag по отношению к *E. coli* и *E. faecalis*.

Рис. 4. Бактерицидный эффект фильтра с разным содержанием Ag по отношению к *E. faecalis*.

Исследования проведены в испытательной лаборатории «ТОНУС-ЛЕС» ООО «ЭФДИЭЙ ЛАБ» при поддержке генерального директора «ТОНУС-ЛЕС» ООО Л. С. Акопян.

¹«ТОНУС-ЛЕС» ООО «ЭФДИЭЙ ЛАБ»

e.mail: narine.mnatsakanyan@fdalab.am

²Ереванский государственный университет

Н. С. Мнацакян, член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян

Антибактериальная активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий нанокompозитного фильтра на основе пористого минерала туфа и наночастиц серебра: различные эффекты и зависимость от концентрации серебра

Сорбцией наночастиц Ag, полученных методом электрофореза в матрицу бытового фильтра, состоящего из пористого минерала туфа и изготовленного в соответствии с техническим регламентом (ТУ РА 23477755.1918-99), и их последующим химическим осаждением получены нанокompозитные фильтры, которые обладают высокой биологической активностью. Показано различное антибактериальное влияние нанокompозитного фильтра с наночастицами Ag на грамположительные (*Enterococcus faecalis*) и грамотрицательные (*Escherichia coli*) бактерии, при этом увеличение концентрации Ag в фильтре может усилить антимикробный эффект нанокompозитного фильтра против *E. faecalis*.

Ն. Ս. Մնացականյան, ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա. Հ. Թռչունյան

**Ծակոտկեն հանքային տուֆից և արծաթի նանոմասնիկներից
բաղկացած նանոկոմպոզիտ գոիչի հակամանրէային ակտիվությունը
գրամ-դրական և գրամ-բացասական բակտերիաների նկատմամբ.
տարբեր էֆեկտներ և կախվածություն արծաթի կոնցենտրացիայից**

Էլեկտրաֆորեզի եղանակով ստացված Ag նանոմասնիկների սորբցիայի շնորհիվ և նրանց հետագա քիմիական նստեցմամբ կենցաղային գոիչի մատրիցայի մեջ, որը բաղկացած է ծակոտկեն հանքային տուֆից և արտադրվում է համաձայն ՀՀ ՏԿ 23477755.1918-99 տեխնիկական կանոնակարգի, ստացվել են նանոկոմպոզիտ գոիչներ, որոնք ունեն բարձր կենսաբանական ակտիվություն: Ներկայացված է Ag նանոմասնիկներ պարունակող նանոկոմպոզիտ գոիչի հակամանրէային ակտիվությունը գրամ- դրական (*Enterococcus faecalis*) և գրամ-բացասական (*Escherichia coli*) մանրէների վրա, ընդ որում Ag նանոմասնիկների կոնցենտրացիայի ավելացումը կարող է ուժեղացնել գոիչի հակամանրէային ակտիվությունը *E. faecalis*-ի նկատմամբ:

**N. S. Mnatsakanyan,
corresponding member of NAS RA A. H. Trchounian**

**Antibacterial Activity of the Nanocomposite Filter Based on Porous
Mineral Tuff and Silver Nanoparticles against Gram-Positive and Gram-
Negative Bacteria : the Different Effects and Dependence on the
Concentration of Silver**

Nanocomposite filters, having high biological activity, were developed by sorption of Ag nanoparticles (obtained by electrophoresis) into matrix of household filter consisting of porous mineral tuff (manufactured in accordance with the technical regulations (TC RA 23477755.1918-99)), and their subsequent chemical deposition. The various antibacterial effect of nanocomposite filter with Ag nanoparticles on Gram-positive (*Enterococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria was shown, while increasing the concentration of Ag in the filter can enhance the antimicrobial effect of the nanocomposite filter against *E. faecalis*.

Литература

1. Техническое руководство по эпидемиологическому надзору за болезнями, связанными с водой. Европейское региональное бюро. Всемирная организация здравоохранения. 2011.
2. Хохрякова Е. Современные методы обеззараживания воды. М. Изд. центр «Аква-Терм». 2014. 55 с.
3. Pradeep T., Anshup – Thin Solid Films 2009. V. 517. P. 6441–6478.
4. Технические условия ТУ РА 23477755.1918-99. Фильтр бытовой, для питьевой воды из природных пород.

5. *Кульський Л. А.* Серебряная вода. Киев. Наукова думка, изд. 9-е, перераб. и доп. **1987**. 134 с.
6. *Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J.* – Nature Reviews Microbiology. 2013. V. 11. P. 371–384.
7. *Vardanyan Z., Gevorkyan V., Ananyan M., Vardapetyan H., Trchounian A.* – J. of Nanobiotechnology. 2015. V. 13. P. 69.
8. *Zhou Yan, Kong Ying, Kundu Subrata, Cirillo D. Jeffrey, Liang Hong* – J. of Nanobiotechnology. 2012. V. 10. P. 19.
9. *Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O.* – J. of Biomedical Materials Research. 2000. V. 52. P. 662-668.
10. *Woo Kyung Jung, Hye Cheong Koo, Ki Woo Kim, Sook Shin, So Hyun Kim, Yong Ho Park* -- Applied and Environmental Microbiology. 2008. V.74. P. 2171-2178.
11. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed . V. 3. Surveillance and control of community supplies. World Health Organization, Geneva, 1997.
12. ISO 6222:1999. Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
13. *Meiwan Chen, Zhiwen Yang, Hongmei Wu, Xin Pan, Xiaobao Xie, Chuanbin Wu* – International Journal of Nanomedicine. 2011.V. 6. P. 2873–2877.
14. *Mikihiro Yamanaka, Keita Hara, Jun Kudo* – Applied and Environmental Microbiology. 2005. V. 71. P. 7589–7593.
15. *Díaz-Visurraga J., Gutiérrez C., von Plessing C., García A.* – FORMATEX 2011.
16. *Rahn R.O., Landry L. C.* - Photochemistry Photobiology. 1973. V.18. P. 29–38.
17. *Xiu Zong-ming, Zhang Qing-bo, Puppala L. Hema, Colvin L. Vicki , Alvarez J. J. Pedro* – Nano Letters. 2012. V. 12. P. 4271-4275.