
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.6:53.047

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ¹

Л. С. ГАБРИЕЛЯН^{1), 2)}, А. А. ТРЧУНЯН^{1), 2)}

¹⁾Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения

²⁾Российско-Армянский университет, ул. Овсена Эмина, 123, 0051, г. Ереван, Армения

В настоящее время наночастицы (НЧ) металлов могут рассматриваться в качестве альтернативных агентов для преодоления антибиотикоустойчивости. Исследовано влияние НЧ серебра на грамположительные (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) и грамотрицательные (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium*

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Габриелян ЛС, Трчунян АА. Антибактериальные свойства наночастиц серебра и мембранотропные механизмы их действия. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:64–71.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-64-71>

For citation:

Gabrielyan LS, Trchounian AA. Antibacterial properties of silver nanoparticles and their membranotropic action. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:64–71. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-64-71>

Авторы:

Лилит Сергеевна Габриелян – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета¹⁾, доцент кафедры медицинской биохимии и биотехнологии Института биомедицины и фармации²⁾.

Армен Амбарцумович Трчунян – член-корреспондент НАН Республики Армения, заслуженный деятель науки Республики Армения, доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета¹⁾, профессор кафедры медицинской биохимии и биотехнологии Института биомедицины и фармации²⁾.

Authors:

Lilit S. Gabrielyan, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology^a, and associate professor at the department of medical biochemistry and biotechnology, Institute of Biomedicine and Pharmacy^b.

lgabrielyan@ysu.am

Armen A. Trchounian, corresponding member of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, honored scientist of the Republic of Armenia, doctor of science (biology), full professor; head of the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology^a, and professor at the department of medical biochemistry and biotechnology, Institute of Biomedicine and Pharmacy^b.

trchounian@ysu.am

MDC1759) бактерий. НЧ серебра демонстрировали антибактериальную активность в отношении использованных бактерий, что проявлялось в подавлении удельной скорости роста и уменьшении количества колониеобразующих единиц. При этом бактерицидное действие НЧ серебра на грамположительные бактерии было более выраженным, чем на грамотрицательные бактерии. Для выявления механизмов влияния НЧ также были проанализированы изменение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП), потока протонов через бактериальную мембрану и выделение водорода (H_2). При добавлении НЧ наблюдалось ингибирование выхода H_2 и изменение энергозависимого переноса протонов через F_0F_1 -АТФазу, что свидетельствует о влиянии НЧ серебра на активность мембраносвязанных ферментов. Полученные данные указывают на то, что НЧ серебра обладают выраженным антибактериальным действием в отношении исследованных бактерий и могут применяться в биомедицине.

Ключевые слова: наночастицы серебра; рост бактерий; окислительно-восстановительный потенциал; энергозависимый поток протонов; выделение водорода.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках финансирования научно-исследовательской деятельности Российско-Армянского университета.

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR MEMBRANOTROPHIC ACTION

L. S. GABRIELIAN^{a, b}, A. A. TRCHOUNIAN^{a, b}

^aYerevan State University, 1 Alex Manoukian Street, Yerevan 0025, Armenia

^bRussian-Armenian University, 123 Hovsep Emin Street, Yerevan 0051, Armenia

Corresponding author: L. S. Gabrielyan (lgabrielyan@ysu.am)

Nowadays, metal nanoparticles (NPs) can be considered as alternative agents for overcoming antibiotic resistance. The effect of silver NPs on gram-positive (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) and gram-negative (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* MDC1759) bacteria have been investigated in this work. Silver NPs demonstrated antibacterial activity against the bacteria used, expressed in the decrease of the specific growth rate and the number of colony forming units. Moreover, the bactericidal effect of silver NPs on gram-positive bacteria was more pronounced than on gram-negative bacteria. In order to find out the mechanisms of NPs' effects, the change of the redox potential, the hydrogen (H_2) production ability, and the protons flux across the bacterial membrane have been also studied. The addition of NPs led to inhibition of H_2 yield and to change of the energy-dependent proton flux through F_0F_1 -ATPase, indicating the silver NPs effect on the activity of membrane-bound enzymes. The data obtained point out that silver NPs show a pronounced antibacterial effect against the studied bacteria and can be used in biomedicine.

Keywords: silver nanoparticles; bacterial growth; redox potential; energy-dependent proton flux; hydrogen production.

Acknowledgements. This work was supported by basic support from Russian-Armenian University provided by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

Введение

Получение эффективных антибактериальных препаратов является актуальной проблемой современной медицины и биотехнологии в связи с ростом резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Наночастицы (НЧ) многих металлов обладают выраженными бактерицидными либо бактериостатическими свойствами, вследствие чего могут рассматриваться в качестве альтернативных агентов для преодоления антибиотикоустойчивости [1–4]. Достижения нанотехнологий позволяют использовать НЧ в различных сферах деятельности, включая биотехнологию, медицину, фармацевтическую, пищевую промышленность и т. д. [1–4].

Чувствительность бактерий к НЧ зависит от ряда факторов, таких как структура, форма и размер НЧ, их синтез, тип стабилизатора, структура бактериальной стенки, особенности метаболизма и др. [3–5]. По размеру НЧ близки к большинству биологических макромолекул, а по химической активности превосходят ионы, что обусловлено большой удельной площадью поверхности НЧ в растворах [4–6]. Малые размеры НЧ способствуют антибактериальному действию, так как благодаря этому они способны проникать через бактериальные мембраны [1; 4–6]. Воздействуя на мембраны, НЧ нарушают жизнедеятельность и вызывают гибель микроорганизмов. Помимо этого, НЧ влияют на формирование биопленок различными патогенами [7–9].

Ранее нами было исследовано действие НЧ оксида железа на рост и выживаемость разных бактерий, в том числе антибиотикорезистентных штаммов *Escherichia coli* [10; 11]. Обнаружено ингибирующее влияние НЧ Fe_3O_4 на параметры роста и мембраносвязанные процессы в данных бактериях. Возможно, причиной ингибирования является образование активных форм кислорода, что может привести к окислительному стрессу, повреждению белков и клеточных мембран. Среди мембраносвязанных процессов особую роль играет изменение активности протонной АТФазы, рассматриваемой в качестве одной из первичных мишеней для НЧ.

Поиск и применение новых НЧ с широким спектром терапевтического действия имеют очень важное значение для биомедицины и биотехнологии. Хорошо известны антимикробные свойства НЧ серебра (Ag) [5–8; 12]. Однако механизмы, лежащие в основе антибактериального действия НЧ, не исследованы полностью и различаются в зависимости от вида НЧ, способа их получения и вида бактерий.

В данной работе изучено влияние НЧ Ag на параметры роста (удельная скорость и выживаемость, окислительно-восстановительный потенциал среды (ОВП)) и мембраносвязанные процессы в грамположительных (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) и грамотрицательных (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* MDC1759) бактериях.

Материалы и методы исследования

Бактерии и условия культивирования. В настоящей работе использовались штаммы *E. coli* K-12 дикого типа (лабораторный штамм) и *E. hirae* ATCC9790, предоставленный профессором М. Солиозом (Бернский университет, Швейцария), а также *S. typhimurium* MDC1759 и *S. aureus* MDC5233 из коллекции микроорганизмов биологического факультета Ереванского государственного университета (получены из Центра депонирования микробов Национальной академии наук Республики Армения). Бактерии *E. coli*, *S. typhimurium* и *S. aureus* выращивались в анаэробных условиях на пептонной среде (2,0 % пептона, 0,5 % NaCl, 0,2 % K_2HPO_4 и 0,2 % глюкозы) при 37 °C и pH 7,5 [10], а *E. hirae* ATCC9790 – на триптонной среде, как описано ранее [10]. Культивирование бактерий проводилось в стеклянных сосудах DURAN® (*Carl Roth*, Германия) объемом 250 мл с плотно закрывающимися воздухонепроницаемыми пробками. При этом питательную среду заливали доверху, оставляя между пробкой и ростовой средой небольшую прослойку воздуха (30 мл). В целях создания анаэробных условий атмосферный и растворенный O_2 удаляли из ростовой среды автоклавированием (при 120 °C в течение 20 мин), после чего сосуды закрывали пробками. Для сохранения анаэробных условий и поддержания уровня содержания O_2 сосуды хранили герметично закрытыми. Для посева использовали 1,5 % предварительно выращенной жидкой ночной бактериальной культуры.

Рост бактерий контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) суспензии на спектрофотометре SP-2000 UV Visible (*Ningbo Hinotek Instrument*, Китай) при длине волны 600 нм (ОП_{600}). Скорость роста (μ) определяли по формуле

$$\mu = \frac{\ln \text{ОП} - \ln \text{ОП}_0}{t},$$

где ОП_0 – начальное значение оптической плотности (ОП_{600}), а ОП_t есть ОП_{600} через время t . Величину μ выражали в часах в минус первой степени [10; 11]. Подсчет жизнеспособных бактерий проводили методом посева соответственно разведенной в определенном объеме бактериальной культуры на плотную питательную среду в чашки Петри и последующей количественной оценки сформированных колоний [10].

Характеристика НЧ серебра. НЧ Ag «Сильвертон» (фармацевтическая компания «Тонус-Лес», Армения) в концентрации от 5 до 30 мкг/мл добавляли непосредственно в ростовую среду. Структура, форма и размер НЧ Ag, синтезированных электрохимическим методом, были исследованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с применением микроскопа JEM 2100 (*JEOL*, Япония) (рис. 1). НЧ имели сферическую форму, их средний размер составлял $(29,20 \pm 0,08)$ нм.

Определение pH, ОВП среды, выхода H_2 и энергозависимого потока протонов через бактериальную мембрану. Уровень pH среды измеряли с помощью pH-метра (*HANNA Instruments*, Португалия). Начальное значение pH поддерживалось в пределах $7,5 \pm 0,1$ путем добавления 0,1 моль/л NaOH или 0,1 моль/л HCl [10]. Величину ОВП среды определяли цифровыми иономерами И-160 МП (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь) с использованием платинового (ЭПВ-01) и титан-силикатного (ЭО-21) электродов, как описано ранее [10; 11]. Выход H_2 рассчитывали по изменению величины ОВП и выражали в миллимолях на 1 л культуры [10; 11].

Поток H^+ через бактериальную мембрану определяли с помощью соответствующего селективного электрода HJ1131B (*HANNA Instruments*, Португалия), как описано ранее [7; 8]. Бактерии культивировали в присутствии НЧ Ag (10 мкг/мл) в течение 18–20 ч. Затем бактериальную культуру 20 мин центрифугировали при 6000 об/мин, полученный осадок переносили в 150 ммоль/л трисфосфатный буфер (pH 7,5)

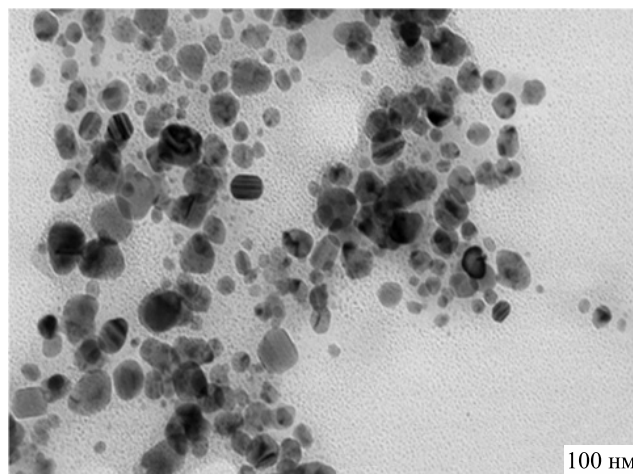


Рис. 1. Изображение НЧ серебра, полученное методом трансмиссионной электронной микроскопии

Fig. 1. The TEM image of silver nanoparticles

и добавляли источник энергии – глюкозу (11 ммоль/л). H^+ -поток (J_{H^+}) выражали в миллимолях в минуту на 10^{10} клеток [10; 11]. Для исследования влияния ингибитора протонного транспорта бактерии инкубировали с 0,2 ммоль/л *N,N'*-дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД) в течение 10 мин [10; 11].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли с помощью компьютерной программы *Excel*. В работе приводятся средние арифметические значения из не менее четырех независимых экспериментов со среднеквадратическим отклонением результатов измерений и критерием достоверности Стьюдента для разницы результатов различных серий экспериментов [10; 11]. Данные считаются достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Было проанализировано влияние НЧ серебра на параметры роста грамотрицательных бактерий *E. coli* K-12 и *S. typhimurium* MDC1759 и грамположительных *E. hirae* ATCC9790 и *S. aureus* MDC5233. Выбор объектов изучения объясняется тем, что *E. coli* и *E. hirae* широко используются в микробиологических и биотехнологических исследованиях в качестве модельных организмов для грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно [3; 10; 13; 14]. Среди этих энтеробактерий также встречаются патогенные формы, которые вызывают различные заболевания, такие как инфекции желудочно-кишечного тракта, мочеполовой и центральной нервной системы [15; 16]. Представители родов *Staphylococcus* и *Salmonella* – патогенные бактерии, вызывающие широкий диапазон инфекционных заболеваний у человека и проявляющие устойчивость ко многим известным антибиотикам [17; 18].

НЧ Ag демонстрировали антибактериальную активность в отношении использованных бактерий, выражающуюся в подавлении удельной скорости роста (рис. 2). Обнаружена концентрационная зависимость антибактериального действия НЧ Ag: максимальный ингибирующий эффект НЧ Ag проявлялся при концентрации 30 мкг/мл (см. рис. 2). При этом действие НЧ Ag на *E. hirae* и *S. aureus* было более выраженным, чем на *E. coli* и *S. typhimurium*. Как видно из рис. 2, удельная скорость роста *S. typhimurium* MDC1759 и *E. coli* K-12 замедлялась примерно в 4,0 и 6,0 раза соответственно (см. рис. 2, а), тогда как рост *S. aureus* MDC5233 и *E. hirae* ATCC9790 подавлялся в 7,0 и 7,6 раза соответственно (см. рис. 2, б).

Таким образом, грамотрицательные бактерии оказались более устойчивыми к действию НЧ, чем грамположительные, что может быть связано со строением клеточной стенки и наличием наружной мембраны, служащей своеобразным барьером для НЧ. Предполагается, что антибактериальная активность НЧ Ag может быть результатом возникновения свободных положительно заряженных ионов Ag, их адсорбции на отрицательно заряженной поверхности бактериальной мембраны, взаимодействия с мембраносвязанными белками, в том числе с ферментами, и проникновения в клетку. Свободные ионы Ag^+ могут способствовать образованию активных форм кислорода, что может привести к окислительному стрессу, повреждению белков и клеточных мембран, а также к гибели бактерий [4–6; 12].

Было исследовано влияние НЧ Ag на количество колониеобразующих единиц (КОЕ) используемых бактерий (рис. 3). При добавлении 10 мкг/мл НЧ Ag количество жизнеспособных колоний *S. typhimurium* MDC1759 и *E. coli* K-12, выросших на плотной питательной среде, снижалось на 60 и 52 % соответственно по сравнению с контролем (см. рис. 3). В присутствии НЧ Ag наблюдалось также уменьшение числа колоний *S. aureus* MDC5233 и *E. hirae* ATCC9790 на 71 и 76 % соответственно относительно контроля, что свидетельствовало о бактерицидном действии данных НЧ (см. рис. 3).

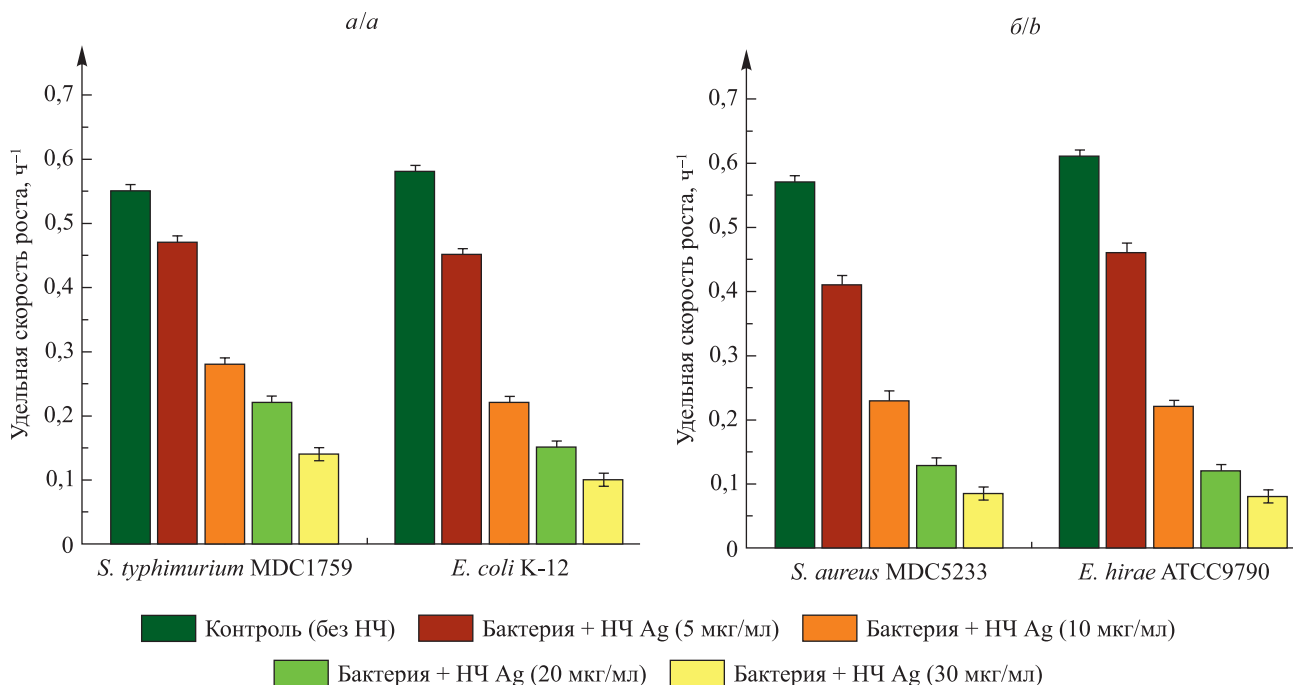


Рис. 2. Влияние различных концентраций НЧ Ag на удельную скорость роста грамотрицательных (а) и грамположительных (б) бактерий. Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 2. Effect of Ag NPs various concentrations on the specific growth rate of gram-negative (a) and gram-positive (b). Control was without nanoparticles addition

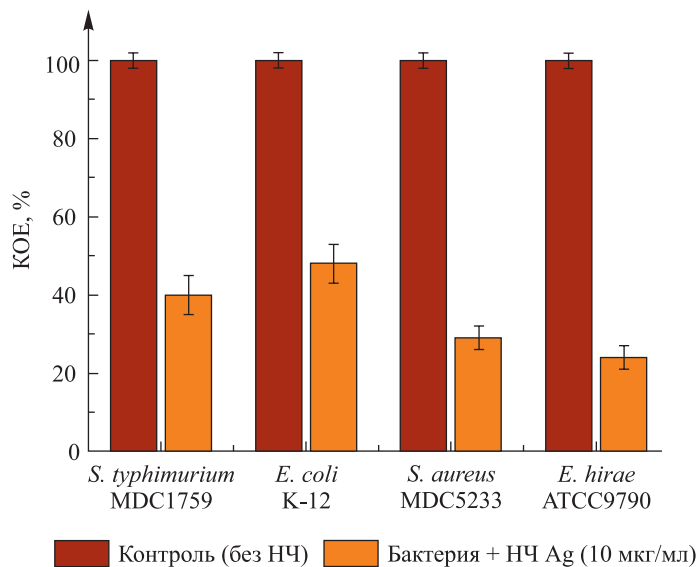


Рис. 3. Количество колониеобразующих единиц различных бактерий при росте в присутствии НЧ Ag (10 мкг/мл). Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 3. The number of colony forming units of various bacteria, grown in the presence of Ag NPs (10 μg/mL). Control was without nanoparticles addition

ОВП является важным фактором, характеризующим метаболическую активность бактерий при росте в различных условиях [3; 10; 19]. Установлено, что рост бактерий в отсутствие кислорода сопровождается снижением ОВП от положительных до отрицательных значений [3; 10; 19]. В работе было исследовано изменение ОВП в процессе бактериального роста в присутствии НЧ Ag (рис. 4). Рост *S. typhimurium* MDC1759 и *E. coli* K-12 (без НЧ) в анаэробных условиях в течение 20 ч сопровождался снижением значений ОВП от $(+120 \pm 10)$ мВ в начале лаг-фазы до (-430 ± 15) мВ и (-580 ± 15) мВ соответственно (см. рис. 4). Падение ОВП указывает на повышение интенсивности восстановительных реакций, что является характерным для метаболических процессов при росте бактерий в анаэробных

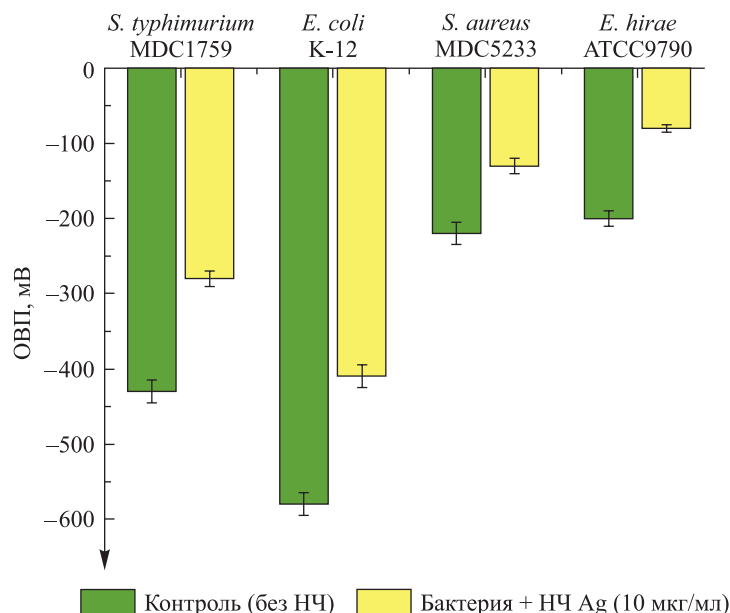


Рис. 4. Изменение ОВП среды различных бактерий при росте в присутствии НЧ Ag (10 мкг/мл). Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 4. Changes of medium redox potential of various bacteria grown in the presence of Ag NPs (10 µg/mL). Control was without nanoparticles addition

условиях и мембраносвязанного выделения H_2 [3; 10; 19]. Добавление НЧ Ag приводит к замедлению падения ОВП. Так, в присутствии 10 мкг/мл НЧ Ag значение ОВП снижалось до (-280 ± 10) мВ (*S. typhimurium*) и (-410 ± 10) мВ (*E. coli*) (см. рис. 4). В случае грамположительных бактерий изменение ОВП было не столь выраженным (см. рис. 4).

Взаимосвязь между снижением величины ОВП и выделением H_2 была показана для разных микроорганизмов в нашей лаборатории [19–22]. Известно, что выделение H_2 бактериями *E. coli* связано с деятельностью гидрогеназ и формат-водород-лиазных (ФВЛ) комплексов [19; 20]. НЧ Ag подавляли выход H_2 в *E. coli* K-12 примерно в 5 раз и полностью ингибировали данный процесс в *S. typhimurium* MDC1759 (данные не приводятся). Действие НЧ на мембраносвязанное выделение H_2 может быть обусловлено подавлением активности гидрогеназ и ФВЛ-комплексов. Грамположительные бактерии *S. aureus* MDC5233 и *E. hirae* ATCC9790 неспособны к выделению биоводорода.

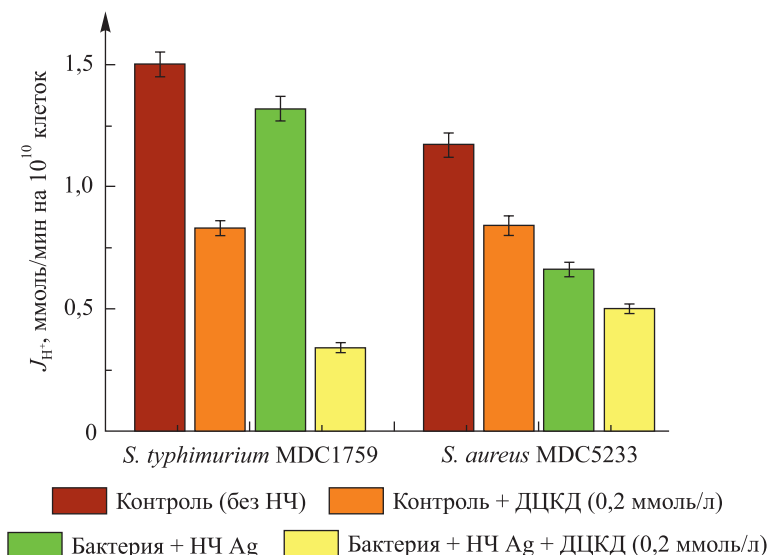


Рис. 5. Влияние НЧ Ag (10 мкг/мл) на поток H^+ через мембраны *S. typhimurium* MDC1759 и *S. aureus* MDC5233. Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 5. Effect of Ag NPs (10 µg/mL) on the H^+ -flux across the membranes of *S. typhimurium* MDC1759 and *S. aureus* MDC5233. Control was without nanoparticles addition

Для выявления механизмов влияния НЧ также исследовали энергозависимый перенос протонов через бактериальную мембрану. При добавлении НЧ Ag наблюдалось изменение энергозависимого потока протонов через мембрану в *S. typhimurium* MDC1759 и *S. aureus* MDC5233 даже в присутствии ингибитора ДЦКД, свидетельствующее о том, что антибактериальное действие НЧ может быть связано с изменением активности F_0F_1 -АТФазы (см. рис. 5). Полученные результаты указывают на то, что мембраносвязанная протонная АТФаза может являться основной мишенью действия НЧ Ag.

Заключение

Таким образом, обнаружено антибактериальное действие НЧ Ag на исследованные бактерии, проявляющееся в подавлении удельной скорости роста, уменьшении количества жизнеспособных бактериальных колоний, изменениях ОВП, переноса протонов через мембрану и выделении биоводорода. При этом бактерицидное влияние НЧ Ag на грамположительные бактерии *E. hirae* и *S. aureus* было более выраженным, чем на грамотрицательные *E. coli* и *S. typhimurium*. Предполагается, что грамотрицательные бактерии более устойчивы к воздействию НЧ благодаря наличию наружной мембраны, служащей своеобразным барьером для НЧ.

Следовательно, НЧ Ag могут рассматриваться как перспективные антибактериальные агенты и в будущем способны заменить антибиотики при лечении различных заболеваний.

Библиографические ссылки / References

1. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;49(2):137–152. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.
2. Singh R, Smitha MS, Singh SP. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;14(7):4745–4756. DOI: 10.1166/jnn.2014.9527.
3. Trchounian A, Gabrielyan L, Mnatsakanyan N. Nanoparticles of various transition metals and their applications as antimicrobial agents. In: Saylor Y, Irby V, editors. *Metal nanoparticles: properties, synthesis and applications*. Hauppauge: Nova Science Publishers; 2018. p. 161–211.
4. Wang L, Hu Ch, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:1227–1249. DOI: 10.2147/IJN.S121956.
5. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Fica A, Andronesu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. *Nanomaterials*. 2018;8(9):681. DOI: 10.3390/nano8090681.
6. Lee SH, Jun BH. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Science*. 2019;20(4):865. DOI: 10.3390/ijms20040865.
7. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856–8874. DOI: 10.3390/molecules20058856.
8. Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):373. DOI: 10.1186/1556-276X-9-373.
9. Sathyanarayanan MB, Balachandranath R, Srinivasulu YG, Kannaiyan SK, Subbiahdoss G. The effect of gold and iron oxide nanoparticles on biofilm-forming pathogens. *International Scholar Research Notices*. 2013;2013:272086. DOI: 10.1155/2013/272086.
10. Gabrielyan L, Hovhannisyan A, Gevorgyan V, Ananyan M, Trchounian A. Antibacterial effects of iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles: distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103(6):2773–2782. DOI: 10.1007/s00253-019-09653-x.
11. Gabrielyan L, Hakobyan L, Hovhannisyan A, Trchounian A. Effects of iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles on *Escherichia coli* antibiotic-resistant strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;126(4):1108–1116. DOI: 10.1111/jam.14214.
12. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014;22(1):116–127. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.010.
13. Arokiyaraj S, Hairul Islam VI, Bharanidharan R, Raveendar S, Lee J, Kim DH, et al. Antibacterial, anti-inflammatory and probiotic potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30(7):2111–2118. DOI: 10.1007/s11274-014-1625-0.
14. Vardanyan Z, Gevorgyan V, Ananyan M, Vardapetyan H, Trchounian A. Effects of various heavy metal nanoparticles on *Enterococcus hirae* and *Escherichia coli* growth and proton-coupled membrane transport. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015;13(69):1–9. DOI: 10.1186/s12951-015-0131-3.
15. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 2012;3(2):71–87. DOI: 10.4161/gmic.19182.
16. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106(1):1–24. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026.
17. Akbar A, Sadiq MB, Ali I, Muhammad N, Rehman MN, et al. Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;17:36–42. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.005.
18. Ayala-Núñez NV, Lara Villegas HH, del Carmen Ixtapan Turrent L, Padilla CR. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*. 2009;5:2–9. DOI: 10.1007/s12030-009-9029-1.

19. Poladyan A, Avagyan A, Vassilian A, Trchounian A. Oxidative and reductive routes of glycerol and glucose fermentation by *Escherichia coli* batch cultures and their regulation by oxidizing and reducing reagents at different pHs. *Current Microbiology*. 2013; 66(1):49–55. DOI: 10.1007/s00284-012-0240-2.
20. Trchounian A. Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photofermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015;35(1):103–113. DOI: 10.3109/07388551.2013.809047.
21. Gabrielyan L, Sargsyan H, Trchounian A. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:131–140. DOI: 10.1186/s12934-015-0324-3.
22. Manoyan J, Gabrielyan L, Kozel N, Trchounian A. Regulation of biohydrogen production by protonophores in novel green microalgae *Parachlorella kessleri*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;199:111597. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111597.

Статья поступила в редакцию 29.06.2020.
Received by editorial board 29.06.2020.