ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ ՎԱՐՍԻԿ ՍԱՄՎԵԼԻ

ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ԵՎ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՃԻ ԵՎ ԿԵՆՍՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2013

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МАРТИРОСЯН ВАРСИК САМВЕЛОВНА

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.00.02-Биофизика

ЕРЕВАН-2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԿԳՆ Բժշկակենսաբանական միջազգային հետբուհական ուսումնական կենտրոնում:

Գիտական ղեկավար՝	կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ս.Ն. Հայրապետյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ա.Ե. Զաքարյան ֆիզմաթ. գիտ. թեկնածու, դոցենտ Վ.Պ. Քալանթարյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Հայաստանի Ազգային Ագրարային Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2013թ. սեպտեմբերի 17-ին, ժամը 14^{00}-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:
Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2013թ. հուլիսի 4-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Լ.Հ. Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Медико-биологическом международном поствузовском учебном центре при МОН РА

Научный руководитель:	доктор биол. наук, профессор С.Н. Айрапетян
Официальные оппоненты:	доктор биол. наук, профессор А.Е. Закарян кандидат физ.-мат. наук, доцент В.П. Калантарян
Ведущая организация:	Национальный Аграрный Университет Армении

Защита диссертации состоится 17-ого сентября 2013г. в 14^{00} часов на заседании Специализированного совета Биофизики 051 ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.
Автореферат диссертации разослан 4-ого июля 2013г.
Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, профессор Л.А. Навасардян

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

<u>Հիմնախնդրի արդիականությունը</u>: Ներկայումս գիտատեխնիկական առաջընթացը բերել է շրջակա միջավայրի բազմակողմանի աղտոտվածության՝ հատկապես մեծ վտանգ է ներկայացնում ջրավազանների մանրէաբանական աղտոտվածությունը: Այն հարուցվում է մանրէների կողմից, որոնք մարդկանց և կենդանիների մոտ կարող են մի շարք վարակիչ հիվանդությունների առաջացման պատճառ հանդիսանալ՝ ստեղծելով բավականին լուրջ խնդիրներ առողջապահական և համաճարակաբանական տեսանկյունից: Այդ պատճառով մանրէներից ջրի մաքրման հարցը համարվում է ժամանակակից գիտության գլոբալ խնդիրներից մեկը, որն արձանագրված է ՅՈՒՆԵՍԿՕ-ի և Առողջապահության Համաշխարհային Կազմակերպության (ԱՀԿ) համապատասխան որոշումներում (Jackson 2008): Այս խնդրի լուծման համար բազմաթիվ հետազոտողներ են ներգրավվել, որոնց նպատակն է մշակել ջրային համակարգի մանրէազերծման նոր մեթոդներ, որոնք կլինեն ֆինանսապես շահավետ և, որ ամենակարևորն է էկոլոգիական տեսանկյունից հնարավորինս անվտանգ (Mokrini 1997; Wesley Eckenfelder 1992):

Ներկայումս պրակտիկայում ջրավազանների մաքրման նպատակով լայն կիրառություն ունեն քիմիական մեթոդները՝ մասնավորապես քլորակրի և H_2O_2-ի կիրառմամբ:

Քլորացումն այն հիմնական և լայն տարածում ունեցող մեթոդն է (Kotula et al., 1997), որն օգտագործվում է ինչպես խմելու ջրի, այնպես էլ թափոնային ջրային համակարգերի մանրէաբանական մոնիտորինգի համար (Sisti et al., 1998): Սակայն այս մեթոդի հիմնական թերությունը կայանում է նրանում, որ մանրէազերծ էֆեկտի դրսևորման համար անհրաժեշտ է կիրառել ռեագենտի համեմատաբար մեծ կոնցենտրացիաներ, և բացի այդ քլորացման հետևանքով ջրային միջավայրում գոյացած ածանցյալներն օժտված են տհաճ հոտով, ինչպես նաև նրանց մնացորդային քանակները կարող են որոշակի վտանգ ներկայացնել մարդու և այլ կենդանի օրգանիզմների համար (Richardson et al., 1998):

Ջրածնի պերօքսիդի (H_2O_2) կիրառությունը, որպես հակաբակտերիալ և հատկապես որպես ջրի մաքրման միջոց, քլորացման համեմատ ունի առավելություններ էկոլոգիական անվտանգության տեսանկյունից (այն արագ է քայքայվում միջավայրի գործոնների ազդեցության տակ), սակայն հենց այդ հատկությունն էլ պայմանավորում է այս մեթոդի հիմնական թերությունը, քանի որ ի հայտ է գալիս համեմատաբար մեծ քանակների կիրառման անհրաժեշտություն: Այդ պատճառով այս մեթոդը կիրառելի է միայն ջրի ոչ մեծ ծավալների մաքրման համար՝ հաշվի առնելով նրա ծախսատարությունը: Հաճախ այս մեթոդի կիրառությունը համակցում են այլ գործոնների հետ, ինչպիսիք են օզոնը, ուլտրամանուշակագույն ճառագայթումը, երկաթի իոնները՝ H_2O_2-ի քիմիական ակտիվությունը բաձրացնելու նպատակով: Սակայն այս գործոններն իրենց հերթին լրացուցիչ ֆինանսական ծախսեր են պահանջում (Mokrini et al., 1997):

Գրականության տվյալներից հայտնի է, որ CO_2-ի որոշակի կոնցենտրացիաներն ունակ են մեծացնելու մանրէների չափերը կամ ծավալը (Debs-Louka et al., 1999): Բջջի ծավալի մեծացումն իր հերթին ենթադրում է թաղանթում առկա ֆունկցիոնալ

ակտիվ միավորների կամ ռեցեպտորների թվի մեծացում և բջջում տեղի ունեցող նյութափոխանակային գործընթացների ակտիվացում (Ayrapetyan and Arvanov 1979; Kumagai et al.,1997): Այս ամենը հնարավորություն տվեց ենթադրելու, որ CO_2-ը կարող է բարձրացնել բակտերիաների ընկալունակությունը մանրէասպան նյութերի այնպիսի ցածր կոնցենտրացիաների նկատմամբ, որոնք սովորաբար կիրառելի չեն ջրի մանրէազերծման համար: Հիմք ընդունելով վերը նշվածը առաջարկվեց օգտագործել ոչ կրիտիկական կոնցենտրացիայով ածխաթթու գազը ջրածնի պերօքսիդի (CO_2/H_2O_2), ինչպես նաև ածխաթթու գազը կալցիումի հիպոքլորիտի ($CO_2/Ca(ClO)_2$) հետ համատեղ, ջուրն էկոլոգիապես առավել անվնաս և ֆինանսապես շահավետ եղանակով մաքրելու համար:

Ներկայումս, բացի ջրի մաքրման քիմիական մեթոդներից, մեծ ուշադրություն են ներկայացնում այս խնդրի լուծման ալտերնատիվ ուղիների փնտրտուքը՝ մասնավորապես ֆիզիկական գործոնների կիրառմամբ: Որոշ հետազոտողների կողմից ջրի մաքրման փորձեր են արվել հաստատուն մագնիսական և էլեկտրամագնիսական դաշտերի կիրառմամբ, սակայն նմանատիպ ուսումնասիրությունները եզակի են գրականության մեջ:

Հայտնի է, որ ֆիզիկական գործոնները, ինչպիսիք են գերցածր հաճախությամբ էլեկտրամագնիսական դաշտերը (ԳՑՀ ԷՄԴ) և մեխանիկական տատանումները ինֆրաձայնային տիրույթում (ՄՏ ԻՏ) կարող են փոխել ջրի կլաստերային կառուցվածքը՝ բերելով ջրում CO_2-ի լուծելիության և թթվածնի ակտիվ ձևերի (ԹԱՁ) քանակների փոփոխության (Ayrapetyan and Markov 2006; Chaplin 2011; Klassen 1982; Voikov 2006): Այս գործոններն ազդում են բակտերիաների աճի վրա, այդ իսկ պատճառով նրանք ևս կարող են դիտարկվել որպես հնարավոր միջոց ջուրը մանրէաբանական աղտոտվածությունից մաքրելու գործում:

Հետևաբար, քիմիական և ֆիզիկական եղանակներով ջրի մանրէաբանական մաքրման նոր մեթոդների մշակումը կարևոր նշանակություն ունի առողջապահական և տնտեսական տեսանկյունից:

<u>Աշխատանքի նպատակը և ուսումնասիրվող խնդիրները</u>: Ատենախոսական աշխատանքի նպատակն է մշակել քիմիական և ֆիզիկական եղանակներով ջուրն էկոլոգիապես առավել անվնաս և ֆինանսապես շահավետ մաքրման նոր մեթոդներ, ինչպես նաև պարզաբանել այն մեխանիզմները, որոնք ընկած են այս եղանակներով ջրի մանրէազերծման գործընթացների հիմքում:

Աշխատանքի նպատակին համապատասխան ուսումնասիրվել են հետևյալ խնդիրները.

- Ուսումնասիրվել է CO_2-ով H_2O_2-ի ցածր կոնցենտրացիաների նկատմամբ բակտերիաների մոտ զգայունության բարձրացման էֆեկտները և բացահայտվել CO_2-ի և H_2O_2-ի այն օպտիմալ կոնցենտրացիաները, որով հնարավոր է ճնշել բակտերիաների աճը:
- Ուսումնասիրվել է CO_2-ով $Ca(ClO)_2$-ի ցածր կոնցենտրացիաների նկատմամբ բակտերիաների մոտ զգայունության բարձրացման էֆեկտները և բացահայտվել CO_2-ի և $Ca(ClO)_2$-ի այն օպտիմալ կոնցենտրացիաները, որով հնարավոր է ճնշել *Escherichia coli* K-12-ի աճը:

- Դիտարկվել է բջիջների հիդրատացման դերը CO_2-ի ցածր կոնցենտրացիաներով բակտերիաների մոտ ախտահանիչ նյութերի զգայունության բարձրացման գործում:
- Էլեկտրոնային մանրադիտակի օգնությամբ պարզաբանվել են կառուցվածքային որոշ փոփոխություններ բակտերիաների մոտ, որոնք տեղի են ունենում H_2O_2-ի, CO_2-ի և $Ca(ClO)_2$-ի ցածր կոնցենտրացիաների ներգործության արդյունքում:
- Ուսումնասիրվել է ՄՏ-ան (8 մմ տեղաշարժ) և ԳՑՀ ԷՄԴ-ի (0.4 մՏլ) 2-10Հց հաճախությունից կախված ուղղակի և անուղղակի ազդեցությունները բակտերիաների աճի և կենսագործունեության վրա:

<u>Աշխատանքի գիտական նորույթը:</u>

- Ապացուցվել է, որ CO_2-ը ոչ-կրիտիկական կոնցենտրացիայով խթանում է ջրային ավազանների մաքրման համար կիրառվող թույլատրելի շեմին մոտ կոնցենտրացիայով H_2O_2-ի և $Ca(ClO)_2$–ի թունավոր էֆեկտները բակտերիաների մոտ:
- Հաստատվել է, որ CO_2-ի խթանիչ ազդեցությունը պայմանավորված է նրա հիդրատացնող հատկությամբ, որն էլ բերում է բակտերիալ բջիջների մոտ թունավոր նյութերի նկատմամբ զգայունության բարձրացման:
- Էլեկտրոնային մանրադիտակի միջոցով կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքում հաստատվել է, որ քիմիական գործոնների ազդեցությունը դրսևորվում է բջջի արտաքին թաղանթի բնականոն կառուցվածքի փոփոխություններով և բջջի ներսում տարբեր ուլտրակառուցվածքների առաջացմամբ:
- Առաջին անգամ ուսումնասիրվել *E. coli* K-12-ի աճի վրա 2-10Հց հաճախականային տիրույթի ոչ իոնացնող բնույթի ֆիզիկական գործոնների (ԳՑՀ ԷՄԴ և ՄՏ) կենսաբանական ազդեցության որակական և քանակական առանձնահատկությունները և ցույց է տրվել երկու հաճախականային «պատուհանների»՝ 4Հց և 8Հց գոյությունը, որոնց դեպքում դիտվում են ուղղակի և անուղղակի ազդեցության տեսանելի փոփոխություններ:
- Ստացված տվյալների վերլուծությունը հնարավորություն տվեց առաջարկելու արդյունավետ և շահավետ նոր քիմիական մեթոդներ մանէաբանական աղտոտվածությունից ջրի մաքրման համար:

<u>Աշխատանքի տեսական և կիրառական նշանակությունը:</u>

- Ատենախոսական աշխատանքում ստացված արդյունքներն ունեն տեսական նշանակություն, քանի որ նոր հնարավորություններ են ստեղծում բակտերիաների վրա ցածր կոնցենտրացիաներով տարբեր թունավոր նյութերի, ինչպես նաև ոչ իոնացնող բնույթի ֆիզիկական գործոնների ազդեցության մեխանիզմների պարզաբանման հետագա ուսումնասիրությունների համար:
- Աշխատանքն ունի նաև կիրառական նշանակությունը, որը կայանում է նրանում, որ մշակված նոր մեթոդները կարելի է կիրառել ջուրը մանրէաբանական աղտոտվածությունից էկոլոգիապես անվտանգ եղանակով

մաքրելու նպատակով: Այն նաև հնարավոր է հարմարեցնել գոյություն ունեցող ջրի մաքրման մյուս մեթոդների հետ:

- Աշխատանքն արժևորվում է նաև տնտեսական առումով, քանի որ մշակված են համեմատաբար քիչ ֆինանսական ծախսեր պահանջող մեթոդներ ջրային ավազանների մանէազերծման համար:

<u>Պաշտպանությանն առաջադրված հիմնադրույթները:</u>

- CO_2/H_2O_2 համակցված համակարգն ավելի արդյունավետ է ճնշում բակտերիաների աճը, առանձին կիրառվող H_2O_2-ի ազդեցության համեմատ:
- $CO_2/Ca(ClO)_2$ համակցված համակարգն ավելի արդյունավետ է ճնշում բակտերիաների աճը առանձին կիրառվող $Ca(ClO)_2$ -ի համեմատ:
- Բակտերիաների աճի վրա CO_2/H_2O_2 և $CO_2/Ca(ClO)_2$ համակարգերի կողմից դրսևորվող առավել արտահայտված ճնշումը պայմանավորված է CO_2-ով հարուցված բջիջների հիդրատացիայով, որը բերում է H_2O_2 և $Ca(ClO)_2$ մանէասպան նյութերի նկատմամբ բակտերիաների զգայունության բարձրացման:
- Ցածր կոնցենտրացիայով H_2O_2-ը և $Ca(ClO)_2$-ը կարող են բջջի արտաքին թաղանթի բնականոն կառուցվածքի փոփոխությունների և ներբջջային տարբեր ուլտրակառուցվածքների առաջացման պատճառ հանդիսանալ:
- Բակտերիաների վրա 2, 4, 6, 8, 10 Հց հաճախականային տիրույթի ոչ իոնացնող բնույթի ֆիզիկական գործոնների (ԳՑՀ ԷՄԴ և ՄՏ) կողմից անուղղակի և ուղղակի ազդեցության արդյունքում դիտվում է առավել արտահայտված 2 "պատուհանների" առկայություն՝ 4 և 8 Հց հաճախությունների դեպքում:
- 8 Հց ԷՄԴ և ՄՏ-ն ճնշող ազդեցություն են թողնում *E. coli* K-12 աճի վրա, այն դեպքում երբ 4Հց ՄՏ-ն ճնշում, իսկ 4Հց ԷՄԴ-ն ընդհակառակը՝ խթանում է բակտերիաների աճը:

<u>Ատենախոսության փորձաքննությունը:</u> Աշխատանքի հիմնական արդյունքները քննարկվել են ՀՀ ԿԳՆ Բժշկակենսաբանական միջազգային հետբուհական ուսումնական կենտրոնի պարբերական սեմինարներերում և հետևյալ միջազգային գիտաժողովներում, բանավոր կամ ստենդային զեկույցներով. “The Sixth annual conference on the physics, chemistry and biology of water” (Vermont Photonics, USA, October 20-23, 2011), “The impact of emf and infra-sounds at higher background ionizing radiation" (Tsakhkadzor, ra, october 12-15, 2011)՝ 2 բանավոր զեկույց, “2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress” (Diyarbakir-Turkey 5-9 October 2009), “Advances in Environmental & Geological Science & Engineering. Proceedings of the 2nd WSEAS International Conference on ENVIRONMENTAL and GEOLOGICAL SCIENCE and ENGINEERING (EG ’09)” (Transilvania University of Brasov, Romania, September 24-26, 2009), “7th IASME / WSEAS International Conference on HEAT TRANSFER, THERMAL EMGINEERING and ENVIRONMENT (HTE’09)” (Moscow, Russia, August 20-22, 2009), UNESCO/WHO/ONRG SEMINAR, ELECTROMAGNETIC FIELDS: “MECHANISMS OF ACTION AND HEALTH EFFECTS” (24-26 October, 2008, Yerevan, RA):

Հրատարակված աշխատանքները: Հետազոտության հիմնական արդյունքները արտացոլված են 11 գիտական հրատարակություններում, որոնցից 6 հոդված՝ արտասահմանյան գրախոսվող գիտական ամսագրերում և 2 արտոնագիր:

Աշխատանքի կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսական աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, փորձարարական մասից, ստացված արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացությունից, եզրահանգումներից, օգտագործված գրականության ցանկից, որի մեջ ներառված են 167 անուն հղումներ: Աշխատանքում ներկայացված են 29 նկարներ: Այն շարադրված է 102 մեքենագրական էջերի վրա:

ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Նյութեր: Թորած ջուրը (ԹՋ) ստացվել է խմելու ծորակի ջուրը թորման սարքով՝ DE–4–2M (արտադրված է Ռուսաստանի դաշնությունում, Մոսկվա, Պետ. Ստանդարտ 64–1–72–91) թորելու արդյունքում: ԹՋ-ն ունեցել է pH=5.8 ջրածնական ցուցիչ: Մյուս բոլոր լուծույթները պատրաստվել են ԹՋ-ով:

Բրեյի սինտիլյացիոն խառնուրդը պարունակել է 1 Լ-ի հաշվարկով 200 մլ էթանոլ, 4 գ PPO (2,5-դիֆենիլօքսազոլ, Yick-Vik chemicals & pharmaceuticals, Չինաստան), 0.2 գ POPOP (1,4-դի-(5-ֆենիլ-2-օքսազոլ բենզոլ), Yick-Vik chemicals & pharmaceuticals, Չինաստան), 60 գ նավթալին (Химмед, ՌԴ) և ավելացվելով 1,4-դիօքսան (2,5-դիֆենիլօքսազոլ, Yick-Vik chemicals & pharmaceuticals, Չինաստան) ծավալը հասցվել է 1Լ-ի:

Որպես բակտերիաների աճման սննդային միջավայր օգտագործվել է սննդանյութերով հարստացված արգանակ (NEB), որը պարունակել է պեպտոն 15 գ/լ, նատրիումի քլորիդ 6.0 գ/լ, դրոժային էքստրակտ 3.0 գ/լ, pH 7.5 ± 0.2, 37°C-ում, և սննդանյութերով հարստացված ագար (NEA), որը պարունակել է՝ NEB + 1.5% ագար (Difco), pH 7.1 ± 0.2, 37°C-ում:

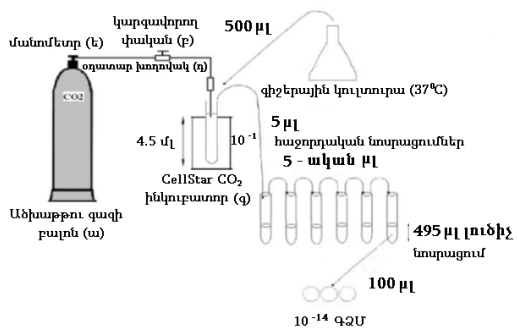
Հետազոտման օբյեկտը՝ բակտերիալ շտամը: Որպես հետազոտման օբյեկտ վերցրվել է *Escherichia coli* K-12 վայրի շտամը (Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, ԳԱԱ, ՀՀ): Այն գերազանց մոդել է այս աշխատանքում հետազոտություններ կատարելու համար, որովհետև *E. coli*-ն լայն տարածում ունի բնության մեջ, ջրային համակարգերում՝ հատկապես երկրագնդի արևադարձային շրջաններում, և նրա պաթոգեն ձևերը հանդիսանում են ջրի ախտոտման հիմնական չափանիշ:

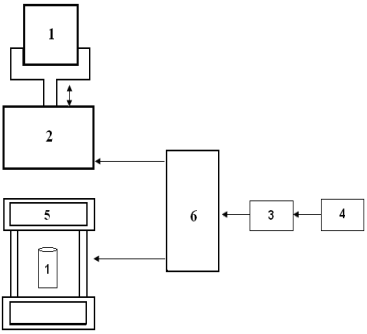
Սարքերի և փորձերի նկարագրությունը

CO_2/H_2O_2-ով և $CO_2/Ca(ClO)_2$-ով մշակման համար կիրառված սարքավորումները և փորձի նկարագրությունը: Օգտագործված սարքավորումը բաղկացած է 50 լ տարողությամբ CO_2-ի բալոնից (նկ. 1 ա), օդատար խողովակից, իր կարգավորող փականով (նկ. 1 բ) և “CellStar” CO_2-ի համար նախատեսված ինկուբատորից (նկ. 1 գ) (USA, Model: SWJ500TV BA), որտեղ տեղադրվում են CO_2-ի մշակման համար նախատեսված նմուշները: Բոլոր նմուշները, որոնք տեղադրվել են “CellStar” ինկուբատորում, մշակվել են CO_2-ով՝ տարբեր ժամանակային միջակայքերում (0; 5;

10; 20 և 30 րոպե): Ստուգիչ նմուշները ևս տեղադրվում են CO_2-ի ինկուբատորի մեջ, բայց փակ վիճակում: CO_2-ը բալոնից օդատար խողովակով լցվում է ինկուբատորի մեջ, խողովակի ծայրին տեղադրված է փական, որը դիմակայուն է բարձր ճնշմանը (նկ. 1 դ), և այդ փականի վրա տեղադրված է մանոմետր (նկ. 1 ե), որը հնարավորություն է տալիս չափել ճնշումը: Ընդ որում ճնշումը բալոնում կարող է լինել 5.0 կՊԱ-ից մինչև նորմալ մթնոլորտային ճնշում, և փորձերի ընթացքում ճնշումը կարգավորվում է և պահվում հաստատուն արժեքի վրա:

նկ. 1 **նկ. 2**





Նկար 1: Բակտերիալ կուլտուրայի մեջ CO_2-ի մատակարարման և բակտերիալ կուլտուրայի հաջորդական նոսրացումների սխեմատիկ պատկերումը:

Նկար 2: ԳՁՀ ԷՄԴ և ՄՏ-ով նմուշների մշակման համար նախատեսված սարքավորման սխեմատիկ նկարագրությունը. (1)*7 սմ տրամագծով և 50 մլ ծավալով ապակե փորձանոթ*; (2) *վիբրատոր*; (3)*աղմկամեղմիչ ուժեղարար Biophys PA,* (4) *հաճախականային գեներատոր Գ3-118,* (5) *Հելմհոլցի օղակներ*; (6) *անջատիչ (ունի 2 դիրք: I և II, որտեղ I-ԷՄԴ և II-ՄՏ)*:

ԳՁՀ ԷՄԴ և ՄՏ–ով մշակման համար նախատեսված սարքավորման նկարագրությունը: Գերցածր հաճախության ԷՄԴ-ի և ՄՏ-ի աղբյուրը, որի միջոցով բակտերիալ կուլտուրան մշակման է ենթարկվել, պատրաստվել է ԳԱԱ ռադիոֆիզիկայի և էլեկտրոնիկայի ինստիտուտի մասնագետների կողմից (նկ. 2):

7 սմ տրամագծով և 50 մլ ծավալով ապակե փորձանոթը (1) ֆիքսվել է վիբրատորի բռնակներին (2), որպես ՄՏ-ան աղբյուր և նույն չափերի փորձանոթը դրվել է Հելմհոլցի 2 օղակների մեջ՝ որպես ԳՁՀ ԷՄԴ-ի աղբյուր (5): Վիբրատորը և կոճը միացված են գեներատորին (4) (Գ3-118, արտադրված ՌԴ), որը կարգավորում է նրանց աշխատանքը: Ազդակը գնում է դեպի միացնող և անջատող սարք, որն ունի 2 դիրք՝ 1-ին դիրքը տալիս է ԷՄԴ, իսկ 2-րդը՝ ՄՏ: Գեներատորը առաջացնում է հարմոնիկ ազդանշան, աղմկամեղմիչ ուժեղարարը (6) (Biophys PA, արտադրված՝ ՀՀ ԳԱԱ ռադիոֆիզիկայի և էլեկտրոնիկայի ինստիտուտ) ուժեղացնում է այն և ուղարկում մի դեպքում Հելմհոլցի օղակներին (5), իսկ մյուս դեպքում հաճախականային վիբրատորին (2) առաջացնելով ՄՏ: Վիբրատորը տալիս է ինֆրաձայնային տիրույթի ուղղահայաց տատանումներ: Տատանումները (8 մմ

տեղաշարժ) հաստատուն պահելու համար վիբրատորը հետադարձ կապով միացված է ուժեղացուցիչին (3): ԷՄԴ առաջանում է կոճում (5), որը կարգավորվում է գեներատորով և ցածր-ձայնային ուժեղացուցիչով: Հելմհոլցի օղակների միջև առաջանում է հոմոգեն մագնիսական դաշտ (0.4 մՏլ): Այսպիսով, օղակներում առաջանում է համասեռ (տարածական իմաստով) փոփոխական (ըստ ժամանակի) ԷՄԴ: Հելմհոլցի օղակները կազմված են երկու հավասար օղակային կոճերից, որոնք դասավորված են համակենտրոն և զուգահեռ, իսկ նրանց միջև հեռավորությունը կազմում է 50 մմ: Կոճերը տալիս են գլանի տեսք 154 մմ տրամագծով և 100 մմ բարձրությամբ:

Մանրէների քանակի գնահատումը: *E. coli* K-12-ի կենդանի բջիջների քանակը գնահատվել է՝ օգտագործելով դասական մանրէաբանական մեթոդ (գաղութներ ձևավորող միավորների հաշվարկ (ԳՁՄ կամ CFUs) յուրաքանչյուր միլիլիտրում): Չափման տեխնիկան ներառում է հաջորդական նոսրացումներ և ցանքս Պետրիի թասիկների վրա, ընդ որում վերջնական նոսրացումից հետո կատարվել է ցանքս Պետրիի 3 թասիկների վրա: Այնուհետև այդ թասիկները տեղափոխվել են թերմոստատ և ինկուբացվել մոտ 18 ժամ (37°C): Այնուհետև կատարվել է գաղութներ ձևավորող միավորների թվի հաշվարկ: Նույն մոտեցումն է օգտագործվել նաև ստուգիչ տարբերակում գաղութներ ձևավող միավորների հաշվարկման համար: Բացի ԳՁՄ-երի հաշվարկից բակտերիաների քանակը գնահատվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդով՝ 590 նմ ալիքի երկարության տիրույթում բակտերիալ կախույթի օպտիկական խտության գնահատման ճանապարհով:

Ռադիոակտիվ նշված [^3H]-թիմիդինի օգտագործում բջջի պրոլիֆերացիան գնահատելու համար: Վերոնշյալ մշակումների ժամանակ բջջի պրոլիֆերացիան գնահատելու համար բակտերիալ կուլտուրան աճեցվել է 100 մլ սննդային միջավայրում, 18 ժամ 37°C-ում: Այնուհետև այդ գիշերային կուլտուրայից վերցրվել է 1 մլ (10^{10} CFUs/մլ) և ավելացվել 30 մլ հեղուկ սննդային միջավայրում, որը նախապես պարունակել է 40 μլ [^3H]-թիմիդին (1.3 μCi/մլ) (6-[^3H]-թիմիդին, PerkinElmer, Boston, MA, 14.4 Ci/մմոլ սպեցիֆիկ ակտիվություն): [^3H]-թիմիդին պարունակող նմուշներն այնուհետև մշակվել են և տեղափոխվել թերմոստատ, որտեղ մնացել են 18 ժամ, 37°C-ում: Ինկուբացիայից հետո [^3H]-թիմիդինի մուտքը դեպի բջիջ դադարեցվել է օգտագործելով սառը եռքլորքացախաթթու (10%, ԵՔՔ): Այնուհետև նմուշները ֆիլտրվել են 0.45-մմ-անցքեր ունեցող ֆիլտրով (Sartorius) և լվացվել 3 անգամ 4.5-ից 5.5 մլ սառը ԵՔՔ–ով (10%), որից հետո նմուշները տեղավորվել են հատուկ նախատեսված փորձանոթներում և յուրաքանչյուրի վրա ավելացվել է 3 մլ Բրեյի սինցիլյացիոն կոկտել և ռադիոակտիվությունը գրանցվել է՝ օգտագործելով Wallac 1450 հեղուկ սինցիլյացիոն հաշվիչը (Turku, Finland):

Միջավայրում CO_2-ի կոնցենտրացիայի գնահատման մեթոդ: Այս մեթոդի հիմքում ընկած է CO_2-ով միջավայրի թթվայնության չեզոքացման համար օգտագործված հիմքի քանակի հաշվման սկզբունքը, նշեմ, որ որպես հիմք օգտագործվել է NaOH (Portier and Rochelle 2005):

Էլեկտրոնային մանրադիտակով բակտերիաների մոտ մորֆոլոգիական փոփոխությունների գնահատում: Բակտերիալ բջիջների մորֆոլոգիական

փոփոխությունները գնահատվել է էլեկտրոնային մանրադիտակի օգնությամբ: Ուլտրանուրբ կտրվածքները ստացվում են “Reichert” “Ultracut-Young” սարքի միջոցով կտրվածքներ անելով և ուրանիլ ացետատի և կապարի ցիտրատով գունավորման միջոցով: Այս ուլտրանուրբ կտրվածքները ուսումնասիրվում են էլեկտրոնային մանրադիտակով Tesla BS-500 (Czechoslovakia): Ստացված պատկերները սկանավորվել են և այնուհետև մշակվել Corel Draw (versions 11) և Photoshop (versions 8) համակարգչային ծրագրերով, իսկ պատկերների համակարգչային մորֆոմետրիկ և ստերիոմետրիկ անալիզները իրականացվել են “Video Test Structure-5, nanotechnology” համակարգչային ծրագրով:

Արդյունքների վերարտադրություն: Բոլոր փորձերը կրկնվել են 9 անգամ: Գրաֆիկները կառուցվել են օգտագործելով այդ 9 անկախ փորձերի միջին արժեքները՝ իրենց ստանդարտ շեղումներով:

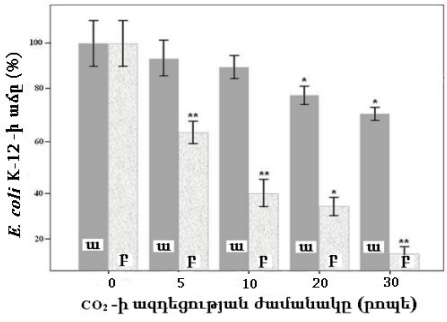
Վիճակագրական վերլուծություն: Վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է SPSS 17.0 ծրագրով: Եվ միջինների միջև տարբերությունը գնահատվել է օգտագործելով նմուշների համեմատման *T*-թեստը և աստղիկների (*) օգնությամբ գրաֆիկներում պատկերվել են տվյալների հավաստիությունը (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$):

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

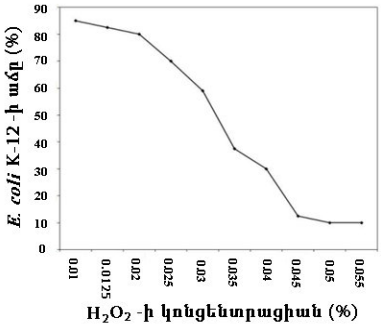
CO_2-ով H_2O_2-ի թունավոր էֆեկտների խթանում մանրէների մոտ՝ որպես նոր մեթոդ ջրի մանրէաբանական մաքրման համար: Ներկայումս H_2O_2-ի բարձր կոնցենտրացիաները (>3%) և CO_2-ի կրիտիկական բարձր կոնցենտրացիաները **($SCCO_2$)** օգտագործվում են որպես հակաբակտերիալ միջոցներ: Այն փաստը, որ CO_2-ը ոչ կրիտիկական բարձր կոնցենտրացիաներով կարող է խթանել բակտերիաների մետաբոլիկ ակտիվությունը, իսկ մյուս կողմից հայտնի է, որ օքսիդիչների՝ ինչպիսին է H_2O_2-ի ազդեցությունը, կախված է բջջի նախնական մետաբոլիկ վիճակից, ապա առաջարկվեց CO_2-ն օգտագործել որպես H_2O_2-ի նկատմամբ բակտերիաների զգայնությունը բարձացնող միջոց: Այս վարկածի ստուգման համար ուսումնասիրվեց H_2O_2-ի թունավոր հատկությունները *E. coli* K-12 վայրի շտամի վրա, CO_2-ով հարստացված միջավայրում: Քանի որ CO_2-ը լուծվում է միջավայրում, բերելով միջավայրի թթվեցման, առաջացնելով թթուներ, ապա նրա ուղղակի ազդեցությունը պարզելու համար անհրաժեշտ է պահպանել միջավայրի pH-ը հաստատուն՝ բացառելով վերջինիս ազդեցությունը բակտերիաների ինակտիվացման պրոցեսում: Միջավայրի pH-ի կայուն արժեքները ապահովվել են NaOH (0.1 մոլ/լ) ավելացնելու եղանակով՝ CO_2-ով մշակման դեպքում: Նշեմ, որ միջավայրի pH-ը պահվել է հաստատուն 6 արժեքում (pH = 6.0), որովհետև այս արժեքի դեպքում *E. coli*-ն ցուցաբերում է մաքսիմալ աճ (Presser et. al., 1997): Այսպիսով, CO_2-ի ուղղակի ազդեցությունը գտնելու համար նախ ուսումնասիրվել է CO_2-ի ազդեցությունը *E. coli* K-12-ի վրա pH-ը 6 արժեքի պայմաններում (pH = 6.0) (CO_2 = 0.55 մոլ/լ) (նկ. 3, ա սյունակներ): Նույն նկարը ևս ցուցադրում է CO_2-ի անուղղակի ազդեցությունը բակտերիաների վրա, միջավայրի pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում՝ համապատասխանաբար 0 պահ (pH = 7.29; CO_2 = 0.11 մոլ/լ), 5.0 բոպե (pH = 6.34; CO_2

= 0.51 մոլ/լ), 10 րոպե (pH = 5.66; CO_2 = 0.81 մոլ/լ), 20 րոպե (pH = 5.65; CO_2 = 0.84 մոլ/լ), 30 րոպե (pH = 5.61, CO_2 = 0.85 մոլ/լ) (նկ. 3, բ յունակներ): Միջավայրում լուծված CO_2-ի քանակը որոշվել է տիտրման մեթոդով՝ օգտագործված հիմքի քանակության հաշվարկի հիման վրա:

նկ. 3



նկ. 4



Նկար 3: *E. coli* K-12 բակտերիաների աճը (%) կախված CO_2-ի ազդեցության տևողությունից (0, 5.0, 10, 20 և 30 րոպե) համեմատած ստուգիչի հետ (0 պահ), **(ա)** յունակները ցուցադրում են CO_2-ի ուղղակի և **(բ)** յունակներն անուղղակի ազդեցությունը բակտերիաների աճի վրա: Տվյալ մշակման *p* արժեքը 0.01 (**), 0.05 (*) է և անկախ փորձերի թիվը 9:

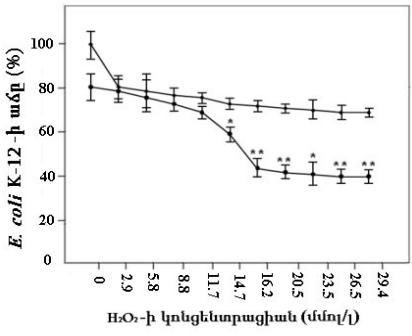
Նկար 4: H_2O_2–ի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը *E. coli* K-12 աճման վրա (%). Գրաֆիկում պատկերված են 9 անկախ փորձերի միջին արժեքները:

Ուսումնասիրել ենք *E. coli* K-12-ի աճը որպես ֆունկցիա CO_2 ազդեցության տևողությունից: Կենդանի բջիջների քանակը համեմատվել է CO_2-ով մշակումից առաջ (0 պահ) և հետո ու այն ներկայացվել է տոկոսներով (նկ. 3): CO_2-ով մշակումից հետո նմուշները տեղադրվել են թերմոստատ 20°C 2 ժամ տևողությամբ, այնուհետև կատարվել է ցանքս և որից հետո Պետրիի թասիկները տեղադրվել են թերմոստատ 37°C, 18 ժամ, այնուհետև հաշվվել է գաղութներ ձևավորող միավորների թիվը (10^{10} ԳՁՄ/մլ): Մշակման 0 պահը, այսինքն այն պահը, երբ միջավայր չի ներմուծվել CO_2, ընդունվել է որպես ստուգիչ: Փորձերի ընթացքում նկատվել է, որ բջիջների ինակտիվացման տոկոսը ավելանում է CO_2-ի ազդեցության տևողության մեծացման զուգահեռ, և բակտերիալ կուլտուրան 30 րոպե CO_2-ով հաստացնելուց հետո դիտվել է մոտ 50 % բակտերիաների աճի ճնշում:

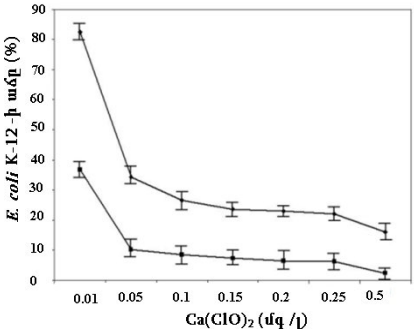
Հաջորդ խումբ փորձերում ուսումնասիրվեց H_2O_2-ի ազդեցությունը *E. coli* K-12-ի աճման վրա: Հայտնի է, որ H_2O_2-ի ազդեցությունը *E. coli*-ի վրա կախված է նրա կոնցենտրացիայից: Օքսիդիչի ցածր կամ բարձր կոնցետրացիաները բերում են թթվածնի ակտիվ ձևերի առաջացման, որոնք էլ և բերում են բջջի մահ երկու տարբեր մեխանիզմներով՝ ցածր կոնցենտրացիաներն առաջացնում են ֆիլամենտներ, այսինքն բջիջները կիսվելուց չեն հեռանում, իսկ բարձր կոնցենտրացիաները բերում են բջիջների ծավալի փոքրացում, նրանք կծկվում են (Asad et al., 1998; Brandi et al.,

1989; Hegde et al., 2008): Այս աշխատանքում փորձ արվեց մեծացնել բակտերիաների զգայունությունը H_2O_2-ի փոքր կոնցենտրացիաների նկատմամբ՝ միջավայրը նախապես CO_2-ով հարստացնելու եղանակով: Ուսումնասիրվել է նաև H_2O_2-ի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը *E. coli* K-12-ի աճման վրա (նկ. 4): H_2O_2-ով բակտերիաների մշակման համար նախատեսված մայրական լուծույթը պատրաստվել է անմիջապես փորձերը սկսելուց առաջ և ավելացվել բակտերիալ միջավայր՝ վերջնական ծավալում համապատասխան կոնցենտրացիաներով՝ 0 - 16.2 մմոլ/լ (կամ 0.055 - 0.01%): Մշակումից հետո նմուշները տեղափոխվել են թերմոստատ և այնտեղ մնացել 2 ժամ 20°C-ի պայմաններում: Ինկուբացիայից հետո իրականացվել է ցանքս Պետրիի թասիկների վրա: Ընդ որում նշեմ, որ Պետրիի թասիկները տեղափոխվել են թերմոստատ և այտնեղ մնացել 18 ժամ 37°C-ի պայմաններում, որից հետո հաշվարկվել է գաղութներ ձևավորող միավորների թիվը: H_2O_2-ով մշակված նմուշների ԳՁՄ-երը համեմատվել է 0 պահին (ստուգիչ) ԳՁՄ-ի հետ և արտահայտվել տոկոսներով (նկ. 4): Ինչպես երևում է նկ. 4-ից ինչքան բարձր է H_2O_2-ի կոնցենտրացիան այնքան մեծ է բակտերիաների ինակտիվացման աստիճանը: Հետևաբար անհրաժեշտ էր գտնել այնպիսի այլընտրանքային մոտեցում, որով հնարավոր կլիներ բարձրացնել բակտերիաների զգայունությունը H_2O_2-ի ցածր կոնցենտրացիաների նկատմամբ: Այդ պատճառով առաջարկվեց օգտագործել CO_2/H_2O_2-ի համակցված համակարգը և ուսումնասիրել այս համակարգի հակաբակտերիալ ազդեցությունը *E. coli* K-12 բակտերիաների աճման վրա: Դիտվել է H_2O_2-ի ցածր կոնցետրացիաների ազդեցությունը *E. coli* K-12-ի մոտ 30 րոպե տևողությամբ CO_2-ով հարստացված միջավայրում (նկ. 5, **(•)**), և CO_2 չպարունակող միջավայրում (նկ. 5, **(♦)**):

նկ. 5



նկ.6



Նկար 5: H_2O_2-ի տարբեր կոնցենտրացիաների (մմոլ/լ) ազդեցությունը *E. coli* K-12 (%) բակտերիաների աճման վրա 30 րոպե CO_2-ով հարստացված միջավայրում **(•) և** CO_2 չպարունակող միջավայրում (♦): p = 0.01 (**), p = 0.05 (*), n = 9:

Նկար 6: $Ca(ClO)_2$ -ի տարբեր կոնցենտրացիաների (մգ/լ) ազդեցությունը *E. coli* K-12 (%)-ի աճման վրա 10 րոպե CO_2-ով հարստացված միջավայրում (■) և CO_2 չպարունակող միջավայրում (♦): Կորերը կառուցվել են մշակման արդյունքները համեմատելով ստուգիչի հետ (100 % աճ), իսկ հավաստիությունը 0.01 (**) է:

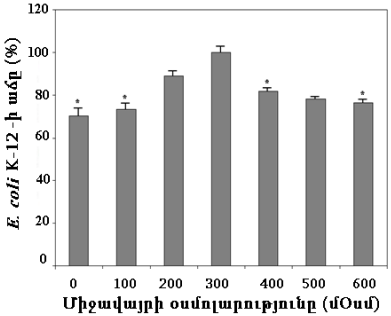
Ստացված արդյունքները (նկ. 5) հստակ ցույց են տալիս, որ CO_2-ով հնարավոր է բարձրացնել H_2O_2-ի թունավոր հատկությունների նկատմամբ բակտերիաների զգայունությունը և այս մեթոդը հնարավոր է կիրառել արհեստական ջրավազանների ջուրը մանրէաբանական աղտոտվածությունից մաքրման համար: Հետևաբար, CO_2/H_2O_2-ի համակցված ազդեցությունն ունի ոչ միայն ֆունդամենտալ և տեսական կարևորություն, այլ նաև բավականին հեռանկարային կիրառական նշանակություն՝ էկոլոգիապես անվտանգ եղանակ ջրի մանրէազերծման համար:

CO_2-ով $Ca(ClO)_2$-ի թունավոր էֆեկտների խթանում *Escherichia coli* K-12 մոտ: Ելնելով այն փաստից, որ $Ca(ClO)_2$-ը իր ազդեցության բնույթով ևս օքսիդիչ է, ենթադրվեց, որ նրա ազդեցությունը բջջի վրա նույնպես կախված կլինի բջջի նախնական մետաբոլիկ վիճակից: Հետևաբար, առաջարկվեց այստեղ ևս օգտագործել CO_2-ը նրա թունավոր հատկությունների նկատմամբ *E. coli* K-12-ի ցուցաբերած զգայունության բարձրացման համար: Հայտնի է, որ քլորի ախտահանիչ ազդեցությունը կախված է նրա կոնցենտրացիայից (Cho et. al, 2010; Virto et al., 2005): Եվ քանի որ այս աշխատանքի նպատակն էր գտնել միջոց, որով հնարավոր կլիներ բարձրացնել քլորի ցածր կոնցենտրացիաների նկատմամբ բակտերիաների զգայունությունը, ապա ուսումնասիրվեց $Ca(ClO)_2$ (մգ/լ)-ի ցածր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը մանրէների մոտ 10 րոպե CO_2-ով հարստացված միջավայրում և CO_2 չպարունակող միջավայրում (նկ. 7):

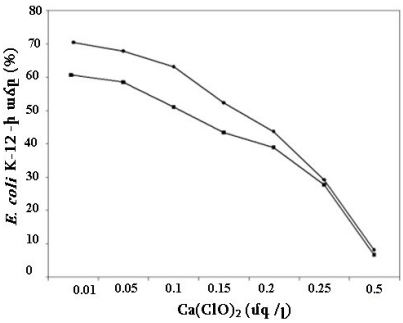
Նկ. 7-ից կարելի է տեսնել, որ CO_2-ով հարստացումն ընդհանուր առմամբ հանգեցնում է բակտերիաների վրա $Ca(ClO)_2$-ի “սպանիչ” հատկությունների ավելի խորը դրսևորման: Սակայն այդ տարբերությունն առավել ցայտուն է դրսևորվում $Ca(ClO)_2$-ի համեմատաբար ցածր կոնցենտրացիաների (<0,1 մգ/լ) դեպքում, այն դեպքում, երբ միջին կոնցենտրացիաների ժամանակ (0,1-0,25 մգ/լ) մնում է համեմատաբար կայուն մակարդակի վրա (15%) և նվազում է բարձր կոնցենտրացիաներ կիրառելիս (>0,25 մգ/լ): Այս տվյալները թույլ են տալիս ենթադրելու, որ հնարավոր է այստեղ գործում են 2 տարբեր մեխանիզմներ: Առաջարկվում է, որ CO_2-ով $Ca(ClO)_2$-ի համեմատաբար ցածր կոնցենտրացիաների նկատմամբ բակտերիաների մոտ զգայունության բարձրացումը կարող է պայմանավորված լինել CO_2-ի միջոցով բջջի նյութափոխանակության խթանմամբ կամ բջջի ծավալի մեծացմամբ, և որն էլ հանդիսանում է որպես $Ca(ClO)_2$-ի ազդեցության հիմնական թիրախ: Այդ իսկ պատճառով ուսումնասիրվեց բակտերիաների աճը տարբեր օսմոլարություն ունեցող միջավայրերում (0 - 600 մՕսմ): Ընդ որում միջավայրի օսմոլարությունը փոխվել է միջավայրում սախարոզա ավելացմամբ, քանի որ այն չի յուրացվում *E. coli* K-12-ի կողմից՝ որպես ածխածնի աղբյուր (Smith and Parsell 1975): Միևնույն ժամանակ այն չի կարող փոխել արտաքին միջավայրի իոնային ուժը, ինչը շատ կարևոր է ֆերմենտների նորմալ գործունեության համար: Մյուս կողմից սախարոզը չունի բջջի համար ոչ մի օսմո-

պաշտպանիչ հատկություններ, այն միայն կարող է փոխել արտաքին միջավայրի օսմոլարությունը:

նկ. 7



նկ. 8



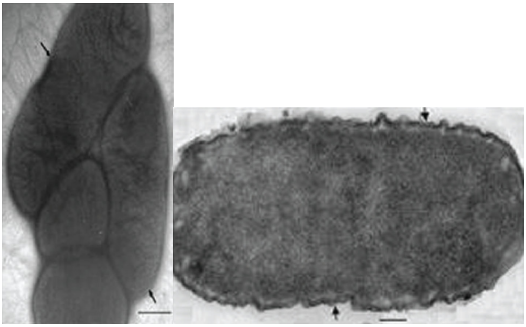
Նկար 7: *E. coli* K-12 -ի աճը (%) տարբեր օսմոլարություն ունեցող միջավայրերում (0-600 մՕսմ): *p* արժեքը նմուշների 0.05 (*) է (նմուշները համեմատվել են ստուգիչի հետ (300 մՕսմ-ում նկատվել է մաքսիմալ աճ (100 %)):

Նկար 8: $Ca(ClO)_2$-ի տարբեր կոնցենտրացիաների (մգ/լ) ազդեցությունը E. coli *K-12* բակտերիաների աճի վրա (%) հիպոտոնիկ միջավայրում (150 մՕսմ (■)) և հիպերտոնիկ միջավայրում (500 մՕսմ (●)): Մշակումների *p* արժեքը 0.01 (**) է (100 մՕսմ-ում և 500 մՕսմ -ում ստավցած արժեքները համեմատվել են ստուգիչի հետ):

Բջջի հիդրատացիայի աստիճանի մեծացմամբ պայմանավորված $Ca(ClO)_2$-ի նկատմամբ բակտերիաների զգայունության մեծացման մեխանիզմները հասկանալու համար բակտերիաներն աճեցվեցին հիպո- և հիպերտոնիկ միջավայրերում: Վերևում նկարագրված փորձերի արդյունքում պարզ դարձավ, որ 300 մՕսմ -ը *E. coli* K-12-ի համար համարվում է այն միջավայրը, որտեղ նրանք ցուցաբերում են լավագույն աճ (նկ. 7), հետևաբար 150 մՕսմ-ը կարելի է ընդունել որպես հիպոտոնիկ, իսկ 500 մՕսմ-ը՝ որպես հիպերտոնիկ միջավայրեր *E. coli* K-12-ի համար: Բակտերիաների աճը գնահատվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով 590 նմ ալիքի երկարության տակ օպտիկական խտության գնահատման միջոցով (OD_{590}): Այսպիսով վերոնշյալ վարկածի պարզաբանման համար ուսումնասիրվեց $Ca(ClO)_2$-ի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը մանրէների մոտ հիպո- (150 մՕսմ) և հիպերտոնիկ (500 մՕսմ) միջավայրերում (նկ. 8): Ինչպես երևում է և CO_2-ով մշակման դեպքում (նկ. 7), և հիպոտոնիկ միջավայրում (նկ. 8) $Ca(ClO)_2$-ի թունավոր էֆեկտներն ավելի նկատելի են քլորի փոքր կոնցենտրացիաների՝ > 0,25մգ/լ դեպքում: Հետևաբար, գրականության մեջ առկա տվյալների (Debs-Louka et al., 1999) և ներկա աշխատանքի շրջանակներում իրականացված գիտափորձերի արդյունքների հիման վրա հնարավորություն ստեղծվեց եզրակացնելու, որ CO_2-ով հարուցված հիդրատացման աստիճանի փոփոխությունը այն հիմնական ֆունդամենտալ մեխանիզմն է, որը բերում է մանրէների մոտ $Ca(ClO)_2$-ի նկատմամբ զգայունության բարձրացման: Այն կարող է իրականանալ 2 հիմնական

ճանապարհով՝ բջջի ուռչեցմամբ՝ մեծացնելով մեմբրանների հետ կապված քեմոռեցեպտորների թիվը (Ayrapetyan and Arvanov 1979) կամ ակտիվացնելով ներբջջային նյութափոխանակային գործընթացները (Kumagai et al.,1997; Parsegian et al., 2000): Եվ այս ֆենոմենը կարող է օգտագործվել միջավայրում ջուրը մանրէաբանական աղտոտվածությունից էկոլոգիապես անվաս եղանակով մաքրման համար:

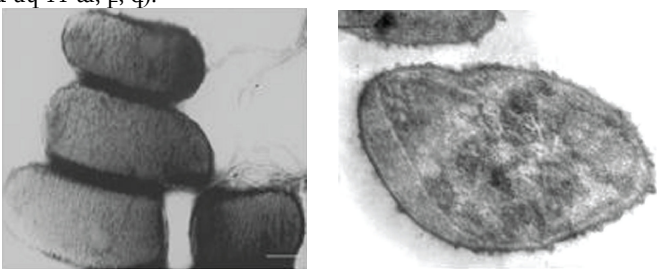
***E. coli* K-12 –ի մոտ CO_2, H_2O_2, and $Ca(ClO)_2$-ի առաջացրած մորֆոլոգիական փոփոխությունների ուսումնասիրությունը էլեկտրոնային մանրադիտակով:** Չմշակված *E. coli* K-12-ի կուլտուրայի կամ ստուգիչի ուսումնասիրությունները էլեկտրոնային մանրադիտակով ցույց են տվել, որ բջիջներն ունեն այնպիսի ուլտրակառուցվածքներ, որոնք բնորոշ են գրամ-բացասական բակտերիաներին (նկ. 9 (ա) և (բ)):



ա բ

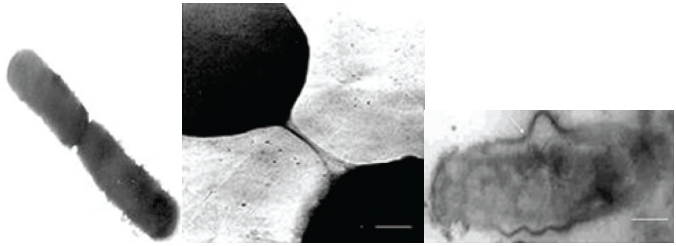
Նկար 9: Էլեկտոնային մանրադիտակով մորֆոլոգիական ուսումնասիրություններ նատիվ *E. coli* K-12-ի: (ա) – բացասական գունավորում և (բ) ուլտրանուրբ կտրվածք: Չափման միջակայքը (ա, բ) = 1մմ:

E.coli K-12-ի ուլտրակառուցվածքի անալիզը ցույց է տալիս, որ տարբեր ախտահանիչ նյութերը ինչպիսիք են CO_2, H_2O_2 և $Ca(ClO)_2$, առաջ են բերում մեմբրաններում և ցիտոպլազմայում ուլտրակառուցվածքների փոփոխություններ: CO_2-ով մշակումը առաջ բերում է բջջաթաղանթի կառուցվածքային խափանումներ (նկ. 10 ա, բ և նկ 11 ա, բ, գ):



ա բ

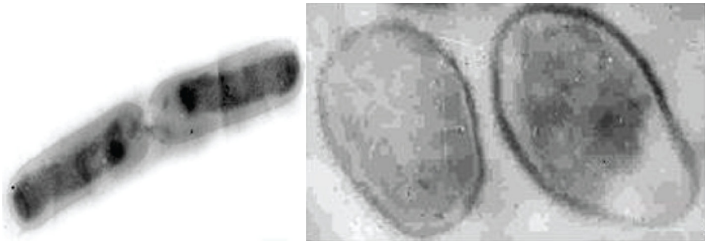
Նկար 10: Էլեկրտոնային մանրադիտակով *E. coli* K-12-ի մոտ CO_2-ի առաջացրած մորֆոլոգիական փոփոխությունները: (ա) – բացասական գունավորում և (բ) ուլտրանուրբ կտրվածք՝ վերցրվել է արտաքին թաղանթը և պերիպլազմատիկ տարածությունը: Չափման միջակայքը (ա, բ) = 1մմ:



ա բ գ

Նկար 11: Էլեկտոնային մանրադիտակով *E. coli* K-12-ի մոտ CO_2-ի առաջացրած մորֆոլոգիական փոփոխությունները: (ա) – բացասական գունավորում և (բ) բջիջների միջև առաջացող կամրջակներ, (գ) ուլտրանուրբ կտրվածք: Չափման միջակայքը (ա, բ) = 1մմ:

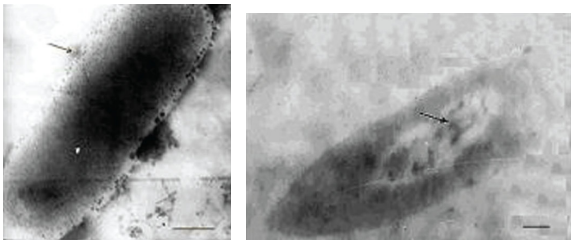
Ցույց է տրվել նաև H_2O_2-ի ազդեցությունը *E. coli* K-12-ի վրա: Այն ևս առաջացնում է արտաքին թաղանթի կառուցվածքաֆունկցիոնալ փոփոխություններ՝ մեծացնելով թաղանթի թափանցելիությունը (նկ. 12 ա, բ):



ա բ

Նկար 12: Էլեկտոնային մանրադիտակով *E. coli* K-12-ի մոտ H_2O_2-ի առաջացրած մորֆոլոգիական փոփոխությունները: (ա) – բացասական գունավորում և (բ) ուլտրանուրբ կտրվածք՝ վերցրվել է արտաքին թաղանթը և պերիպլազմատիկ տարածությունը: Չափման միջակայքը (ա, բ) = 1մմ:

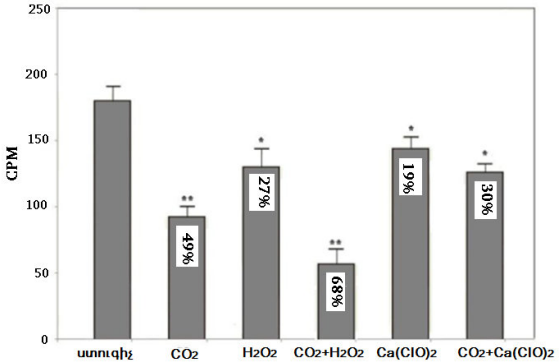
Մյուս կողմից ցույց տրվեց, որ $Ca(ClO)_2$-ը նույնպես *E. coli* K-12 –ի մոտ առաջացնում է արտաքին թաղանթի կառուցվածքային փոփոխություններ: Բացի այդ ցիտոպլազմայում նկատվում են գրանուլյար կառուցվածքներ (նկ 13 ա, բ):



ա բ

Նկար 13: Էլեկտրոնային մանրադիտակով *E. coli* K-12-ի մեթ $Ca(ClO)_2$-ի առաջացրած մորֆոլոգիական փոփոխությունները: (ա) – բացասական գունավորում և (բ) ուլտրանուրբ կտրվածք՝ վերցրվել է արտաքին թաղանթը և պերիպլազմատիկ տարածությունը: Չափման միջակայքը (ա, բ) = 1մմ:

Ռադիոակտիվ *[3H]*-թիմիդինի կիրառությունը որպես CO_2/H_2O_2 և $CO_2/Ca(ClO)_2$ համակարգերի ազդեցությունը բակտերիալ բջջի պրոլիֆերացիայի գնահատման եղանակ: *[³H]*-թիմիդինը օգտագործվել է վերոհիշյալ մշակումների ժամանակ բջիջների պրոլիֆերացիան գնահատելու համար և ինչպես երևում է նկ.14-ից բոլոր դեպքերում նկատվել է բակտերիաների աճի ճնշում: CO_2-ը ճնշում է բակտերիաների աճը 49%-ով համեմատած ստուգիչի հետ, H_2O_2-ը՝ 27%-ով, CO_2/H_2O_2 համակարգը՝ 68%-ով, $Ca(ClO)_2$-ը՝ 19%-ով, իսկ $CO_2/Ca(ClO)_2$-համակարգը՝ 30%-ով (նկ. 14):

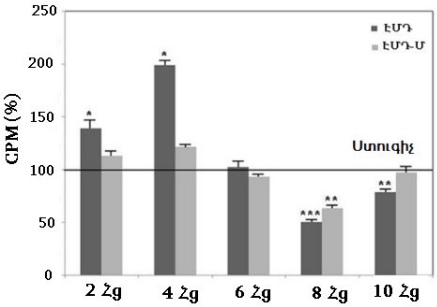


Նկար 14: Բակտերիալ բջջի պրոլիֆերացիայի գնահատումը *[³H]*-թիմիդինի օգնությամբ: Գրաֆիկի վրա պատկերված արժեքներն իրենցից ներկայացնում են 9 անկախ փորձերի միջիններն իրենց ստանդարտ շեղումներով:

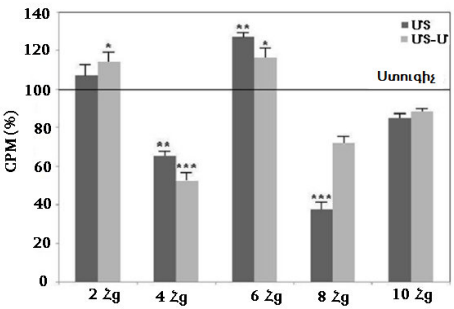
ԴՆԹ-ի հետ ռադիոակտիվ *[³H]*-թիմիդինի կապման մեթոդը որպես բակտերիաների աճի վրա ԳՑՀ ԷՄԴ-ի և ՄՏ-ի ազդեցությունը գնահատման մեթոդ: Ներկայացվող բաժնում քննարկվում է հաճախությունից կախված ԳՑՀ ԷՄԴ-երի կենսաբանական ազդեցությունը, որպես ոչ իոնացնող ֆիզիկական գործոն միաբջիջ համակարգերի

վրա: Ցույց է տրվել, որ հաճախությունից կախված ԳՑՀ ԷՄԴ կարող է խթանել կամ ճնշել բակտերիաների աճը: Սակայն, այն մեխանիզմը, ըստ որի ԳՑՀ ԷՄԴ ազդում է բակտերիալ բջիջների վրա դեռ վերջնականապես պարզաբանված չեն: Առաջարկում է, որ ջրային միջավայրը կարող է ծառայել որպես թիրախ, որի միջոցով իրականանում է ԳՑՀ ԷՄԴ կենսաբանական ազդեցությունը մանրէների մոտ: Այս վարկածի ստուգման համար ուսումնասիրվեց բակտերիաների աճը կախված ԳՑՀ ԷՄԴ հաճախականությունից (2, 4, 6, 8, 10 Հց, B = 0.4 մՏլ, 30 րոպե) երկու հիմնական դեպքերի համար՝ ուսումնասիրվեցին ԳՑՀ ԷՄԴ-ի ուղղակի և անուղղակի ազդեցությունները: Ուղղակի ազդեցության ժամանակ բակտերիալ սննդային միջավայրը և բակտերիաների գաղութները սննդային միջավայրում ենթարկվում են մշակման ԷՄԴ-ով, իսկ անուղղակի աղդեցության դեպքում բակտերիալ սննդային միջավայրը նախապես մշակվում է ԷՄԴ-ով, այնուհետև կատարվում է այդ միջավայրում բակտերիալ կուլտուրայի ինոկուլյացիա: Բջիջների պրոլիֆերացիան գնահատվել է ռադիոակտիվ *[³H]*-թիմիդին միջոցով (հաշվարկվել է count per minute (CPM)): Այսպիսով, ներկայացվող ատենախոսությունում առաջին անգամ ցույց տրվեց ԳՑՀ ԷՄԴ-երի 2, 4, 6, 8, 10 Հց հաճախություններից կախված ազդեցությունը բակտերիաների աճի և կենսագործունեության վրա կամ բջջի պրոլիֆերացիայի վրա, որի ազդեցության մեխանիզմը դեռ պարզաբանված չէ վերջնական և գրականության մեջ շատ քիչ տվյալներ են հայտնի: Հայտնի է, որ կենսաբանական համակարգը պատասխանում է ԷՄԴ-ի ազդեցությանը տարբեր ձևով՝ կախված ալիքի հաճախությունից և ինտեսիվությունից (Goodman et al., 1995): Այս ազդեցությունները տարբեր օրգանիզմների մոտ տարբեր կերպ են դրսևորվում՝ կախված բջջի ֆունկցիոնալ վիճակից և օրգանիզմի կազմավորման աստիճանից (Fojt et al., 2010; Mittenzwey et al., 1996; Strasak et al., 2002): ԷՄԴ-ի (2, 4, 6, 8, 10 Հց հաճախություն, B=0.4 մՏլ ինտեսիվություն, 30 րոպե) ազդեցությունը բակտերիաների աճի վրա ցուցադրված է նկ. 15-ում:

նկ. 15



նկ. 16



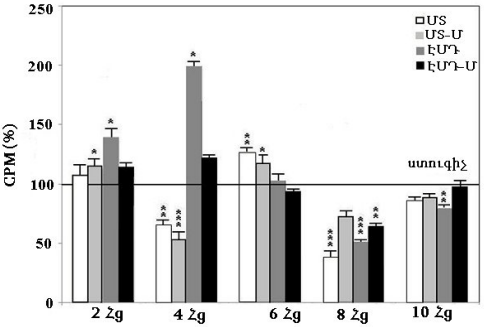
Նկար 15: ԳՑՀ ԷՄԴ-ի հաճախությունից կախված ազդեցությունը բակտերիաների մոտ: Գրաֆիկի վրա յուրաքանչյուր կետ համեմատվել է ստուգիչի հետ (100 % աճ (count per minute (CPM)), որը մշակված չի եղել:

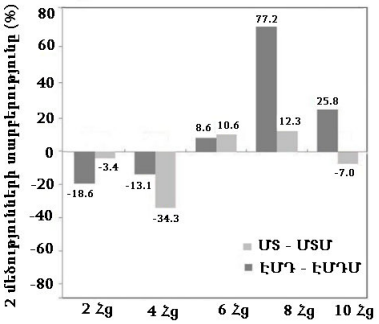
Նկար 16: ՄՏ-ան տարբեր հաճախությունների ազդեցությունը բակտերիաների աճի վրա: Գրաֆիկի վրա յուրաքանչյուր կետ համեմատվել է ստուգիչի հետ (100 % աճ (count per minute (CPM)), որը մշակված չի եղել:

Ուսումնասիրվեց նաև հաճախությունից կախված ինֆրաձայնային տիրույթի մեխանիկական տատանման ազդեցությունը *E. coli* K-12 բակտերիաների աճի և կենսագործունեության վրա՝ ռադիոակտիվ *[³H]*-թիմիդինի կիրառմամբ: Փորձի արդյունքում պարզվեց, որ ՄՏ կարող է կամ խթանել կամ ճնշել բակտերիաների աճը: Սակայն, ՄՏ ազդեցության մեխանիզմները բակտերիաների կենսագործունեության վրա վերջնականապես պարզաբանված չեն: Այստեղ ևս առաջարկվեց, որ ՄՏ-ան հիմնական կենսաբանական ազդեցությունը կարող է նույնպես իրականանալ արտաքին ջրային միջավայրի միջոցով: Այս վարկածի ստուգման համար ուսումնասիրվեց հաճախությունից կախված ՄՏ-ի (2, 4, 6, 8, 10 Հց, 8 մմ տեղաշարժ) ազդեցությունը բակտերիաների աճի վրա երկու տարբեր մոտեցումներով. ՄՏ ուղղակի ազդեցությամբ (մշակվում է բակտերիալ կուլտուրան սննդային միաջավայրում միաժամանակ, (ՄՏ)) և ՄՏ անուղղակի ազդեցությամբ (մշակվում է բակտերիալ սննդային միջավայրը նախապես, այնուհետև ինկուլացվում է բակտերիալ կուտուրան, (ՄՏՄ)): ՄՏ-ան ազդեցությունը (2, 4, 6, 8, 10 Հց հաճախություն, 8 մմ տեղաշարժ, 30 բոպե) *E. coli*-ի աճման վրա ցուցադրված է նկ. 16-ում:

Տվյալ երկու ֆիզիկական գործոնների ազդեցությունն ավելի տեսանելի ցուցադրելու և համեմատելու համար նրանք պատկերվել են մեկ գրաֆիկում (նկ. 17):

նկ. 17 **նկ. 8**





Նկար 17: ԳՃՀ ԷՄԴ-ի և ՄՏ-ան ազդեցությունը բակտերիաների աճման վրա: Կատարվել են 9 անկախ փորձեր, և գրաֆիկի վրա պատկերված արժեքները այդ 9 անկախ փորձերի միջին արժեքներն են ստանդարտ սխալներով:

Նկար 18: ՄՏ-ՄՏՄ ու ԷՄԴ-ԷՄԴՄ տարբերություններն արտահայտված տոկոսներով:

Մշակումների միջև տարբերությունը ավելի տեսանելի ցույց տալու համար բակտերիալ կուլտուրայի մշակված փորձի արդյունքներից (ուղղակի ազդեցություն)

հանվել է միջավայրը նախապես մշակված փորձի արժեքները (անուղղակի ազդեցություն) ՝ արտահայտված տոկոսներով (նկ. 18):

Այսպիսով ցույց է տրվել, որ ՄՏ և ԷՄԴ -ը (2, 4, 6, 8, 10 Հց հաճախությամբ, 8 մմ տեղաշարժ և B=0.4 մՏլ ինտեսիվությամբ համապատասխանաբար, 30 րոպե) բակտերիաների վրա ունեն ինչպես խթանող, այնպես էլ ճնշող հատկություններ՝ կախված տվյալ ֆիզիկական գործոնների հաճախությունից (նկ. 17):

Ցույց է տրված, որ ԳՑՀ ԷՄԴ և ՄՏ ունեն հատուկ հաճախականային "պատուհաններ", որոնք կախված են արտաքին միջավայրի կամ բջջի ֆիզիկաքիմիական կազմից (Adey 1981; Belyaev 2005): Այս աշխատանքում փորձնական ճանապարհով հաստատվել է, որ 4 և 8 Հց-երը այն հիմնական "պատուհաններ"-ն են, որոնք ցուցաբերում են կենսաբանական ազդեցություն մանրէների մոտ՝ 8 Հց ՄՏ-ով և ԷՄԴ-ով բակտերիաների մշակումը բերում է բակտերիաների աճի ճնշում, այն դեպքում, երբ 4Հց ԷՄԴ բերում է աճի խթանման, իսկ ՄՏ-ը՝ ճնշման: Այս ֆիզիկական գործոնների հետագա ուսումնասիրությունը ևս հնարավորություն կտա զարգացնել ֆիզիկական մեթոդներ ջրային համակարգերի մանրէաբանական մաքրման համար՝ կիրառելով նրանց այն հաճախությունները, որոնք բերում են բակտերիաների աճի ճնշում:

Ամփոփելով ամբողջ աշխատանքը, կարելի է նշել, որ կատարված հետազոտությունների արդյունքում ցույց է տրվել բակտերիաների վրա մի շարք ֆիզիկական և քիմիական գործոնների առանձին կամ համակցված ազդեցությունը և ստացված արդյունքները հակաբակտերիալ պաշտպանության արդյունավետ միջոցների շարքում կարող են գտնել կիրառություն և արդյունաբերության մեջ, և կենսատեխնոլոգիայում, և բժշկության մեջ: Հատկապես նոր հնարավորություններ են ստեղծվում ջրային ավազանները մանրէաբանական աղտոտվածությունից մաքրման համար՝ կիրառելով առաջարկվող քիմիական և ֆիզիկական մոտեցումները:

ԵԶՐԱՀԱՆԳՈՒՄՆԵՐ

1. CO_2/H_2O_2 համակցված համակարգը ավելի արդյունավետ է ճնշում բակտերիաների աճը համեմատած առանձին H_2O_2-ի ազդեցության հետ:
2. $CO_2/Ca(ClO)_2$ համակցված համակարգը ավելի արդյունավետ է ճնշում բակտերիաների աճը համեմատած առանձին $Ca(ClO)_2$ -ի կիրառությանը:
3. Բակտերիաների աճի վրա CO_2/H_2O_2 և $CO_2/Ca(ClO)_2$ համակարգերի կողմից դրսևորվող առավել արտահայտված աճի ճնշումը պայմանավորված է CO_2-ով հարուցված բջիջների հիդրատացիայով կամ ծավալի մեծացմամբ, որը բերում է H_2O_2 և $Ca(ClO)_2$ մանրէասպան նութերի նկատմամբ բակտերիաների զգայունության մեծացման:
4. Ցածր կոնցենտրացիայով CO_2-ը, H_2O_2-ը և $Ca(ClO)_2$-ը կարող են բջջի արտաքին թաղանթի բնականոն կառուցվածքի փոփոխությանների և ներբջջային տարբեր ուլտրակառուցվածքների առաջացման պատճառ հանդիսանալ:
5. Բակտերիալ բջիջների կենսագործունեության վրա ոչ իոնացնող ֆիզիկական գործոնների (ԳՑՀ ԷՄԴ և ՄՏ) կենսաբանական ազդեցությունը հիմնականում իրականանում է ջրային միջավայրի՝ որպես թիրախ կամ միջնորդ միջոցով: 2, 4, 6, 8, 10 Հց հաճախականային տիրույթում ոչ իոնացնող բնույթի ֆիզիկական գործոնները (ԳՑՀ ԷՄԴ և ՄՏ) առաջացնում են 2 հիմնական հաճախականային "պատուհաներ" 4 և 8 Հց հաճախություններում:
6. 4 և 8 Հց ԷՄԴ-ը և ՄՏ-ն ունեն ազդեցության տարբեր մեխանիզմներ բակտերիաների աճման վրա: 8 Հց ՄՏ-ով և ԷՄԴ-ով բակտերիաների մշակումը բերում է բակտերիաների աճի ճնշում, այն դեպքում, երբ 4Հց ԷՄԴ բերում է աճի խթանման, իսկ ՄՏ-ը՝ ճնշման:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑՈՒՑԱԿ

1. **Varsik Martirosyan** (2012). The effects of physical factors on bacterial cell proliferation. *Journal of low frequency noise, vibration and active control*, vol. 31 (4): 247-256.
2. **Varsik Martirosyan**, Naira Baghdasaryan, Sinerik Ayrapetyan (2012). Bidirectional frequency-dependent effect of extremely low-frequency electromagnetic field on *E. coli* K-12. *Electromagnetic Biology and Medicine*, DOI: 10.3109/15368378.2012.712587 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046211
3. **Varsik Martirosyan**, Naira Baghdasaryan, Sinerik Ayrapetyan (2012). The study of the effects of mechanical vibration at infrasound frequency on *[^{3}H]*-thymidine incorporation into DNA of *E. coli* K-12. *Electromagnetic Biology and Medicine*, DOI: 10.3109/15368378.2012.701189, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046076
4. **Varsik Martirosyan,** Karlen Hovnanyan, and Sinerik Ayrapetyan (2012). Carbon dioxide as a microbial toxicity enhancer of some antibacterial agents: a new potential water purification tool. *ISRN Biophysics*, Article ID 906761, 7 pages, doi:10.5402/2012/906761
5. **Varsik Martirosyan**, Levon Markosyan, Hrachik Hovhanesyan, Karlen Hovnanyan, Sinerik Ayrapetyan (2012). The frequency-dependent effect of ELF-EMF and MV at IS frequency on the growth, division and motility of *Escherichia coli* K-12. *The Environmentalist*, vol. 32 (2):157-165.
6. **Varsik Martirosyan**, Ehsanollah Moosavi, Sinerik Ayrapetyan (2011). The study of the effects of carbon dioxide-induced elevation of hydrogen peroxide toxicity on microbes as a novel tool for water purification. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 27(5):1091-1098.
7. **Martirosyan, V.S**., Moosavi, Eh., Ayrapetyan, S.N. Carbon dioxide induced elevation of hydrogen peroxide toxicity on microbes. 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress, 5-9 October 2009, Diyarbakir-Turkey. http://www.turkbiyofizik.com/ibc2009/poster_bildiri.pdf
8. Ehsanollah Moosavi, **Varsik Martirosyan,** Sinerik Ayrapetyan. A new approach for water purification from microbial pollution. *Advances in Environmental & Geological Science & Engineering*, pp. 38-43. Proceedings of the 2nd WSEAS International Conference on ENVIRONMENTAL and GEOLOGICAL SCIENCE and ENGINEERING (EG '09). Transilvania University of Brasov, Romania, September 24-26, 2009.
9. Ehsanollah Moosavi, **Varsik Martirosyan,** Sinerik Ayrapetyan. A new approach for water purification from microbial pollution. *RECENT ADVANCES IN HEAT TRANSFER, THERMAL EMGINEERING & ENVIRONMENT,* pp. 175-180. Proceedings of the 7th IASME / WSEAS International Conference on HEAT TRANSFER, THERMAL EMGINEERING and ENVIRONMENT (HTE'09) Moscow, Russia, August 20-22, 2009
10. Արտոնագիր # 2575A – **Վ. Մարտիրոսյան,** Ս. Հայրապետյան (2011). Ջրի մանրէազերծման եղանակ: http://www.aipa.am/upload/File/Texekagir/2011_12.pdf.
11. Արտոնագիր # 2357A – Ս. Հայրապետյան, Սեյեդ Էհսոլլա Մօսսավի, **Վ. Մարտիրոսյան** (2010). Մանրէներից ջրի մաքրման եղանակ: www.aipa.am/upload/File/Texekagir/2010_3.pdf

МАРТИРОСЯН ВАРСИК САМВЕЛОВНА

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: *Escherichia coli* К-12, перекись водорода, маханические колебания, электромагнитные поля, гипохлорит кальция, микробиологическое загрязнение воды.

Данная диссертация направлена на изучение механизмов, посредством которых химические вещества (сочетания диоксида углерода /CO_2/ и перекиси водорода /H_2O_2/, а также /CO_2/ и гипохлорита кальция /$Ca(ClO)_2$/) и неионизирующие физические факторы (сверхнизкочастотные электромагнитные поля /СНЧ ЭМП/ и механические колебания /МК/ инфразвукового диапазона) влияют на рост и жизнеспособность бактерий.

Исследование этих механизмов позволило нам, с помощью вышеуказанных факторов, разработать экономически выгодные и безопасные для здоровья человека химические и физические методы очиски воды от микробных загрязнений. В качестве экспериментальной модели была выбрана кишечная палочка К-12 дикого типа из-за ее широкого распространения в окружающей среде (включая водные системы). Наличие ее патогенных форм является основным критерием загрязнения воды.

Полученные данные показали, что обработка бактерий диоксидом углерода приводит к увеличению чувствительности микроорганизмов к H_2O_2 и $Ca(ClO)_2$, подавляя рост бактерий. Известно, что при растворении CO_2 в воде образуются кислоты, что приводит к понижению pH среды. Таким образом , для объяснения маханизмов влияния CO_2, мы, путем выращивания бактерий в среде при постоянном и переменном pH, решили исследовать вопрос о том влияет ли CO_2 напрямую или косвенно (через понижение pH среды) на рост бактерий. Экспериментально было показано, что кислотность среды не зависит от времени экспозиции CO_2. Полученные данные не позволяют четко объяснить биологический механизм данного феномена, но основываясь на литературные данные можно сказать, что CO_2 приводит или к набуханию бактерий или к изменению функционального состояния клетки, повышая гидратацию клетки, что в свою очередь приводит к увеличению числа связанных с мембраной активных единиц - рецепторов. Иммено последний механизм позволил нам сделать заключение о том, что у бактерий увеличение чувствительности к H_2O_2 и $Ca(ClO)_2$ под влиянием CO_2 является результатом увеличения числа связанных с мембраной активных рецепторов, которые вероятно, имеют универсальное сродство к низким концентрациям различных химических веществ. Для объяснения повышения чувствительности клетки вследствии ее гидратации, было также исследовано влияние $Ca(ClO)_2$ на бактерии в гипотоничной (150 мОсм) и гипертоничной (500 мОсм) средах.

Было показано, что в гипотоничной среде, где клетки имеют относительно большой объем, то есть гидратированы, также наблюдается повышение чувствительности к $Ca(ClO)_2$. Таким образом, было предположено, что увеличение CO_2-индуцированного токсического влияния $Ca(ClO)_2$ обусловлено увеличением степени гидратации клетки, приводящее к увеличению числа связанных активных рецепторов мембраны. С помощью электронной микроскопии было также выяснено, что вышесказанные химические вещества приводят также к изменениям в структурах клеточной мембраны и цитоплазмы. Поэтому CO_2/H_2O_2 и $CO_2/Ca(ClO)_2$ системы были предложены в качестве подходящих методов для очистки воды от микробного загрязнения, и являются экономически выгодной и экологически безопасной альтернативой существующим механизмам очистки воды.

Было также исследовано влияние сверх слабых физических факторов (СНЧ ЭМП и МК) на жизнеспособность бактерий. Предполагалось, что они имеют прямое и косвенное (мишенью является водная среда) влияние на рост бактерий. Было показано, что МК и СНЧ ЭМП (частота 2, 4, 6, 8, 10 Гц, сдвиг 8мм и интенсивность B=0.4 мТл, 30 мин) имеют двойной эффект: способствующий и подавляющий. Экспериментально было потверждено, что частоты 4Гц и 8Гц являются “основными окнами”, под воздействием которых проявляются биологические эффекты: обработка бактерий МК и СНЧ ЭМП частотой 8 Гц приводик к подавлению их роста, в то время как 4 Гц СНЧ ЭМП –способствует росту, а при 4 Гц МК рост бактерий подавляется. Дальнейшее исследование биологических эффектов этих физических факторов позволит развивать новые физические методы очиски воды с применением частот, подавляющих рост бактерий.

Таким образом, экспериментальные данные и новые подходы, представленные в данной диссертации позволят успешно решить проблему очистки воды от микробного загрязнения экономически доступным путем и, естественно, относительно безопасными физическими и химическими средствами.

MARTIROSYAN VARSIK SAMVEL

THE EFFECT OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON THE BACTERIAL GROWTH AND VIABILITY

SUMMARY

Keywords: *Escherichia coli* K-12, hydrogen peroxide, mechanical vibration, electromagnetic fields, calcium hypochlorite, microbiological water pollution.

The dissertation is aimed at the study of mechanisms by which chemical factores (e.g. the combination of carbon dioxide /CO_2/ and hydrogen peroxide /H_2O_2/; and combination of CO_2 and calcium hypochlorite /$Ca(ClO)_2$/) and non-ionizing physical factores (e.g. extremely low frequency electromagnetic field /ELF EMF/ and mechanical vibrations /MV/ at infrasound frequency) affect the growth and viability of bacteria.

The investigation of these mechanisms allowed us to develop economically advantageous and safe chemical and physical methods of water disinfection from microbial contaminants by using these chemical and physical factores, to improve both ecology of water bodies and reduce the risks imposed on human health. *Escherichia coli* K-12, wild type, was used as an experimental organism, because of its' abundance and wide distribution in environment (including water systems), and especially in tropical regions; and the existence of large variety of pathogenic forms, the presence of which is the main criteria of water contamination.

Our data demonstrated that pre-incubation of bacterial culture by CO_2 leads to increase of sensitivity of microbes to H_2O_2 and $Ca(ClO)_2$ leading to inhibition of microbial growth. As it is well known upon the dissolution of CO_2 in water carbonic acid is formed, lowering the pH of the medium. Therefore, we have attempted to investigate whether the CO_2 affects the microbial culture directly (by CO_2) or indirectly (by the resulting acidity) by growing the microbes under constant and fluctuating pH conditions.

It was experimentally demonstrated that the final acidity levels of the growth media was independent of the exposure time of CO_2. Although the obtained data did not allow us to make final conclusion on the nature of the mechanism through which the CO_2 poisoning metabolism could increase cell membrane sensitivity to H_2O_2 and $Ca(ClO)_2$, the existing scientific data suggest that either CO_2-induced swelling of microbes, or a change in the cell functional state leading to enhanced cell hydration and subsequent increase of the numbers of membrane associated active units or receptors, might be responsible for it. This type of receptors probably has universal affinity to low concentrations of different chemicals.

The further investigation of the enhancement of cell sensitivity as a result of increased cell hydration by evaluation of the effects of $Ca(ClO)_2$ in hypotonic (150 mOsm) and hypertonic (500 mOsm) environment demonstrated that in hypotonic environment, where the cells have large volume and are in increased hydration stage, the toxic effects of $Ca(ClO)_2$ as more pronounced. Therefore, it was predicted that CO_2-induced toxic effects of

$Ca(ClO)_2$ is due to increase of cell hydrated stage, which leads to increase the numbers of active membrane receptors. The structural changes in cell membrane and cytoplasm during the treatments were further proved using electron microscopy.

Therefore, CO_2/H_2O_2 and $CO_2/Ca(ClO)_2$ systems were suggested as suitable methods for water purification from microbial pollution, providing economically advantageous and ecologically safe alternative to existing water purification mechanisms.

The effect of extremely weak physical agents, such as ELF EMF and MV, on microbial growth and variability was also investigated. It was predicted that they have direct and indirect effects (with water medium as a target) on the growth of microbes. It was shown that MV and EMF (2, 4, 6, 8, 10 Hz, 8 mm displacement և B=0.4 mT intensity, correspondingly, 30 min) have dual effects on microbial growth – stimulation and inhibition.

Experimental data revealed that 4 and 8 Hz are the main frequency "windows", which have pronounced biological effects on microbes: 8Hz MV and EMF treatments lead to inhibition of microbial growth, while 4 Hz EMF has stimulating and 4 Hz MV has inhibiting effects. The further investigation of the biological effects of these physical factors will allow developing new physical methods for water disinfection by application of frequencies with inhibitory effects.

Thus, the experimental data and new approaches obtained in the current study allows to successfully address the issue of water purification from microbial contaminants by economically affordable and naturally relatively safe physical and chemical means, the further development of which will additionally increase the efficiency of suggested methods.