

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas

Gerda Mickūnaitė

PATOGENINIŲ GRYBELIŲ IR BAKTERIJŲ IDENTIFIKAVIMAS FT-IR ATR SPEKTRINIŲ
METODŲ

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Gyvybės ir cheminės fizikos
studijų programa

Studentas

Gerda Mickūnaitė

Leista ginti

2021-05-20

Darbo vadovas

doc. dr. Justinas Čeponkus

Konsultantas

dokt. Rimantė Bandzevičiūtė

Instituto direktorius

prof. dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2021

Turinys

IVADAS	3
1. Literatūros apžvalga	5
1.1. Infraraudonosios sugerties spektroskopija.....	5
1.2. Pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio infraraudonosios spektroskopijos metodas	7
1.3. Patogeniniai mikroorganizmai	8
1.3.1. Grybeliai	9
1.3.2. Bakterijos.....	10
1.3.3. Mišrios grybelinės ir bakterinės infekcijos.....	11
1.4. Patogeninių mikroorganizmų identifikavimo metodai	12
1.5. Chemometriniai analizės metodai.....	14
1.6. Patogeninių mikroorganizmų identifikavimas FT-IR spektriniu metodu.....	16
2. Eksperimentinė dalis	19
2.1. Mielių ir bakterijų bandinių paruošimas ir spektrų registravimas	19
2.2. Tyrimo rezultatų analizė	20
2.2.1. Bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumo tyrimas.....	20
2.2.2. Patogeninių bakterijų ir mielių identifikavimas	24
2.2.3. Skirtingų bakterijų rūšių identifikavimo tyrimas	29
2.2.4. Skirtingų mielių rūšių identifikavimo tyrimas	37
2.2.5. Mielių žūties mechanizmo tyrimas.....	40
2.2.6. Skirtingų <i>S. cerevisiae</i> mielių porūšių identifikavimo tyrimas	46
2.3. Tyrimo rezultatų apibendrinimas.....	49
Pagrindiniai rezultatai ir išvados	53
PADĖKA	54
LITERATŪROS ŠALTINIŲ SĄRAŠAS	55
Summary	59
Santrauka	61
Priedai	63
1 priedas <i>Spektrinių juostų padėtys ir jas atitinkantys molekulių virpesiai</i>	64
2 priedas <i>C. guilliermondii</i> ir <i>C. lusitaniae</i> mielių ATR IR sugerties spektrai	65

ĮVADAS

Patogeniniai grybeliai ir bakterijos sukelia infekcines ligas, kurių komplikacijos kelia pavojų paciento gyvybei. Remiantis 2016 metų duomenimis, trys mikroorganizmų sukeltos infekcinių ligų grupės (kvėpavimo takų infekcijos, infekcijos sukeliančios viduriavimą, tuberkuliozė) yra tarp dešimties priežasčių, sukeliančių daugiausia mirčių pasaulyje [1]. Šiuo metu dažniausiai bakterijų ir grybelių sukeltos infekcijos yra gydomos skirtingais medikamentais. Bakterijų sukeltoms infekcinėms ligoms gydyti yra skiriami antibiotikai, o mielių sukeltoms infekcijoms gydyti – priešgrybeliniai vaistai. Yra žinoma, kad esant mišrioms grybelinėms ir bakterinėms infekcijoms paskirti medikamentai gali paveikti tik vieną pataloginių mikroorganizmų rūšį (eukariotus ar prokariotus), taip leidžiant plisti likusiai mikroorganizmų rūšiai. Todėl yra svarbu ankstyvoje susirgimo stadijoje identifikuoti infekciją sukeliančio mikroorganizmo rūšį ir paskirti tikslinį gydymą [2-4]. Grybelinių infekcijų atveju svarbu identifikuoti ir ląstelių žūties mechanizmą – apoptozę arba nekrozę. Nekrozės metu aktyviosios deguonies formos (ROS), pažeisti baltymai ir toksinai patenka į infekcijos vietos aplinką ir gali sukelti antrinį uždegimą. Vykstant apoptozei nėra sukeliama antrinis uždegimas, o junginiai, kurie išskiriami į aplinką, gali būti panaudojami epitelio ląstelių regeneracijai.

Šiuo metu patogeninių grybelių ir bakterijų tyrimai yra atliekami taikant įvairius molekulinės biologijos, cheminius ir fizikinius metodus, tačiau jie neretai brangiai kainuoja, tyrimas užtrunka iki kelių dienų, o rezultatai gali būti netikslūs [5-6]. Yra žinoma, kad patogeninių mielių ir bakterijų ląstelės skiriasi savo sandara ir chemine sudėtimi, todėl jų identifikavimas gali būti atliekamas taikant FT-IR ATR (angl. *attenuated total reflectance (ATR) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy*) spektrinį metodą. Taikant šį metodą nėra reikalingas specialus bandinių paruošimas, o ATR IR sugerties spektro registravimas užtrunka iki kelių minučių, todėl identifikavimas gali būti atliekamas greičiau nei naudojant kitus analizės metodus.

FT-IR ATR sugerties spektrinis metodas šiuo metu nėra labai plačiai taikomas siekiant atskirti grybelius nuo bakterijų [7-9]. FT-IR ATR spektrinis metodas nėra pritaikytas ir siekiant nustatyti patogeninio mikroorganizmo žūties mechanizmą, todėl šiuo metu yra reikalingi tyrimai, kurie leistų ne tik įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo patikimumą identifikuojant bakterijas ir mieles, metodo pritaikomumą klinikinėje diagnostikoje, tačiau leistų identifikuoti ir patogeninio mikroorganizmo žūties mechanizmą.

Šio darbo **tikslas** – ištirti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą patogeninių mikroorganizmų identifikavimui.

Siekiant įvykdyti šiame darbe suformuluotą tikslą, **iškeliami šie uždaviniai**:

1. Atlikti statistinę spektrinę analizę ir įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo patikimumą skirtingų patogeninių mikroorganizmų tipų identifikavimui.

2. Atlikti kokybinę spektrinę analizę ir pritaikius skirtingus statistinės analizės metodus, įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų bakterijų rūšių identifikavimui.
3. Atlikti kokybinę spektrinę analizę ir pritaikius skirtingus statistinės analizės metodus, įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų grybelių rūšių identifikavimui.
4. Atlikti statistinę spektrinę analizę ir įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo patikimumą nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku patogeninių grybelių identifikavimui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Infraraudonosios sugerties spektroskopija

Infraraudonosios sugerties spektroskopija yra nedestruktyvus ir selektyvus metodas, kuris teikia išsamią informaciją apie tiriamosios molekulės virpesius. Kadangi kiekvienas cheminis ryšys turi savo unikalų virpesių dažnį, remiantis gauta informacija galima ne tik identifikuoti tiriamąją molekulę, tačiau ir tirti jos struktūrą. Vienas iš šio metodo privalumų yra tas, kad IR sugerties spektroskopija gali būti naudojama tiriant įvairios agregatinės būsenos medžiagas [10].

Esant molekulei ir IR spinduliuotės sąveikai, molekulė gali sugerti IR spinduliuotę, o sugertos IR spinduliuotės energija $h\nu$ yra lygi energijų skirtumui tarp tam tikrų molekulės virpesinių lygmenų. Ši lygybė gali būti išreikšta formule:

$$h\nu = E_n - E_m, \quad (1)$$

čia $h\nu$ – sugertos IR spinduliuotės energija, $E_{n,m}$ – tam tikrų molekulės virpesinių lygmenų energijos.

IR spinduliuotės sugertis gali neįvykti, net jei ir yra tenkinama (1) lygybė, kadangi leidžiamiems/draudžiamiems virpesiniams šuoliams galioja atrankos taisyklės. Remiantis pirmąja atrankos taisykle, IR spinduliuotės sugerties spektruose bus aktyvūs tik tie virpesiniai šuoliai, kuriems vykstant virpesinis kvantinis skaičius pakinta vienetu arba minus vienetu. Antroji atrankos taisyklė yra susijusi su molekulių simetrija. Ja remiantis, IR spinduliuotės sugerties metu bus leidžiami tik tie virpesiniai šuoliai, kurių metu pakinta molekulės dipolinis momentas. Šios dvi atrankos taisyklės yra nesunkiai įrodomos taikant kvantinę mechaniką. Vykstant priverstiniam šuoliui iš virpesinio energijos lygmens m į lygmenį n , kurio metu yra sugerama ar išspinduliuojama IR spinduliuotė, yra būtina, kad integralas:

$$(\mu_x)_{mn} = \int_{-\infty}^{\infty} \psi_n \mu_x \psi_m dQ, \quad (2)$$

ar bent vienas iš $(\mu_y)_{mn}$ ir $(\mu_z)_{mn}$, kurie išreiškiami analogiškais lygtimis, nebūtų lygūs 0. Čia μ_x yra elektrinio dipolinio momento komponentė x kryptimi, ψ – banginė funkcija tam tikrame virpesiniame lygmenyje, Q – normalioji koordinatė (atitinka normalųjį virpesį). Elektrinis dipolinis momentas yra normaliosios koordinatės Q funkcija. Tada μ_x galima išskleisti Teiloro eilute:

$$\mu_x = (\mu_x)_0 + \left(\frac{\partial \mu_x}{\partial Q}\right)_0 Q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \mu_x}{\partial^2 Q}\right)_0 Q^2 + \dots \quad (3)$$

Virpesinio šuolio metu, įvykus atomų poslinkiui, Q įgyja mažas vertes, todėl aukštesnės eilės nariai gali būti atmesti. Pasinaudojus (2) ir (3) formulėmis, gauname:

$$(\mu_x)_{mn} = (\mu_x)_0 \int \psi_n \psi_m dQ + \left(\frac{\partial \mu_x}{\partial Q}\right)_0 \int \psi_n Q \psi_m dQ. \quad (4)$$

Dėl banginių funkcijų ortogonalumo, pirmasis lygties narys lygus nuliui, išskyrus tą atvejį kai $m=n$. Antrasis lygties narys nebus lygus nuliui tik tada, kai $\left(\frac{\partial \mu_x}{\partial Q}\right)_0 \neq 0$ ir $\int \psi_n Q \psi_m dQ \neq 0$. Šios dvi

sąlygos nusako atrankos taisyklės leidžiamiems/draudžiamiems virpesiniams šuoliams. Pirmoji atrankos taisyklė išplaukia iš to, kad antrasis integralas nebus lygus nuliui tik tada, kai $n=m\pm 1$. Antroji atrankos taisyklė, kuri susijusi su molekulių simetrija yra įrodoma iš sąlygos $\left(\frac{\partial \mu_x}{\partial Q}\right)_0 \neq 0$. Remiantis šia sąlyga, IR spinduliuotė bus sugerta tik tada, kai virpesinio šuolio metu pakis molekulės elektrinis dipolinis momentas. Virpesys bus aktyvus kai $\left(\frac{\partial \mu_x}{\partial Q}\right)_0 \neq 0$ ir neaktyvus kai $\left(\frac{\partial \mu_x}{\partial Q}\right)_0 = 0$.

Daugelis molekulių kambario temperatūroje yra pagrindiniame virpesiniame lygmenyje, todėl energijos pernaša iš $v''=0$ virpesinio lygmens į $v''=1$ virpesinį lygmenį yra galima. Tačiau gali atsitikti ir taip, kad IR sugerties spektruose bus matomos juostos, kurios stebimos dėl energijos pernašos iš $v''=0$ virpesinio lygmens į $v''=2, 3, 4, \dots$ virpesinį lygmenį, šios spektrinės juostos yra vadinamos virštoniais. Kadangi virštoniai kvantinės mechanikos požiūriu yra draudžiami, jų spektrinių juostų intensyvumas yra mažas.

Registruojant IR spinduliuotės sugerties spektrus yra matuojamas arba pralaidumas $T = \frac{I}{I_0}$ (I – į bandinį kritusios spinduliuotės stipris, I_0 – per bandinį praėjusios spinduliuotės stipris), arba optinis tankis $A = -\log_{10} T$. Bandinio optinis tankis gali būti išreiškiamas tokia formule:

$$A(\tilde{\nu}) = \varepsilon(\tilde{\nu})cl, \quad (5)$$

čia c yra spinduliuotę sugeriančio tirpalo koncentracija [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], l – spinduliuotės geometrinio kelio ilgis bandinyje [cm], $\varepsilon(\tilde{\nu})$ – molinis sugerties koeficientas. Optinis tankis $A(\tilde{\nu})$ yra bedimensinis dydis, o molinį sugerties koeficientą $\varepsilon(\tilde{\nu})$ spektroskopijoje yra priimta išreikšti naudojant ne SI sistemos vienetą [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$]. Pralaidumas taip pat yra bedimensinis dydis, jis dažniausiai yra išreiškiamas procentais:

$$T(\tilde{\nu}) = \frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})} \cdot 100\%. \quad (6)$$

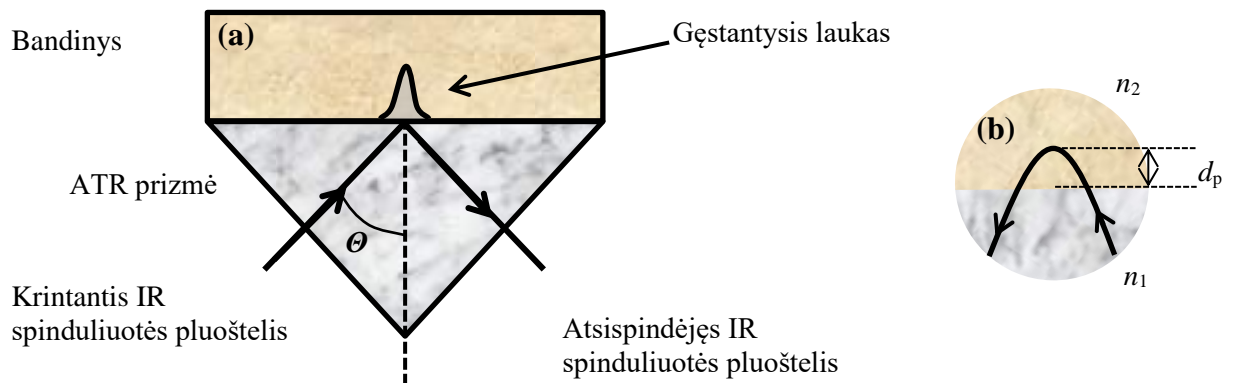
Optinis tankis ir pralaidumas yra susiję sąryšiu:

$$A(\tilde{\nu}) = 2 - \log_{10}(T \cdot 100\%). \quad (7)$$

Klasikiniame pralaidumo eksperimente informacija apie tiriamąją medžiagą yra gaunama iš viso bandinio storio, registruojamuose spektruose yra matomos per didelio intensyvumo spektrinės juostos, kurių kontūrai iškraipyti. Tai apsunkina spektrinę analizę, todėl optinis tankis turi būti mažinamas taikant įvairius metodus (tirpinimas skaidriame tirpiklyje, plonų plėvelių formavimas, tablečių (angl. *pellet*) technika). Dėl šios priežasties tiek rutiniuose, tiek moksliniuose tyrimuose plačiai taikomas ATR metodas. Taikant šį metodą nėra reikalingas specialus bandinio paruošimas. Spektrinė informacija apie tiriamąjį bandinį yra gaunama iš kelių mikrometrų storio paviršinio sluoksnio, todėl išsamiai analizei pakanka ir nedidelio medžiagos kiekio [10-11].

1.2. Pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio infraraudonosios spektroskopijos metodas

Taikant ATR metodą, IR spinduliuotės pluoštelis yra nukreipiamas į bandinio paviršių per visiško vidaus atspindžio optinį elementą (ATR prizmę), kurio lūžio rodiklis didesnis nei tiriamojo bandinio. Spinduliuotė yra visiškai atspindima riboje tarp ATR prizmės ir bandinio, o kiekvieno atspindžio metu IR spinduliuotė įsismelkia į bandinį ir yra selektyviai sugerama. Atsispindėjusioje spinduliuotėje yra informacija apie IR spinduliuotės sugertį bandinyje. Elektromagnetinė banga, kuri įsismelkia į bandinį visiško vidaus atspindžio metu yra vadinama gęstančiuoju lauku (1 pav.). Taikant ATR metodą gali būti naudojamos daugkartinio bei vieno atspindžio prizmės (1 pav. (a)).



1 pav. (a) vieno atspindžio ATR eksperimentas, (b) spinduliuotės įsiskverbimo gylis (adaptuota pagal [10])

Tam, kad būtų stebimas spinduliuotės pažeistasis visiškasis vidaus atspindys, turi galioti pagrindinė sąlyga, kuria remiantis, kritusios spinduliuotės kampas θ , turi viršyti kritinį kampą θ_{kr} . Kritinis kampas priklauso nuo tiriamojo bandinio bei ATR kristalo lūžio rodiklių ir gali būti išreikštas tokia formule:

$$\theta_{kr} = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right), \quad (8)$$

čia n_1 yra ATR kristalo lūžio rodiklis, n_2 – bandinio lūžio rodiklis. Taikant ATR metodą dažniausiai yra pasirenkami kristalai su dideliu lūžio rodikliu tam, kad būtų sumažintas kritinis kampas.

Dar vienas parametras, kuris yra svarbus ATR spektroskopijoje – IR spinduliuotės įsiskverbimo į bandinį gylis (1 pav. (b)). Įsiskverbimo į bandinį gylis yra apibrėžiamas kaip atstumas nuo ATR kristalo ir bandinio sąlyčio paviršiaus iki taško, kur gęstančiojo lauko amplitudė sumažėja 2,7 kartų, o intensyvumas apytiksliai sumažėja iki $(1/e)^2$ nuo savo pradinės vertės. Šis parametras yra apskaičiuojamas taip:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}, \quad (9)$$

čia λ – bangos ilgis, n_1 - ATR kristalo lūžio rodiklis, n_2 – bandinio lūžio rodiklis. Galima pastebėti, kad šis parametras priklauso nuo ATR prizmės lūžio rodiklio, spinduliuotės bangos ilgio bei nuo IR spinduliuotės kritimo kampo. Remiantis (9) formule, galima pastebėti, kad IR spinduliuotės įsiskverbimo į bandinį gylis priklauso nuo bangos ilgio ir nuo santykio tarp bandinio ir kristalo lūžio rodiklių. Dėl šios priežasties ATR IR sugerties spektrai skiriasi nuo tų pačių tyrime naudotų medžiagų pralaidumo spektrų, kadangi ilgabangėje spektro srityje juostų santykinis intensyvumas yra didesnis negu santykinis juostų intensyvumas trumpabangėje spektro srityje. Dėl šios priežasties taip pat gali būti stebimas nežymus spektrinių juostų poslinkis į ilgabangę spektro sritį, todėl siekiant tarpusavyje palyginti pralaidumo ir ATR IR sugerties spektrus būtina atlikti ATR IR sugerties spektrų intensyvumo korekciją. Šiam trūkumui išspręsti šiuolaikiniai prietaisai automatiškai atlieka intensyvumo korekciją jų vertimo į optinio tankio skalę metu remiantis formule:

$$ATR = AB \cdot \frac{1}{N} \cdot const \cdot v \cdot \frac{\sqrt{n_{12}^2 \cdot \sin^2(\theta) - 1}}{E^2}, \quad (10)$$

čia ATR – galutinis spektras, AB – nekoreguotas spektras, N – ATR atspindžių skaičius, v – bangos skaičius, n_{12} – ATR kristalo ir bandinio lūžio rodiklių santykis, θ – spinduliuotės kritimo kampas, E – elektrinio lauko stiprio vertė terpes skiriančioje riboje.

Svarbiausias ATR prizmių parametras – medžiagos iš kurios padaryta prizmė lūžio rodiklis. Tyrimams ATR prizmės turi būti pasirenkamos atsižvelgiant į bandinio kietumą, spektrinį intervalą, įsiskverbimo gylį bei higroskopiškumą. Vienos iš dažniausiai naudojamų medžiagų ATR prizmių gamybai – deimantas, germanis, silicis, cinko selenidas. Problema registruojant IR spinduliuotės sugerties spektrus ATR metodu gali atsirasti tada, kai prizmės lūžio rodiklis yra nedaug didesnis už tiriamojo bandinio lūžio rodiklį. Tokiu atveju, registruojant IR spinduliuotės sugertį, yra sunku išlaikyti sąlygas, kad tiriamoji spinduliuotė visada kristų į bandinio ir ATR kristalo sąlyčio paviršių didesniu kampu už kritinį kampą. Taip bus stebimas ne tik ATR bet ir veidrodinis atspindys, kuriam būdingas „išvestinės“ tipo spektrinių kontūrų atsiradimas, o tai apsunkina spektrinę analizę. Renkantis prizmę į bandinio kietumą svarbu atsižvelgti dėl to, kad registruojant ATR IR sugerties spektrus labai svarbu geras mechaninio kontakto, tarp bandinio ir ATR prizmės, užtikrinimas, o kietų ir minkštų porėtų bandinių atveju, kartais tai sunku realizuoti. Kieti bandiniai gali pažeisti ATR prizmės paviršių, o minkštiems porėtiems bandiniams reikalingas papildomo slėgio panaudojimas [10,12].

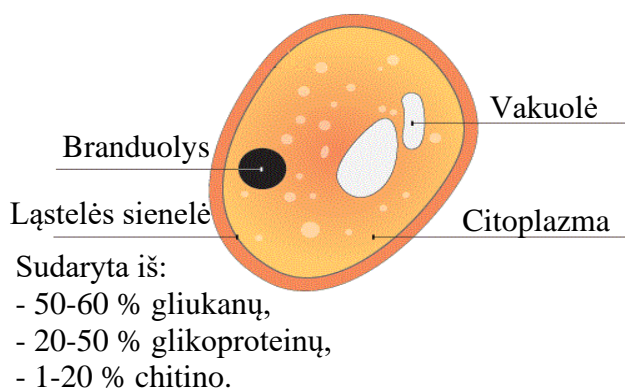
1.3. Patogeniniai mikroorganizmai

Patogeniniai mikroorganizmai, tokie kaip bakterijos, grybelis ar virusai, gali kelti pavojų žmogaus sveikatai bei gyvybei. Šių mikroorganizmų yra gausu mus supančioje aplinkoje, todėl sąlytis

su mikroorganizmų turinčiu paviršiumi ar užterštų produktų vartojimas gali sukelti įvairias infekcines ligas. Šiuo metu yra žinoma, kad dėl infekcijų, kurias sukelia antibiotikams atsparios bakterijos, kasmet Europoje miršta apie 33000 pacientų, o kai kurių grybelių rūšių plitimo protrūkiai yra stebimi visame pasaulyje. Šiame darbe yra tiriami įvairių rūšių grybeliai ir bakterijos, todėl sekančiuose skyreliuose yra apžvelgiama šių mikroorganizmų sandara, paplitimas pasaulyje, aptariamoms pagrindinės bakterijų ir grybelių rūšys ir jų sukeltos infekcijos [1-2, 13-15].

1.3.1. Grybeliai

Vienas iš mikroorganizmų, galinčių sukelti patologines reakcijas žmogaus organizme – grybelis. Grybelis – eukariotinis organizmas, kurio ląstelės branduolys nuo citoplazmos yra atskirtas plazmine membrana. Šiuo metu pasaulyje yra žinoma ir aprašyta 69000 skirtingų grybelių rūšių, iš kurių apie 400 rūšių gali sukelti patologines reakcijas žmogaus organizme. Grybelių ląstelės yra didesnės už bakterijas, o juose vykstantys molekuliniai procesai yra artimi augalų bei gyvūnų ląstelėse vykstantiems procesams. Pagrindinis skirtumas tarp grybelių ir žinduolių ląstelių yra tas, kad grybelių ląstelės turi standžias ląstelės sienelės, kurios gaubia plazmines membranas (2 pav.). Grybelio ląstelės sienelė daugiausia yra sudaryta iš gliukanų, glikoproteinų ir chitino, o jos struktūra priklauso nuo grybelio rūšies. Gliukanas yra svarbiausias struktūrinis ląstelės sienelės polisacharidas. Gliukanų struktūros gali būti labai įvairios, jų gliukozės fragmentai gali būti sujungti per vieną ar abu α ir β ryšius. Chitinas – didelis struktūrinis polisacharidas, kuris yra sudarytas iš modifikuotų gliukozės grandinių. Jo kiekis grybelio ląstelės sienelėje gali skirtis ir priklauso nuo grybelio struktūros. Ląstelės sienelę sudarantys glikoproteinai padeda ląstelei išlaikyti savo formą, apsaugo ją nuo nereikalingų medžiagų, yra atsakingi už signalų perdavimą, molekulių adsorbciją, adhezijos procesus, sienelių komponentų sintezę ir jų pertvarkymą.



2 pav. Grybelio ląstelės sandara (adaptuota pagal [16])

Patogeniniai grybeliai nėra judrūs, yra vienaląsčiai arba sudaryti iš cilindrinų ląstelių grandinės - hifo (hifas – ilga išsišakojusi siūlinė struktūra, kuri būdinga grybams ir yra naudojama

maistinių medžiagų transportavimui). Grybeliai paprastai yra skirstomi į dvi rūšis – pelėsi ir mieles. Mielės daugiausia egzistuoja kaip pavienės atskiros ląstelės, o pelėsiams būdinga hifo struktūra. Sveiko žmogaus organizme egzistuoja įvairios gynybinės sistemos (pavyzdžiui, virškinamajame trakte apsauginę funkciją atlieka epitelinis audinys, kvėpavimo takuose - mukociliarinis klirensas¹), kurios apsaugo organizmą nuo grybelinių infekcijų. Tačiau sergančio žmogaus organizmas, kurio imuninė sistema pažeista, yra palanki terpė atsirasti grybelinėms infekcijoms. Grybelis į žmogaus organizmą gali patekti per sveiką ar pažeistą odą, nurijus ar įkvėpus grybelio sporų. *Candida* – vienas iš plačiausiai paplitusių kolonizuojančių² grybelių prototipų. Nors *Candida* gentis ir yra normali burnos, ryklės, žarnyno ir makšties mikrofloros dalis, šiam grybeliui pradėjus nekontroliuojamai daugintis ar patekus į kraujotaką, vidaus organus (inkstus, širdį, smegenis) jis gali sukelti infekcijas, tokias kaip kandidozė. *Candida* genties grybeliai, ligoninėje gydomiems pacientams, neretai sukelia infekcijas kraujotakos sistemoje. Apytiksliai vienas iš keturių tokių pacientų miršta. *Candida lusitaniae* sukelia 19,3 % visų, ne *Candida albicans* rūšies grybelio, infekcijų ir apie 1,7 % urogenitalinės kandidozės atvejų. Šios rūšies grybelis dažniausiai diagnozuojamas pacientams, sergantiems piktybinėmis hematologinėmis ligomis, ypač tais atvejais, kai pacientui yra skiriamas chemoterapinis gydymas. Dar viena *Candida* rūšis, galinti sukelti infekcijas žmogaus organizme – *Candida guilliermondii*. Šis grybelis ligoninėje gulintiems pacientams gali sukelti lėtinę onichomikozę, ūmų osteomielitą, septinį artritą, endokarditą, fungemiją bei kitas invazines infekcijas. *Candida parapsilosis* – grybelis aptinkamas ant odos. Šios rūšies grybelio sukeliama infekcija dažniausiai pasireiškia tiems pacientams, kuriems klinikinio gydymo metu į veną yra įvedamas kateteris. Tokio klinikinio gydymo metu išsivysčiusi grybelinė infekcija yra diagnozuojama nuo 1 % iki 16 % visų pacientų [13, 17-22].

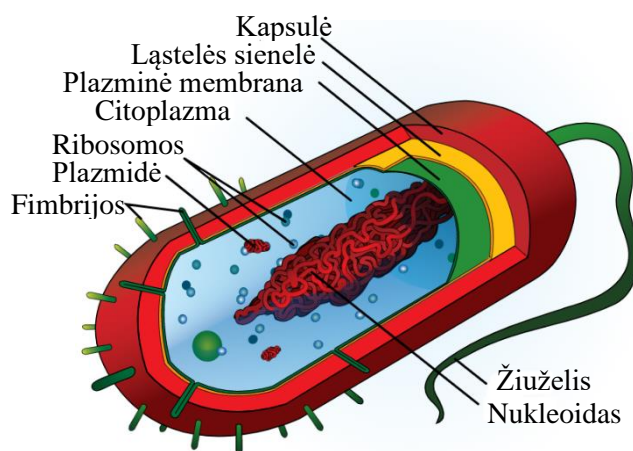
1.3.2. Bakterijos

Patologines reakcijas žmogaus organizme gali sukelti ir vieni iš struktūriškai paprasčiausių bei gausiausiai žemėje gyvenančių organizmų – bakterijos. Šiuo metu yra žinoma apie 5000 skirtingų rūšių bakterijų. Bakterijos yra prokariotai, kurie nuo eukariotų skiriasi tuo, kad neturi tikro ląstelės branduolio. Vietoje branduolio, bakterijos ląstelės centre yra nukleoidas, kuris yra sudarytas iš vienos deoksiribonukleorūgšties (DNR) molekulės (3 pav.). Bakterijos ląstelės sienelė yra viena iš svarbiausių struktūrų, kadangi ji apsaugo ląstelę nuo išsipūtimo ir plyšimo. Ląstelės sienelė paprastai yra sudaryta iš peptidoglikano – polisacharidinių molekulių tinklo, sujungto polipeptidiniais

¹Mukociliarinis klirensas – virpamojo epitelio funkcija.

²Kolonizacija – grybelio būvimas kūno paviršiuje (ant odos, burnoje, žarnyne ar kvėpavimo takuose) nesukeliant žmogui ligos.

kryžminiais ryšiais. Kai kurių bakterijų ląstelėse peptidoglikanas sudaro storą, sudėtingą tinklą, o kitų bakterijų ląstelėse plonas peptidoglikano sluoksnis yra įsiterpęs tarp dviejų plazminių membranų. Šias dvi bakterijų rūšis galima atpažinti naudojant dažymo procesą. Gram – teigiamos bakterijos turi storesnę peptidoglikano sienelę ir nusidažo purpurine spalva, gram – neigiamos bakterijos turi mažiau peptidoglikano ir nusidažo raudona spalva. Bakterijų dydis paprastai gali siekti 1 μm, kai tuo tarpu eukariotiniai organizmai gali būti iki 10 kartų didesni. Bakterijos dažniausiai pasižymi paprasta struktūra ir gali būti trijų formų: *bacillus* – tiesios lazdelės formos bakterijos, *coccus* – sferinės formos bakterijos ir *spirillus* – ilgos spiralės formos bakterijos. Bakterijos sukelia daugybę žmogaus sveikatai pavojingų ligų, tokių kaip cholera, raupai, stabligė, bakterinė pneumonija, kokliušas, difterija, Laimo liga, tuberkuliozė ir kitos. Viena iš bakterijų rūšių, kuri dažniausiai sukelia bakterines infekcijas žmogaus ar gyvūno organizme - *Escherichia coli*. *E. coli* bakterijos gali sukelti enteritą, šlapimo takų infekciją, sepsį ir kitas kliniškes infekcijas, tokias kaip naujagimio meningitas. Ši bakterija taip pat yra ligų kontrolės ir prevencijos centrų, biologinių veiksnių, galinčių kelti pavojų visuomenės sveikatai ir saugai, sąrašė. *Staphylococcus aureus* bakterijų kolonijos yra diagnozuojamos apie 30 % visos žmonių populiacijos. *S. aureus* yra ir komensalinė bakterija³, ir žmogaus patogenas. Ši bakterija gali sukelti bakteremiją, infekcinį endokarditą, osteoartikuliarinio aparato, odos, minkštųjų audinių ar pleuropulmonines infekcijas [23-25].



3 pav. Bakterijos ląstelė (adaptuota pagal [26])

1.3.3. Mišrios grybelinės ir bakterinės infekcijos

Nors bakterijos ir grybelis gali sąveikauti tiesioginiu arba netiesioginiu būdu žmogaus organizme, ilgą laiką buvo manoma, kad grybelis nedaro įtakos infekcijoms, kurias sukelia bakterijos. Ištobulėjus diagnostinei įrangai bei atlikus daugiau tyrimų, buvo pastebėta, kad bakterijų ir grybelių sąveika dažniausiai pasireiškia infekcijos metu ir gali pabloginti paciento būklę. Atlikus įvairius

³Komensalinė bakterija – bakterija, kuri naudojasi organizmo ištekliais, tačiau pačiam organizmui nekenkia.

tyrimus nustatyta, kad mišrios infekcijos sukelia iki 38 % visų kandidozės atvejų. *Pseudomonas aeruginosa* bakterijos daug dažniau yra nustatomos tų pacientų organizme, kurie serga cistine fibroze ir kuriems diagnozuota *Aspergillus fumigatus* infekcija ar nuolatinė *Candida albicans* kolonizacija, negu tų pacientų, kurių organizme nėra pastarųjų grybelių rūšių. Įvairios mišrios infekcijos taip pat gali būti diagnozuojamos burnos ertmėje, plaučiuose, žarnyne ar lytiniuose organuose [27].

Taigi, patogeniniai mikroorganizmai, tokie kaip grybelis ar bakterijos, gali sukelti įvairias infekcines ligas, kurios pavojingos žmogaus sveikatai bei gyvybei, todėl siekiant, kad pacientas pasveiktų, yra svarbus tinkamo gydymo paskyrimas. Kai kurios grybelių ir bakterijų rūšys yra atsparios medikamentams, o esant mišrioms infekcijoms gydymas antibiotikais gali paveikti tik organizme esančias bakterijas, taip leisdamas toliau plisti grybeliui, nes yra manoma, kad bakterijos slopina grybelio augimą. Todėl siekiant paskirti efektyvų gydymą yra svarbu tiksliai identifikuoti infekciją sukėlusius mikroorganizmus [2-3].

1.4. Patogeninių mikroorganizmų identifikavimo metodai

Šiuo metu yra taikoma daugybė įvairių metodų patogeninių mikroorganizmų identifikavimui. Dažniausiai yra taikomi tradiciniai metodai, kurie pagrįsti mikroorganizmų kultūros ir jų fenotipinių savybių nustatymu. Tačiau tobulėjant klinikinei diagnostikai ir technologijoms, yra ieškoma naujų identifikavimo metodų bei bandoma vis dažniau pritaikyti automatinius ir pusiau automatinius mikroorganizmų identifikavimo metodus.

Mikroorganizmų taksonomijoje dažniausiai yra taikomi molekulinės biologijos metodai, kurie yra skirstomi į genotipinius ir fenotipinius tyrimo metodus. Fenotipiniai metodai yra paremti organizmo išorinių požymių nagrinėjimu ir yra dažniau taikomi laboratorijose dėl santykinai mažesnių išlaidų. Taikant fenotipinius metodus iš žmogaus organizmo paimti klinikiniai mėginiai (įvairūs kūno skysčiai, biopsijos mėginiai) yra sėjami ant specialiai paruoštos auginamosios terpės. Kūno skysčiai prieš sėjimą dažniausiai yra centrifuguojami ir suspenduojami mažame kiekyje supernatanto, o biopsijos mėginiai yra supjaustomi ir sumalami. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tas, kad tiriamų ląstelių dydis, forma, sporuliacija⁴, ląstelių sudėtis, antigeniškumas, biocheminis aktyvumas ir jautrumas antimikrobinėms medžiagoms priklauso nuo naudojamos terpės ir augimo sąlygų. Šiuo metu nėra tokios terpės, kuri būtų tinkama ir optimali visiems mikroorganizmams. Taikant genotipinius metodus yra tiriamas mikroorganizmų genomai, o gauti rezultatai nepriklauso nuo auginimo sąlygų ir naudojamos terpės. Dažniausiai taikomi genotipiniai metodai yra specifinių rūšių polimerazinė grandininė reakcija (angl. *polymerase chain reaction* – PCR), kiti polimerazinėmis grandininėmis reakcijomis pagrįsti metodai ir 16S rRNR/16S ribosomų DNR

⁴Sporuliacija – endosporų formavimosi procesas.

(rDNR) genų sekos nustatymas. Pastarasis metodas yra laikomas auksiniu standartu siekiant identifikuoti mikroorganizmus. Šie metodai pasižymi dideliu jautrumu ir leidžia tiksliai identifikuoti mikroorganizmų rūšis, tačiau analizė yra brangi, todėl tyrimo metodai sunkiai pritaikomi rutininėje klinikinėje diagnostikoje. Be to, šiuos tyrimus dažniausiai atlieka specialios institucijos, o rezultatų gali tekti laukti iki trijų dienų.

Siekiant sutrumpinti analizės laiką vis dažniau bandoma pritaikyti automatines ir pusiau automatines mikroorganizmų identifikavimo sistemas, kurių veikimo principas yra pagrįstas mikroorganizmų biocheminių savybių tyrimais. Taikant automatinius identifikavimo įrenginius dažniausiai yra tiriamas mikroorganizmų augimas pasirinktoje terpėje, naudojant kolorimetrijos⁵ ir turbidimetrijos⁶ metodus. Tokiems automatiniams ir pusiau automatiniams įrenginiams būdinga trumpesnė analizės trukmė. Analizė gali užtrukti nuo 1 iki 12 valandų ir labiausiai priklauso nuo to, koks maksimalus kiekis bandinių gali būti analizuojamas įrenginyje vienu metu. Automatinės ir pusiau automatinės sistemos leidžia ne tik identifikuoti mikroorganizmų rūšį, bet taip pat ir nustatyti jų jautrumą vaistiniams preparatams. Pagrindinis tokių sistemų trūkumas yra įvairių mikroorganizmų rūšių identifikavimo tikslumas, kuris skirtingoms mikroorganizmų rūšims svyruoja nuo 43,75 % iki 100 %.

Siekiant identifikuoti skirtingas mikroorganizmų rūšis yra taikoma ir matricinė lazeriu desorbuota ir jonizuota lėkio trukmės masių spektrometrija (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight – mass spectrometry* – MALDI TOF MS). Taikant šį metodą pirmiausia tiriamasis bandinys yra sumaišomas su tirpalu vadinamu matrica, tada bandinio ir matricos mišinys yra garinamas tol, kol lieka tik kristalinė matrica su analitės molekulėmis. Kristalinė matrica veikia kaip protonų šaltinis, dėl kurio analizė yra lengviau jonizuojama. Nepažeistos mikroorganizmo ląstelės yra jonizuojamos trumpais lazerio impulsais. Jonizuotos dalelės yra greitinamos elektriniu lauku, o jas užregistravus gaunamas masių spektras. Mikroorganizmų identifikavimas atliekamas naudojant specialias programas, kurios leidžia turimą masių spektrą palyginti su duomenų bazėje esančiais spektrais. Siekiant identifikuoti mikroorganizmus taikant MALDI TOF MS metodą dažniausiai yra atliekama baltymų analizė. Šis metodas leidžia greitai ir tiksliai identifikuoti mikroorganizmus, tačiau siekiant užregistruoti masių spektrą reikalingas specialus ir sudėtingas bandinių paruošimas – jų ekstrahavimas. Mikroorganizmų identifikavimo tikslumą taikant MALDI TOF MS metodą riboja naudojamų duomenų bazių kokybė. Taip pat nustatyta, kad taikant šį metodą yra sunku identifikuoti artimas bakterijų gentis, tokias kaip *Escherichia* ir *Shigella*.

Nors visi minėti metodai šiuo metu yra taikomi siekiant identifikuoti įvairius mikroorganizmus, jie turi nemažai trūkumų: ilga analizės trukmė – tyrimas paprastai trunka nuo

⁵Kolorimetrija – metodas, kurio metu yra tiriama šviesos sugertis ir nustatoma tiriamosios medžiagos koncentracija.

⁶Turbidimetrija – tyrimo metodas, paremtas pro sistemą praėjusios šviesos intensyvumo matavimais.

vienos iki kelių dienų, bandiniai turi būti specialiai paruošiami, paruošimo metodai yra sudėtingi, užima laiko, brangiau kainuoja. Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą nėra reikalingas specialus bandinių paruošimas, išsami informacija apie tiriamąjį bandinį gali būti gaunama iš mažo medžiagos kiekio, o mikroorganizmo ATR IR sugerties spektro registravimas trunka keletą minučių. Todėl patogeninių mikroorganizmų identifikavimas, taikant FT-IR ATR spektrinį metodą, gali būti atliekamas greičiau, paprasčiau ir mažesniais kaštais [5, 6].

1.5. Chemometriniai analizės metodai

Chemometrija – matematinių ir statistinių metodų taikymas cheminiams procesams tirti, analizės metu susiejant kokybinius parametrus ir fizines savybes su analizuojamais duomenimis. Chemometrija yra plačiai taikoma spektroskopijoje siekiant atlikti spektrinių duomenų analizę, spektrų klasifikavimą ar jų modeliavimą, stebėti įvairius procesus bei atlikti jų prognozę. Pagrindiniai chemometriniai analizės metodai, kurie taikomi spektroskopijoje – principinių komponentų analizė (angl. *principal component analysis* – PCA), mažiausių kvadratų regresijos metodas (angl. *partial least squares regression* – PLS) [28-30]. Magistrantūros studijų baigiamajame darbe bus taikomi hierarchinės klasterių analizės (angl. *hierarchical cluster analysis* – HCA) ir PCA statistinės analizės metodai, todėl jie šiame skyrelyje aptariami detaliau.

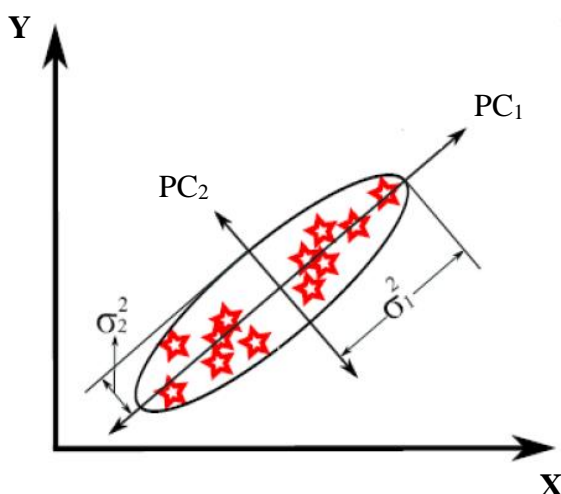
HCA yra objektų išskirstymas į atskiras grupes remiantis tam tikrais jiems būdingais požymiais. Vienoje grupėje esantys objektai yra panašūs ar susiję su savo grupėje esančiais objektais, tačiau susiję tam tikrais požymiais ir su kitose grupėse esančiais objektais. Kuo didesnis homogeniškumas grupėje ir kuo didesnis skirtumas tarp skirtingų grupių, tuo geriau išskiriamos atskiros grupės. HCA grupių atskyrimas yra atvaizduojamas dendrogramomis. Klasterių analizė gali būti atliekama taikant skirtingas jungimo metodikas (tolimiausio kaimyno, artimiausio kaimyno, centroidų, vidutinių atstumų), tačiau dažnai, siekiant apjungti objektus į grupes, yra naudojamas *Ward* algoritmas. *Ward* algoritmas yra paremtas tuo, kad kiekvienas objektas yra suvokiamas kaip atskira grupė, o kiekviename grupavimo etape yra surandama grupių pora, kuri sumažina suminį kvadratinį klaidos nuokrypį (angl. *sum of the squared error* - SSE), kuris skaičiuojamas pagal formulę:

$$SSE = \sum_{i=1}^K \sum_{x \in C_i} \text{dist}(c_i, x)^2, \quad (11)$$

čia K – klasterių skaičius, C_i – i -tasis klasteris, c_i – i -tojo klasterio centras, x – objektas klasteryje, $\text{dist}(c_i, x)^2$ – Euklidinis atstumas tarp klasterio centro ir objekto.

PCA yra vienas seniausių ir plačiausiai naudojamų statistinės analizės metodų, kurio tikslas sumažinti duomenų rinkinio matmenų skaičių (dimensiškumą), prarandant kuo mažiau informacijos ir taip palengvinant turimos duomenų bazės interpretaciją. Atliekant PCA analizę, taikomos sudėtingos matematinės procedūros tam, kad transformuot tam tikrą skaičių galimai priklausomų

kintamųjų į mažesnę skaičių tarpusavyje nekoreliuojančių komponentų, vadinamų principiais komponentais (PC). Siekiant supaprastinti didelės duomenų bazės interpretaciją, duomenys dažnai atvaizduojami PCA diagramoje, kuri sudaryta iš pirmosios ir antrosios principinių komponentų plokštumų. Pirmasis ir antrasis principiniai komponentai atitinka didžiausią duomenų dispersiją skirtingomis kryptimis ir yra parenkami taip, kad tarpusavyje sudarytų statų kampą bei kirstų centrinį kito komponento ašies tašką (4 pav.). Siekiant atlikti PCA, dažnai taikomas kovariacijos matricos metodas, kuomet pirmiausia yra apskaičiuojama kovariacijos matrica, o po to skaičiuojamos kovariacijos matricos tikrinės vertės ir tikriniai vektoriai.



4 pav. PCA diagrama, kurioje pavaizduotos didžiausios dispersijos kryptys (PC_1 ir PC_2) ir abiejų kintamųjų dispersijos (σ_1^2 ir σ_2^2) (adaptuota pagal [31])

Kovariacija parodo, kaip kintamųjų poros yra susijusios viena su kita, ir gali būti užrašyta tokia forma:

$$Cov(x, y) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}), \quad (12)$$

kur n – kintamuosius apibūdinančių verčių kiekis, x, y – kintamieji, o \bar{x}, \bar{y} – kintamųjų vidurkiai. Kovariacijos matrica yra simetrinė (pvz. $\mathbf{X} = \mathbf{X}^T$), visada teigiama ir pusiau apibrėžta matrica. Kovariacijos matricos įstrižainės vertės rodo kintamojo $x_i, i = 1, \dots, M$, dispersiją, kai tuo tarpu ne įstrižainės elementai rodo kovariaciją tarp dviejų skirtingų kintamųjų (13)

$$\begin{pmatrix} Var(x_1, x_1) & Cov(x_1, x_2) & \dots & Cov(x_1, x_M) \\ Cov(x_2, x_1) & Var(x_2, x_2) & \dots & Cov(x_2, x_M) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ Cov(x_M, x_1) & Cov(x_M, x_2) & \dots & Var(x_M, x_M) \end{pmatrix}. \quad (13)$$

Teigiama reikšmė kovariacijos matricoje rodo tiesioginę koreliaciją tarp dviejų kintamųjų, neigiama reikšmė rodo atvirkštinę koreliaciją tarp dviejų kintamųjų, o nulinė vertė rodo, kad abu kintamieji yra statistiškai nepriklausomi.

Siekiant apskaičiuoti kovariacijos matricos tikrines vertes ir tikrinius vektorius yra naudojamas sąryšis:

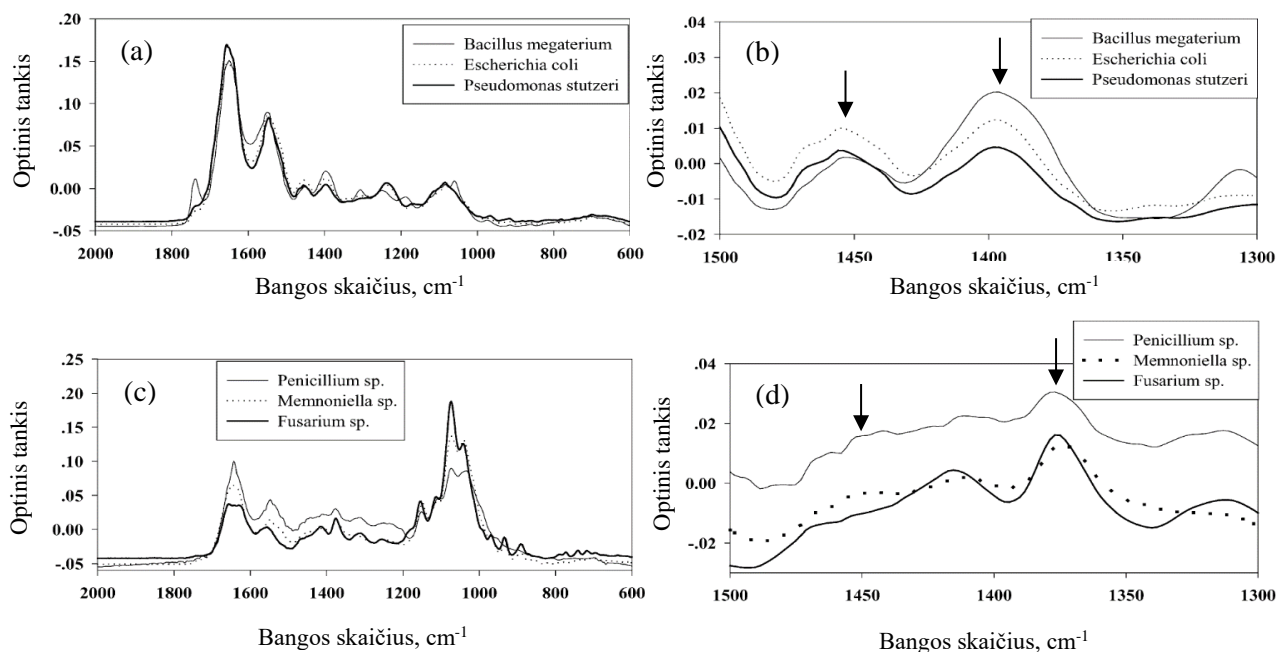
$$CV = \lambda V, \quad (14)$$

kur V – tikrinis vektorius, λ – tikrinė vertė. Tikrinės vertės yra skaliariniai dydžiai, o tikriniai vektoriai – ne nuliniai vektoriai, kurie atitinka principinius komponentus, t.y. kiekvienas tikrinis vektorius atitinka vieną principinį komponentą. Tikriniai vektoriai nurodo erdvės kryptį, o juos atitinkančios tikrinės vertės nurodo tikrinio vektoriaus dydį. Tikrinio vektoriaus dydis nurodo principinio komponento svarbą [31-33].

1.6. Patogeninių mikroorganizmų identifikavimas FT-IR spektriniu metodu

FT-IR spektrinis metodas yra naudojamas daugelyje mokslinių sričių ir tampa vis dažniau pritaikomas biochemijoje ir biomedicinoje. Šis metodas yra jautrus, greitas, nebrangus bei teikia išsamią kokybinę ir kiekybinę cheminę informaciją apie tiriamąjį bandinį. Įvairių mokslinių tyrimų rezultatai rodo, kad FT-IR spektrinis metodas yra tinkamas įvairių biologinių sistemų identifikavimui, todėl gali būti pritaikytas ir siekiant identifikuoti patogeninius mikroorganizmus [34].

FT-IR spektrinis metodas šiuo metu nėra plačiai taikomas siekiant identifikuoti skirtingas patogeninių mikroorganizmų rūšis. Yra atlikta tik keletas mokslinių tyrimų, kuriuose siekiama atskirti bakterijas nuo grybelių, ir tokiuose tyrimuose dažniau taikoma FT-IR mikrospektroskopija [7-9]. Taikant FT-IR mikrospektroskopijos metodą yra tirti *B. magaterium*, *E. coli*, *P. stutzeri* bakterijų ir fiziologinio tirpalo mišiniai bei *Penicillium* sp., *Memnoniella* sp. ir *Fusarium* sp. grybelių ir fiziologinio tirpalo mišiniai [7]. Pagrindiniai spektriniai žymenys, kuriais remiantis galima identifikuoti bakterijas ir grybelius, yra trys spektrinės juostos, esančios ties 1450 cm^{-1} , 1396 cm^{-1} ir 1377 cm^{-1} (šios spektrinės juostos 5 pav. pažymėtos rodyklėmis). Bakterijų FT-IR spektrams yra būdingos baltymams priskiriamos spektrinės juostos, esančios ties 1450 cm^{-1} ir 1396 cm^{-1} . Grybelių FT-IR spektrams yra būdinga baltymų spektrinė juosta, esanti ties 1377 cm^{-1} , o 1450 cm^{-1} spektrinė juosta yra stebima kaip spektrinės juostos, esančios ties 1410 cm^{-1} , petys.



5 pav. (a) skirtingų rūšių bakterijų ir (c) skirtingų rūšių grybelių FT-IR sugerties spektrai spektriniame intervale nuo 2000 cm^{-1} iki 600 cm^{-1} , (b) skirtingų rūšių bakterijų ir (d) skirtingų rūšių grybelių FT-IR spektrai spektriniame intervale nuo 1500 cm^{-1} iki 1300 cm^{-1} (adaptuota pagal [7]).

FT-IR mikrospektroskopijos metodas pritaikytas ir patogeninių mikroorganizmų identifikavimui, kuriais buvo užkrėstos mėgintuvėlyje užaugintos žaliosios markatos inkstų ląstelės. Tyrimas atliktas registruojant užkrėstų žaliosios markatos inkstų ląstelių ir fiziologinio tirpalo mišinių FT-IR spektrus. Nustatyta, kad pagrindiniai spektriniai skirtumai tarp bakterijų, grybelių ir virusų FT-IR spektrų yra stebimi $1070\text{ cm}^{-1} - 980\text{ cm}^{-1}$, $1385\text{ cm}^{-1} - 1360\text{ cm}^{-1}$ ir $1670\text{ cm}^{-1} - 1620\text{ cm}^{-1}$ spektriniuose intervaluose. Ląstelių kultūrų, kurios infekuotos grybeliu, FT-IR spektruose yra būdingos spektrinės juostos, esančios ties 1030 cm^{-1} ir 1373 cm^{-1} . Ląstelių kultūrų, kurios infekuotos bakterijomis, FT-IR spektruose yra stebima didelio intensyvumo spektrinė juosta, esanti ties 1657 cm^{-1} . Yra teigiama, kad pagrindiniai spektriniai žymenys, leidžiantys identifikuoti patogeninį mikroorganizmą, yra spektrinių juostų, esančių ties 857 cm^{-1} ir 1650 cm^{-1} , poslinkis. Spektrinė juosta, esanti ties 857 cm^{-1} yra priskiriama angliavandeniams, o spektrinė juosta, esanti ties 1650 cm^{-1} , priskiriama baltymų Amidas I grupei [8].

Yra atlikti tyrimai, kurių metu FT-IR mikrospektroskopijos metodas palygintas su Ramano sklaidos mikrospektroskopijos metodu. Šio mokslinio tyrimo metu buvo registruojami bakterijų ir grybelių, užaugintų laboratorinėmis sąlygomis, spektrai bei bakterijų ir mielių, užaugintų paėmus iš sergančių pacientų kraujo mėginius, spektrai. Pagrindiniai spektriniai skirtumai tarp skirtingų patogeninių rūšių nėra aptariami, tačiau užregistruotiems spektrams atlikta HCA, tiesinė diskriminantinė analizė (angl. *linear discriminant analysis* – LDA), bei dirbtinio neuroninio tinklo (angl. *artificial neural networks* – ANN) analizė. Pirmiausia analizė buvo atliekama su duomenų baze, kurią sudarė spektrai iš laboratorinėmis sąlygomis užaugintų patogeninių mikroorganizmų. Nustatyta, kad taikant tiek Ramano sklaidos, tiek FT-IR spektroskopinius metodus, skirtingos

patogeninių mikroorganizmų rūšys identifikuojamos dideliu tikslumu. Taikant FT-IR spektrinį metodą teisingai identifikuotos 116 iš 120 mikroorganizmų rūšių, o taikant Ramano sklaidos spektroskopinį metodą - 132 iš 140. Toliau analizė buvo atliekama patogeninių mikroorganizmų, užaugintų paėmus iš sergančių pacientų kraujo mėginius, spektrams. Taip buvo siekiama įvertinti metodų pritaikomumą klinikinėje diagnostikoje. Buvo nustatyta, kad patogeninių mikroorganizmų identifikavimas taikant Ramano sklaidos spektroskopinį metodą siekia 92,2 %, o taikant FT-IR spektrinį metodą 98,3 % [9].

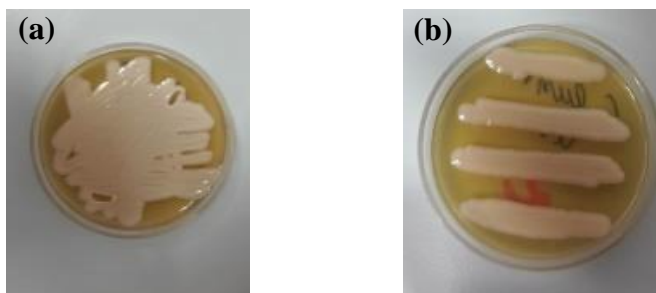
Šiuo metu FT-IR spektrinis metodas kiek plačiau yra taikomas siekiant identifikuoti skirtingas tik bakterijų arba tik grybelių rūšis. Siekiant identifikuoti skirtingas grybelių rūšis yra atlikti moksliniai tyrimai, kurių metu registruoti grybelių, aptinkamų augaluose, FT-IR spektrai. Užregistravus FT-IR spektrus ir pritaikius HCA, PCA ir LDA statistinės analizės metodus, nustatyta, kad augaluose aptinkamas grybelis gali būti identifikuotas 85,5 % – 99,7 % tikslumu [35-36]. Taip pat atliktas tyrimas, kurio metu buvo siekiama nustatyti FT-IR spektrinio metodo identifikavimo tikslumą, registruojant patogeninių grybelių FT-IR spektrus. Pritaikius HCA ir PCA statistinės analizės metodus nustatyta, kad FT-IR spektrinio metodo tikslumas, identifikuojant skirtingas patogeninių grybelių rūšis, siekia 95,6 % – 99,7 % [37]. Yra atlikta ir mokslinių tyrimų, kurių metu, taikant FT-IR spektrinį metodą, siekiama nustatyti geriausią grybelių bandinių paruošimo protokolą [38]. Moksliniuose tyrimuose, kuriuose yra atliekami eksperimentai su skirtingomis bakterijų rūšimis ir jų mišiniais, rodo, kad skirtingos bakterijų rūšys bei mišiniai, kuriuos sudaro skirtingos bakterijų rūšys, gali būti identifikuoti didesniu nei 85 % tikslumu [34, 39-40].

Apibendrinus, galima teigti, kad šiuo metu FT-IR spektrinis metodas yra daug plačiau taikomas siekiant atskirti tik bakterijų arba tik grybelių rūšis, tačiau nėra plačiai taikomas siekiant atskirti bakterijas nuo grybelių. Tokiuose tyrimuose dažniau taikomas FT-IR mikrospektroskopijos metodas, todėl siekiant nustatyti FT-IR ATR spektrinio metodo patikimumą identifikuojant skirtingas mikroorganizmų rūšis yra reikalingi išsamūs tyrimai. Taip pat yra svarbu atlikti tyrimus su didelėmis spektrinių duomenų bazėmis, kadangi dauguma mokslinių straipsnių autorių, kurie tyrimuose taiko FT-IR mikrospektroskopijos metodą, teigia, kad išsamūs tyrimai su didelėmis spektrinių duomenų bazėmis leistų tiksliau nustatyti spektrinius žymenis, kuriais remiantis būtų identifikuotas patogeninis mikroorganizmas. Tikslus mikroorganizmo rūšies nustatymas leistų ne tik pritaikyti FT-IR ATR spektrinį metodą klinikinėje diagnostikoje, bet taip pat ir paskirti pacientui efektyvų gydymą ir taip sumažinti galimų komplikacijų riziką.

2. Eksperimentinė dalis

2.1. Mielių ir bakterijų bandinių paruošimas ir spektrų registravimas

Magistantūros studijų baigiamojo darbo metu ATR IR spektriniu metodu tirtos įvairios bakterijų ir mielių, užaugintų Petri lėkštelėse, rūšys (bandinių pavyzdžiai pateikiami 6 pav.).



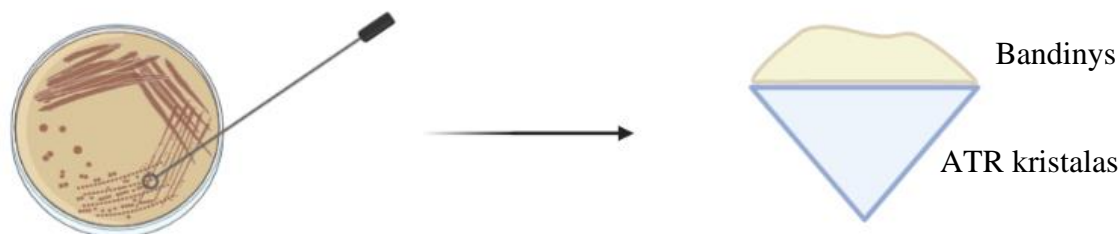
6 pav. Petri lėkštelėse esančių mikroorganizmų pavyzdžiai: (a) kai auginama viena kolonija ir (b) kai auginamos keturios kolonijos vienoje Petri lėkštelėje

Bakterijų ir mielių bandiniai gauti bendradarbiaujant su Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir Biotechnologijos katedra (VU JGMC). Tyrimas atliktas su 8 skirtingomis bakterijų ir 3 skirtingomis mielių rūšimis, iš viso ištirta 150 bandinių. Tirtų mikroorganizmų rūšys ir tirtų bandinių skaičius yra pateikiami 1 lentelėje.

1 lentelė. Tirtų mikroorganizmų rūšys ir bandinių skaičius.

Bakterijos		Mielės				
Rūšis	Bandinių skaičius	Rūšis	Bandinių skaičius			
	Nepaveikti mikroorganizmai		Nepaveikti mikroorganizmai	UV spinduliuote paveikti mikroorganizmai	Terminiu šoku paveikti mikroorganizmai	
<i>Arthrobacter</i> sp.	7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	-	-	
<i>Streptomyces</i> sp.	7	<i>Candida</i> spp:	<i>Candida lusitaniae</i>	11	11	11
<i>Sarcina</i> sp.	7		<i>Candida guilliermondii</i>	10	11	9
<i>Bacillus</i> sp.	7					
<i>Staphylococcus aureus</i>	7					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8					
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7					
<i>Escherichia coli</i>	7					

ATR IR sugerties spektrai registruoti „Bruker“ įmonės FT-IR spektrometru „Alpha“. Prieš kiekvieno bandinio spektro registravimą, siekiant užtikrinti švarų ATR kristalo paviršių, kristalas yra nuvalomas distiliuotu vandeniu ir etanoliu, užregistruojamas atraminis spektras. Tada su kilpele iš Petri lėkštelės paimamas nedidelis bandinio kiekis, dedamas ant ATR kristalo, bandiniui leidžiama išdžiūti ir užregistruojamas bandinio ATR IR sugerties spektras. Eksperimento schema yra pateikiama 7 pav.



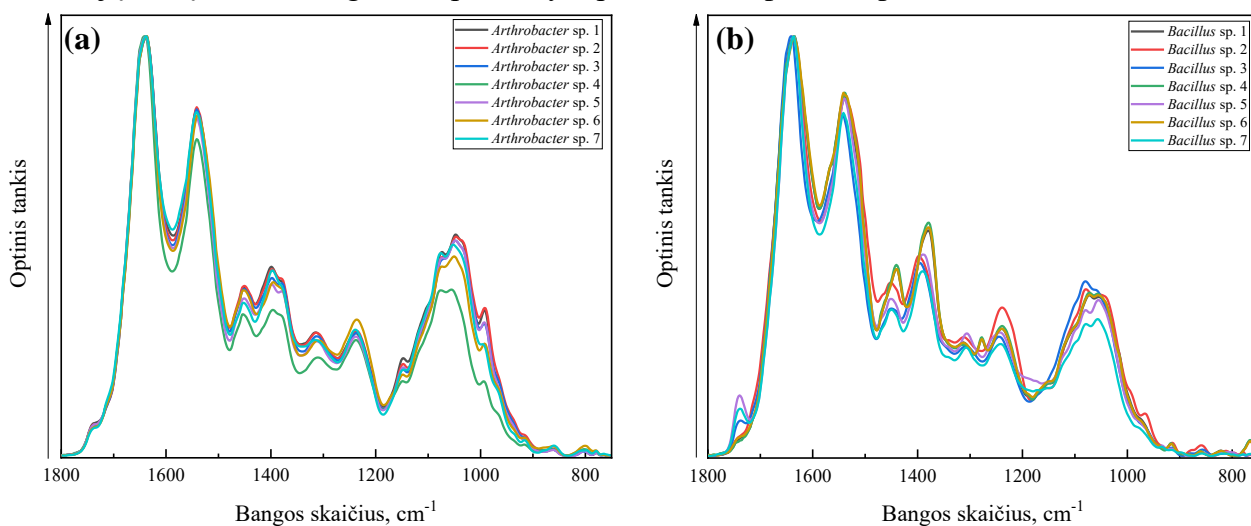
7 pav. Eksperimento schema (schema nubraižyta naudojant programinį paketą „BioRender“)

Spektrų registravimas ir apdorojimas buvo atliekamas naudojant programinį paketą „OPUS“. ATR IR sugerties spektrai registruoti 4000 – 400 cm^{-1} intervale, pasirenkant 4 cm^{-1} skyrą, registruojant ir suvidurkinant 64 spektrus. Visiems užregistruotiems spektrams atlikta ATR IR sugerties spektrų intensyvumo korekcija, bazinės linijos korekcija bei atliktas minimumo - maksimumo normavimas.

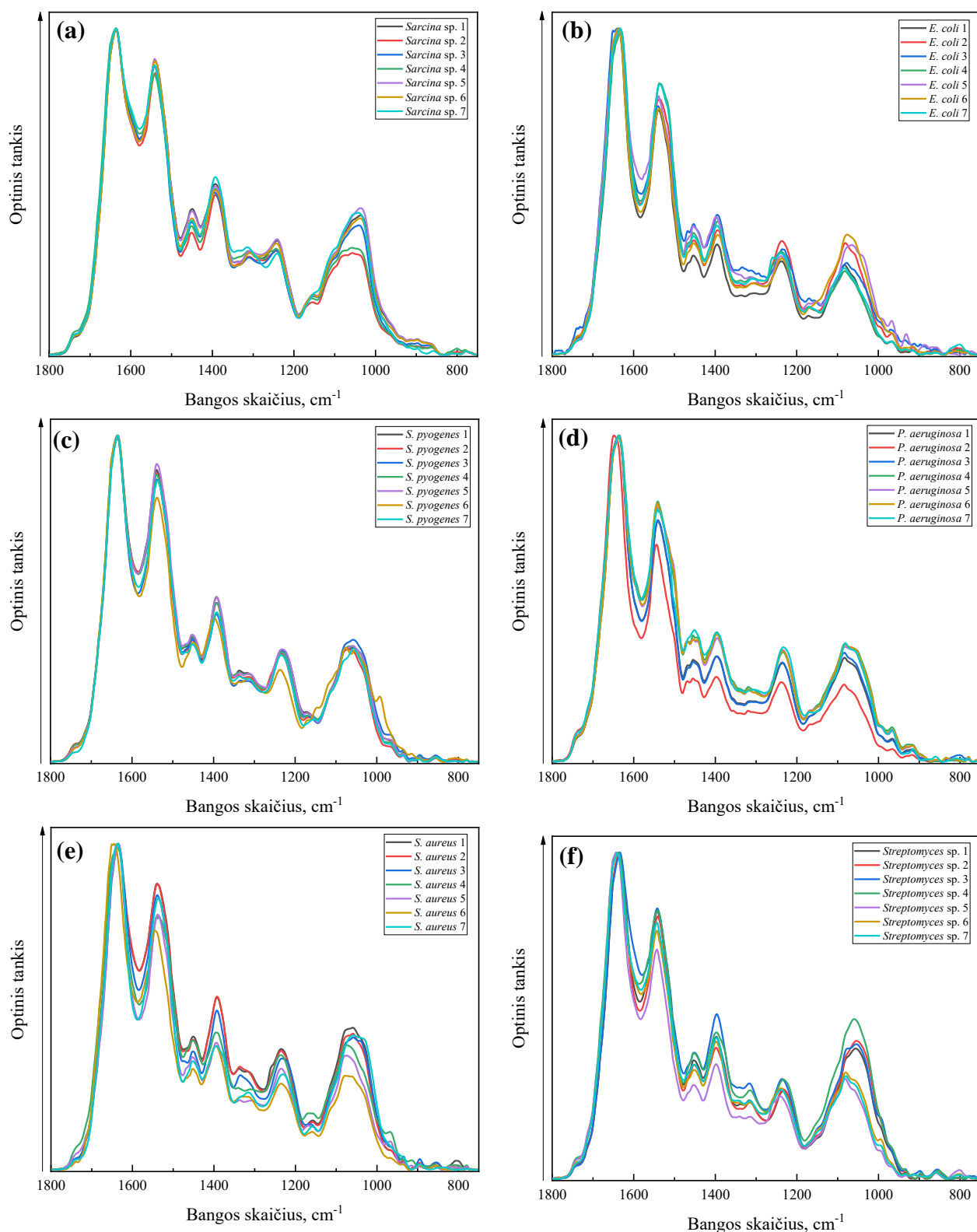
2.2. Tyrimo rezultatų analizė

2.2.1. Bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumo tyrimas

Siekiant identifikuoti skirtingas patogeninių mikroorganizmų rūšis bei skirtingas mielių ir bakterijų rūšis, yra svarbu įvertinti spektrų atsikartojamumą, todėl baigiamojo darbo metu pirmiausia įvertintas skirtingų bakterijų ir mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumas. Skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrai yra pateikiami 8 pav. ir 9 pav.



8 pav. (a) *Arthrobacter* sp. ir (b) *Bacillus* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai

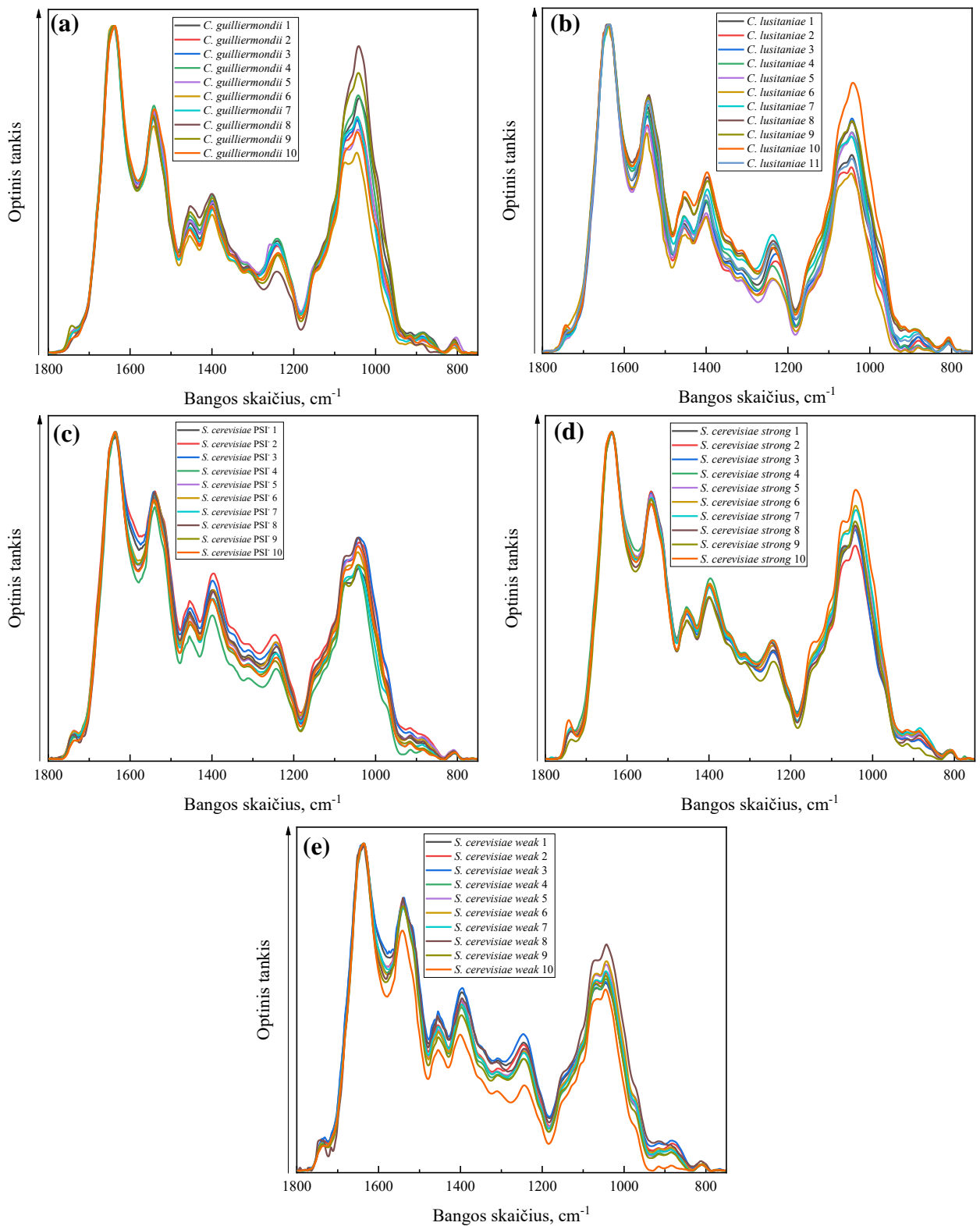


9 pav. (a) *Sarcina* sp., (b) *E. coli*, (c) *S. pyogenes*, (d) *P. aeruginosa* (e) *S. aureus* ir (f) *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai

Galima pastebėti, kad tų pačių bakterijų rūšių, kurios augintos skirtingose Petri lėkštelėse, ATR IR sugerties spektruose yra stebimi kai kurių spektrinių juostų intensyvumo pokyčiai (nustatyty pagrindinių spektrinių juostų padėtys ir medžiagos, kurių virpesiams jos priskiriamos, pateikiamos 1 priedo 1 lentelėje). Visuose tų pačių rūšių bakterijų, kurios užaugintos skirtingose Petri lėkštelėse skirtingu metu, ATR IR sugerties spektruose yra stebimas spektrinių juostų, esančių ties 1737 cm^{-1}

(lipidai, $\nu(\text{C}=\text{O})$), 1543 cm^{-1} (baltymai (Amidas II, $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$)), 1453 cm^{-1} (alkanai, acikliniai junginiai, $\delta_z(\text{CH}_2)$), 1398 cm^{-1} (riebiosios ir amino rūgštys, $\nu_s(\text{C}=\text{O})$), 1373 cm^{-1} (nukleobazės (guaninas, citozinas, $\nu(\text{C-N})$)), 1340 cm^{-1} (baltymai (kolagenas, $\delta_w(\text{CH}_2)$)), 1312 cm^{-1} (baltymai), 1238 cm^{-1} (fosfatas I, baltymai, $\nu_a(\text{P}=\text{O})$), intensyvumo kitimas. Be jau minėtų spektrinių juostų, *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose yra stebimas ir spektrinių juostų, esančių spektrinėje srityje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , kuri susijusi su bakterijų ląstelių sienelėse esančiais angliavandeniais, intensyvumo kitimas. *Bacillus* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose taip pat yra stebimas spektrinių juostų, esančių spektriniame intervale nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , intensyvumo kitimas, o kai kurių *Bacillus* sp. bakterijų bandinių ATR IR sugerties spektruose stebimas žymus spektrinių juostų, esančių ties 1440 cm^{-1} (lipidai, $\delta(\text{CH}_2)$) ir 1382 cm^{-1} (angliavandeniai, $\delta(\text{COH})$), intensyvumo padidėjimas. *Sarcina* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose pagrindiniai spektriniai skirtumai yra stebimi spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , kur yra stebimas spektro kontūro pokytis. Spektro kontūro pokytis kai kurių *Sarcina* sp. bakterijų bandinių ATR IR sugerties spektruose yra stebimas dėl žymaus spektrinės juostos, esančios ties 1038 cm^{-1} (angliavandeniai (ribozė, $\nu(\text{C-O})$)), intensyvumo padidėjimo. *S. pyogenes*, *S. aureus*, *Streptomyces* sp. ir *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektruose taip pat yra stebimi spektro kontūro pokyčiai spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} . *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektruose, spektro kontūro pokyčiai, minėtoje spektrinėje srityje, yra stebimi dėl spektrinių juostų, esančių ties 1151 cm^{-1} (angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), 1117 cm^{-1} (RNR, $\nu(\text{C-O})$), 1074 cm^{-1} (angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), 1057 cm^{-1} (angliavandeniai (deoksiribozė, $\nu(\text{C-O})$)), 1028 cm^{-1} (angliavandeniai (glikogenas, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-O-H})$)), 992 cm^{-1} (angliavandeniai (ribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$)), intensyvumo kitimo. *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektruose, spektro kontūro pokytis yra matomas dėl spektrinių juostų, esančių ties 1082 cm^{-1} (fosfatas, $\nu_s(\text{PO}_2^-)$), 1057 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , intensyvumo kitimo. *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose, spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , spektro kontūro pokytis yra stebimas dėl spektrinių juostų, esančių ties 1082 cm^{-1} ir 1057 cm^{-1} , intensyvumo kitimo. *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektruose spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , yra stebimas spektrinių juostų, esančių ties 1170 cm^{-1} (baltymai, $\nu_a(\text{CO-O-C})$), 1151 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} , 1038 cm^{-1} , 992 cm^{-1} , 967 cm^{-1} (angliavandeniai (deoksiribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$)), intensyvumo kitimas. *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektruose taip pat stebimas ir spektrinės juostos, esančios ties 1260 cm^{-1} (fosfatas I, $\nu_a(\text{PO}_2^-)$), intensyvumo kitimas. *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektruose žymus spektro kontūro pokytis spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , nestebimas ir stebimas tik spektrinių juostų, esančių ties 1082 cm^{-1} ir 1057 cm^{-1} , intensyvumo kitimas.

Tos pačios rūšies mielių, kurios augintos skirtingose Petri lėkštelėse skirtingu metu, ATR IR sugerties spektrai pateikiami 10 pav.



10 pav. (a) *C. guilliermondii*, (b) *C. lusitaniae*, (c) *S. cerevisiae* PSI, (d) *S. cerevisiae* strong ir (e) *S. cerevisiae* weak mielių ATR IR sugerties spektrai

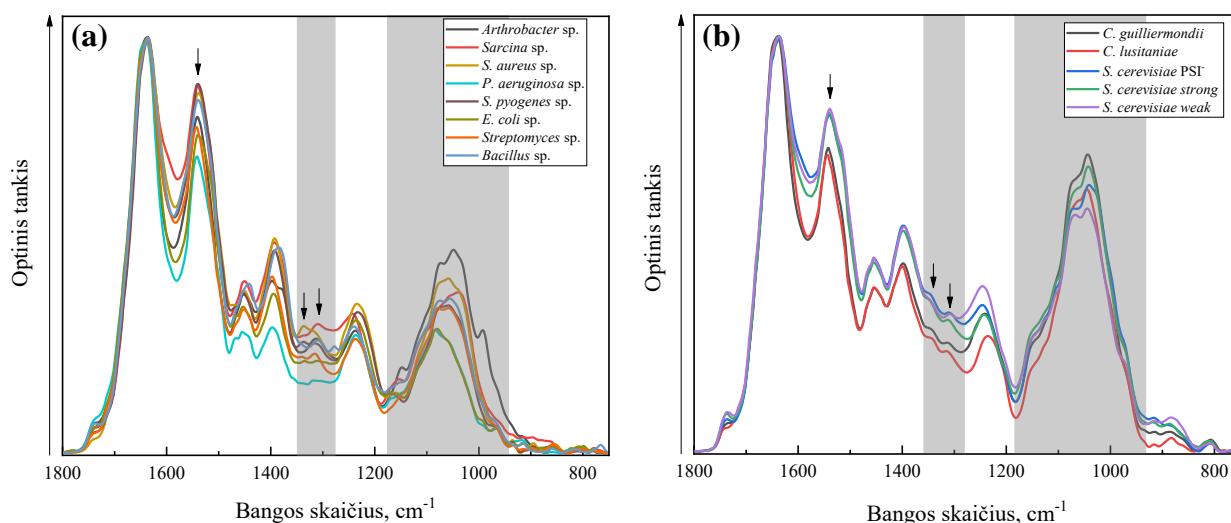
Tos pačios rūšies mielių, kurios augintos skirtingose Petri lėkštelėse skirtingu metu, ATR IR sugerties spektrai atsikartoja geriau nei bakterijų ATR IR sugerties spektrai. Visais atvejais nėra stebimas naujų spektrinių juostų atsiradimas ir stebimas tik spektrinių juostų, esančių ties 1737 cm^{-1} (lipidai, $\nu(\text{C}=\text{O})$), 1543 cm^{-1} (baltymai (Amidas II, $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$)), 1453 cm^{-1} (alkanai, acikliniai

junginiai, $\delta_z(\text{CH}_2)$), 1398 cm^{-1} (riebiosios ir amino rūgštys, $\nu_s(\text{C}=\text{O})$), 1340 cm^{-1} (baltymai (kolagenas, $\delta_w(\text{CH}_2)$)), 1312 cm^{-1} (baltymai), 1238 cm^{-1} (fosfatas I, baltymai, $\nu_a(\text{P}=\text{O})$), bei spektrinių juostų, esančių spektrinėje srityje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , intensyvumo kitimas.

Apibendrinus galima teigti, kad tos pačios rūšies mielių, kurios augintos skirtingose Petri lėkštelėse skirtingu metu, ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumas yra geresnis negu bakterijų ATR IR sugerties spektrų. Spektrinių juostų intensyvumo kitimas, bei spektro kontūro pokyčiai gali daryti įtaką skirtingų patogeninių mikroorganizmų rūšių identifikavimo tikslumui ir yra stebimi dėl nehomogeninio bandinio pasiskirstymo Petri lėkštelėje ir nulemti patogeninių mikroorganizmų auginimo sąlygų, kurias kiekvieną kartą sunku išlaikyti identiškais.

2.2.2. Patogeninių bakterijų ir mielių identifikavimas

Baigiamojo darbo metu tyrimas atliktas su 8 skirtingų rūšių bakterijomis ir 3 skirtingų rūšių mielėmis, iš viso ištirta 150 bandinių. Spektriniai skirtumai tarp patogeninių bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų yra stebimi „pirštų antspaudų“ ($1800\text{ cm}^{-1} - 750\text{ cm}^{-1}$) spektrinėje srityje. Kadangi gauta po keletą kiekvienos rūšies patogeninių mikroorganizmų bandinių, 11 pav. pateikiami suvidurkinti skirtingų rūšių bakterijų ir mielių bandinių ATR IR sugerties spektrai.



11 pav. Skirtingų rūšių (a) bakterijų ir (b) mielių ATR IR sugerties spektrai

Svarbiausi spektriniai skirtumai, tarp mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrų, yra stebimi spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} (ši spektrinė sritis pažymėta 11 pav. (a), (b)). Mielėse ATR IR sugerties spektruose yra stebimos intensyvios angliavandeniams priskiriamos spektrinės juostos, esančios ties 1043 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\delta(\text{C}-\text{O})$) ir 1074 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O})$). Minėtoje spektrinėje srityje taip pat stebimos ir mažesnio intensyvumo angliavandeniams priskiriamos spektrinės juostos, esančios ties 1151 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O})$), 1106 cm^{-1} (polisacharidai, $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$), 997 cm^{-1} (ribozė, $\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$), 967 cm^{-1} (deoksiribozė, $\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$). Bakterijų ATR IR sugerties spektruose, spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , yra stebima daugiau

mažesnio intensyvumo angliavandeniams priskiriamų spektrinių juostų, esančių ties 1159 cm^{-1} (ši spektrinė juosta gali būti priskiriama ir baltymams, $\nu(\text{C-O})$), 1151 cm^{-1} , 1106 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O})$), 1057 cm^{-1} (deoksiribozė, $\nu(\text{C-O})$), 1043 cm^{-1} (gliukozė, fruktozė, glikogenas, $\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{C-O})$), 1028 cm^{-1} (glikogenas, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-O-H})$), 1016 cm^{-1} (polisacharidai, $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{OCH})$), 997 cm^{-1} (ribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$), 992 cm^{-1} (ribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$), 967 cm^{-1} (deoksiribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$), RNR priskiriama spektrinė juosta, esanti ties 1117 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O})$), baltymams priskiriama spektrinė juosta, esanti ties 1170 cm^{-1} ($\nu_a(\text{CO-O-C})$), bei fosfatams priskiriama spektrinė juosta, esanti ties 1082 cm^{-1} ($\nu_s(\text{PO}_2^-)$).

Taip pat mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektruose yra stebimas spektro kontūro pokytis, spektriniame intervale, esančiame nuo 1360 cm^{-1} iki 1280 cm^{-1} (ši spektrinė sritis pažymėta 11 pav. (a), (b)). Mielių ATR IR sugerties spektre, minėtame spektriniame intervale yra stebimos dvi mažo intensyvumo spektrinės juostos, viena esanti ties 1340 cm^{-1} , kuri priskiriama kolageno $\delta_w(\text{CH}_2)$ virpesiui, ir kita, esanti ties 1312 cm^{-1} , kuri priskiriama baltymams. Spektrinė juosta, esanti ties 1340 cm^{-1} , mielių ATR IR sugerties spektruose yra stebima kaip spektrinės juostos, esančios ties 1398 cm^{-1} , petys. Bakterijų ATR IR sugerties spektruose yra stebimas spektrinės juostos, esančios ties 1312 cm^{-1} , poslinkis, kuris priklauso nuo tiriamos bakterijų rūšies. Spektrinės juostos poslinkis yra stebimas intervale, esančiame nuo 1316 cm^{-1} iki 1307 cm^{-1} . Spektrinė juosta, esanti ties 1340 cm^{-1} , bakterijų ATR IR sugerties spektre yra stebima ne kaip spektrinės juostos, esančios ties 1398 cm^{-1} , petys, o jos intensyvumas priklauso nuo tiriamos bakterijų rūšies.

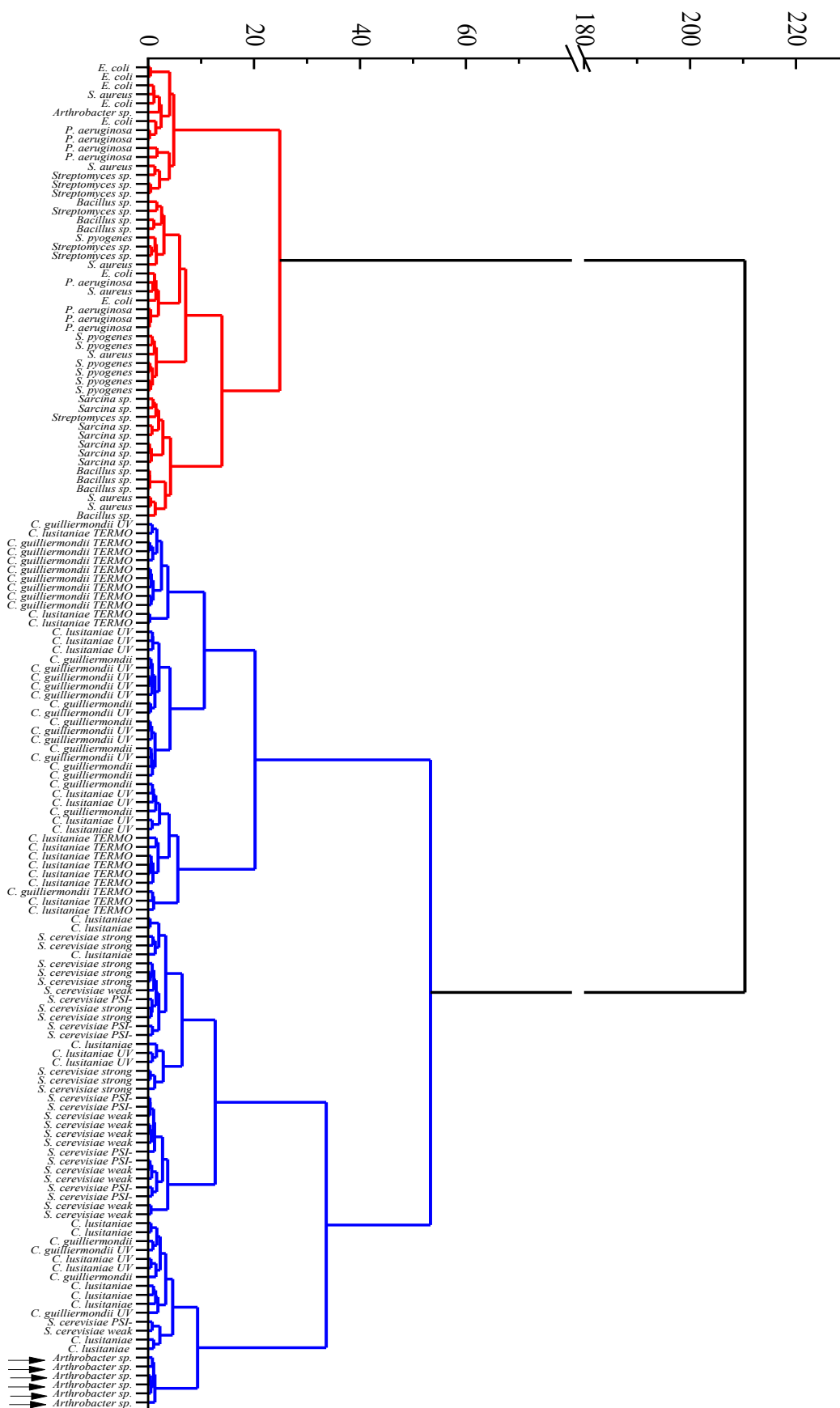
Palyginus bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrus, stebimas ir spektrinės juostos, esančios ties 1543 cm^{-1} , kuri priskiriama baltymų Amidas II grupės $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$ virpesiams, intensyvumo kitimas. Šios spektrinės juostos intensyvumas kinta priklausomai nuo tiriamojo bandinio, todėl siekiant tiksliau įvertinti šios spektrinės juostos, kaip spektrinio žymens, tinkamumą svarbu atlikti tyrimus su didesne bandinių imtimi.

Pagrindiniai spektriniai skirtumai, kurie stebimi tarp mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrų, yra susiję su mielių ir bakterijų ląstelėse esančiais angliavandeniais, kadangi mikroorganizmai siekdami išgyventi sintetina tam tikras angliavandenių turinčias struktūras (modifikuoja savo ląstelės sienelės). Šių struktūrų sintezę vykdo fermentų kompleksas, vadinamas angliavandeniuose aktyviais fermentais (angl. *carbohydrate-active enzymes* - CAZy), kuris taip pat tarpininkauja angliavandenių turinčių fermentų surinkimui bei perdirbimui. CAZy apjungia glikozidų hidrolazių, polisacharidų lipazių ir angliavandenių esterazių šeimas, angliavandenius rišančius modulius. Išoriniai angliavandeniai yra viena iš labiausiai kintančių mikrobinių ląstelių charakteristikų, o bakterijų ir grybelių glikomas (angl. *glycome*) atspindi sąveikos su nešiotuju mechanizmus bei genetinę struktūrą. Taigi daugelis patogeninių mikroorganizmų savo paviršiuje išskiria angliavandenius, o šių angliavandenių struktūra iš esmės primena tą, kuri yra mikroorganizmų

ląstelių paviršiaus glikoproteinų ir glikolipidų molekulėse. Kadangi visų mikroorganizmų ląstelių sienelėse esančių angliavandenių sudėtis ir struktūra skiriasi, yra stebimi spektriniai skirtumai tarp mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrų [41].

Magistrantūros studijų baigiamojo darbo metu siekta nustatyti patikimiausią bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo metodą pritaikant skirtingus statistinės analizės metodus, kurie atliekami pasirenkant skirtingus spektrinius intervalus. Tam tikslui pritaikyti du statistinės analizės metodai – HCA ir PCA. HCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, taikant *Ward* algoritimą. Nustatyta, kad bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrai HCA dendrogramoje yra geriausiai išskiriami į atskirus klasterius pasirenkant $1800\text{ cm}^{-1} - 750\text{ cm}^{-1}$ spektrinį intervalą. HCA dendrograma pateikiama 12 pav. (tam, kad geriau būtų matomi pavadinimai abscisių ašyje, pateikiama pasukta HCA dendrograma).

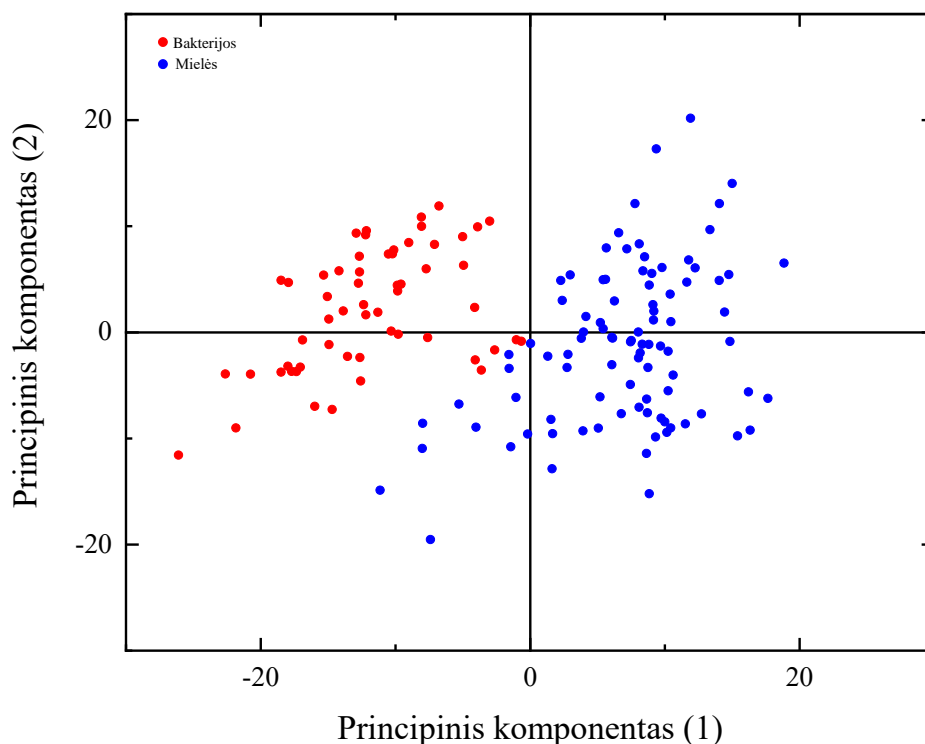
Euklidinis atstumas



12 pav. Bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1800 cm^{-1} iki 750 cm^{-1} (bakterijos yra pažymėtos raudona, mielės - mėlyna spalvomis, neteisingai grupei priskirti ATR IR sugerties spektrai pažymėti rodyklėmis)

Galima pastebėti, kad mielės ir bakterijos yra gerai išskiriamos į du atskirus klasterius. Kairėje dendrogramos pusėje, kuri pažymėta raudona spalva, yra sugrupuota didžioji dalis bakterijų ATR IR sugerties spektrų, o dešinėje dendrogramos pusėje, kuri pažymėta mėlyna spalva, sugrupuota didžioji dalis mielių ATR IR sugerties spektrų. Neteisingai grupei yra priskirti šeši *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai. Šie spektrai priskirti mielių ATR IR sugerties spektrų klasteriui. Neteisingam klasteriui *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti priskiriami, kadangi spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , yra stebimos intensyvios spektrinės juostos, o spektrinių juostų, esančių ties 1043 cm^{-1} ir 1074 cm^{-1} , padėtis ir kontūras sutampa su mielių ATR IR sugerties spektruose stebimomis spektrinėmis juostomis. Nustatyta, kad taikant HCA statistinį analizės metodą mielės gali būti identifikuotos 100 %, o bakterijos 89,9 % tikslumu.

Bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrams PCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“. Geriausiai į dvi atskiras grupes ATR IR sugerties spektrai PCA diagramoje yra sugrupuojami pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1345 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} . PCA diagrama pateikiama 13 pav.



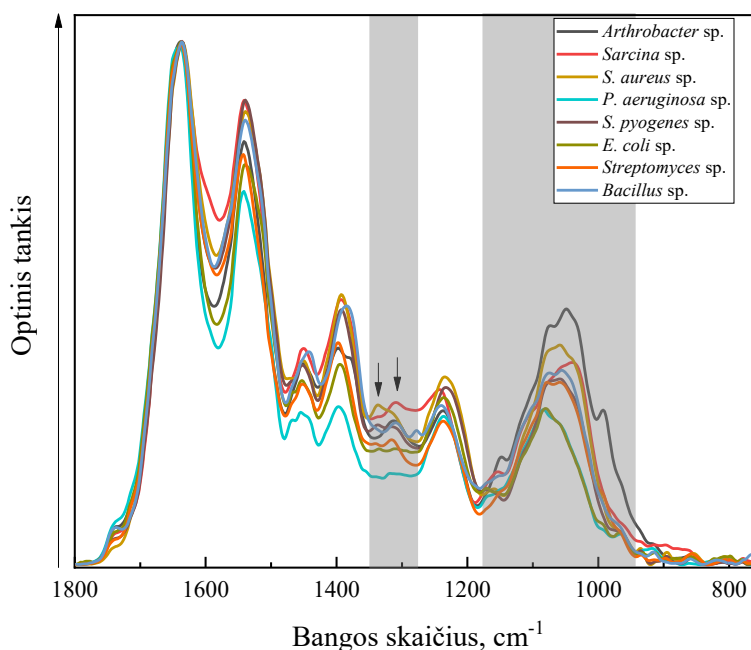
13 pav. Bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1345 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} (bakterijos yra pažymėtos raudona, o mielės - mėlyna spalvomis)

PCA diagramoje bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrai yra gerai išskirti į atskiras grupes. Penki *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra sugrupuojami arčiau mielių ATR IR sugerties spektrų klasterio. *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai arčiau mielių ATR IR sugerties spektrų klasterio gali būti priskiriami dėl tų pačių priežasčių kaip ir HCA dendrogramoje, kadangi šios rūšies bakterijų ATR IR sugerties spektruose yra stebimos intensyvios spektrinės juostos spektriniame intervale, esančiame nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , o spektrinių juostų,

esančių ties 1043 cm^{-1} ir 1074 cm^{-1} , padėtis sutampa su mielių ATR IR sugerties spektruose stebimomis spektrinėmis juostomis. Nustatyta, kad taikant PCA statistinės analizės metodą mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu, o bakterijų ATR IR sugerties spektrai 91,2 % tikslumu.

2.2.3. Skirtingų bakterijų rūšių identifikavimo tyrimas

Baigiamojo darbo metu siekta nustatyti, kaip tiksliai gali būti identifikuoti skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrai. Kadangi tos pačios rūšies bakterijų ATR IR sugerties spektruose yra stebimas spektrinių juostų intensyvumo kitimas, siekiant geriau atvaizduoti skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrus 14 pav. pateikiami kiekvienos rūšies bakterijų spektrų vidurkiai.

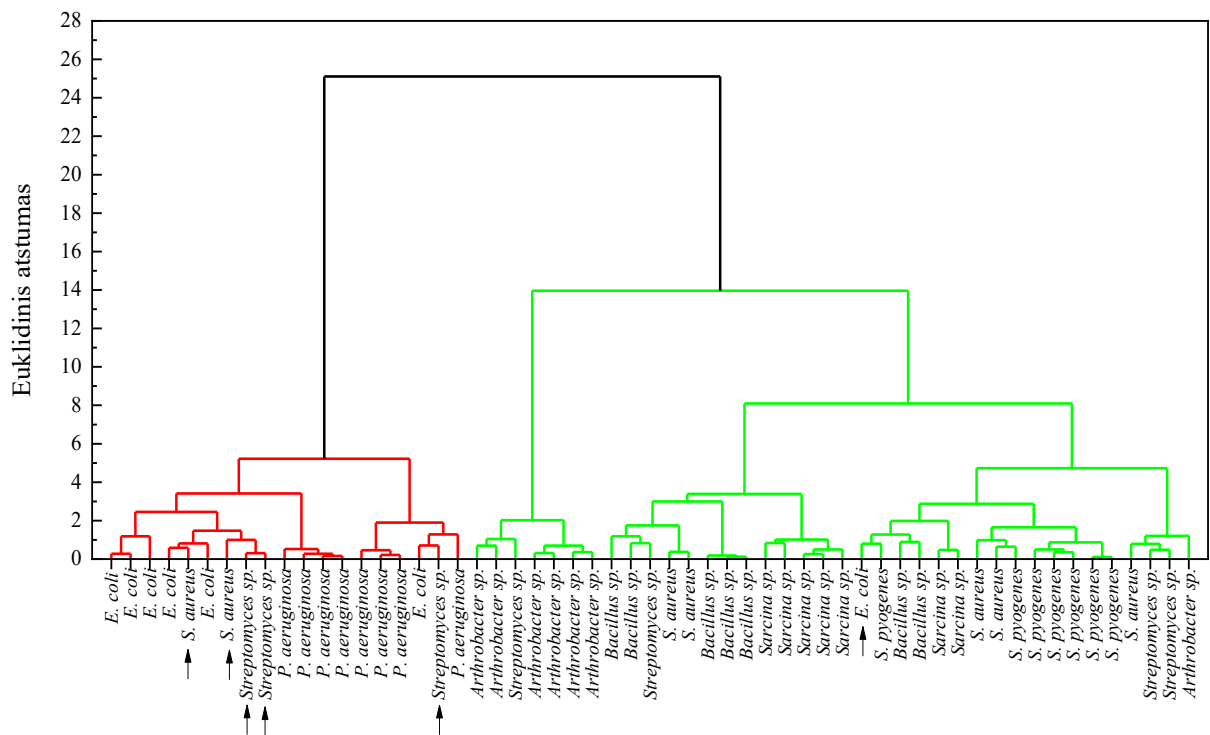


14 pav. Skirtingų rūšių bakterijų ATR IR sugerties spektrai

Pagrindiniai spektriniai skirtumai, tarp skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų, yra stebimi spektrinėje srityje, esančioje nuo 1350 cm^{-1} iki 1270 cm^{-1} , bei spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} . Skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektruose taip pat stebimas ir santykinis spektrinės juostos, esančios ties 1543 cm^{-1} , kuri priskiriama baltymų Amidų II grupės $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$ virpesiams, intensyvumo kitimas, tačiau šios spektrinės juostos intensyvumo kitimas gali būti susietas ir su nehomogeniniu tiriamojo bandinio pasiskirstymu Petri lėkštelėje ar priklausyti nuo bandinio auginimo sąlygų. *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *E. coli*, *Sarcina* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose spektrinėje srityje, esančioje nuo 1350 cm^{-1} iki 1270 cm^{-1} , yra stebima viena plati spektrinė juosta, esanti ties 1312 cm^{-1} (baltymai), *E. coli* atveju šios spektrinės juostos intensyvumas gali kisti priklausomai nuo bandinio. *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose yra stebima ne tik ties 1312 cm^{-1} esanti spektrinė juosta, tačiau ir intensyvi

spektrinė juosta, esanti ties 1340 cm^{-1} (baltymai (kolagenas, $\delta_w(\text{CH}_2)$)). Šios spektrinės juostos intensyvumas taip pat kinta priklausomai nuo bandinio. *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektruose, spektriniame intervale, esančiame nuo 1350 cm^{-1} iki 1270 cm^{-1} , yra stebimos dvi mažo intensyvumo spektrinės juostos, esančios ties 1340 cm^{-1} ir 1312 cm^{-1} . Suvidurkintuose bakterijų ATR IR sugerties spektruose galima pastebėti, kad spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , *E. coli* ir *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrai sutampa, yra stebima mažo intensyvumo spektrinė juosta, esanti ties 1170 cm^{-1} (baltymai, $\nu_a(\text{CO-O-C})$), ir didesnio intensyvumo spektrinės juostos, esančios ties 1082 cm^{-1} (fosfatas, $\nu_s(\text{PO}_2^-)$) ir 1057 cm^{-1} (angliavandeniai (deoksiribozė, $\nu(\text{C-O})$)). *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektre, spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , yra stebimos keturios intensyvios spektrinės juostos, esančios ties 1151 cm^{-1} (angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), 1074 cm^{-1} (angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), 1043 cm^{-1} (angliavandeniai (gliukozė, fruktozė, glikogenas, $\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{C-O})$)), 992 cm^{-1} (angliavandeniai (ribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$)). *S. aureus* ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektruose, minėtoje spektrinėje srityje, yra stebimos trys intensyvios, dalinai persiklojusios, spektrinės juostos, esančios ties 1074 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} ir 1043 cm^{-1} . *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektre taip pat stebima mažo intensyvumo spektrinė juosta, esanti ties 1159 cm^{-1} (baltymai, angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), o *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektre stebimos dvi mažo intensyvumo persiklojusios spektrinės juostos, esančios ties 1170 cm^{-1} ir 1159 cm^{-1} . *Bacillus* sp. ir *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektruose, spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 iki 930 cm^{-1} , yra stebimos dvi intensyvios ir dalinai persiklojusios spektrinės juostos, esančios ties 1082 cm^{-1} ir 1057 cm^{-1} , bei dvi mažo intensyvumo persiklojusios spektrinės juostos, esančios ties 1170 cm^{-1} ir 1159 cm^{-1} . *Sarcina* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektre, spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , yra stebima didelio intensyvumo spektrinė juosta, esanti ties 1028 cm^{-1} (angliavandeniai (glikogenas, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-O-H})$)), ir dvi šiek tiek mažesnio intensyvumo spektrinės juostos, esančios ties 1057 cm^{-1} ir 1082 cm^{-1} .

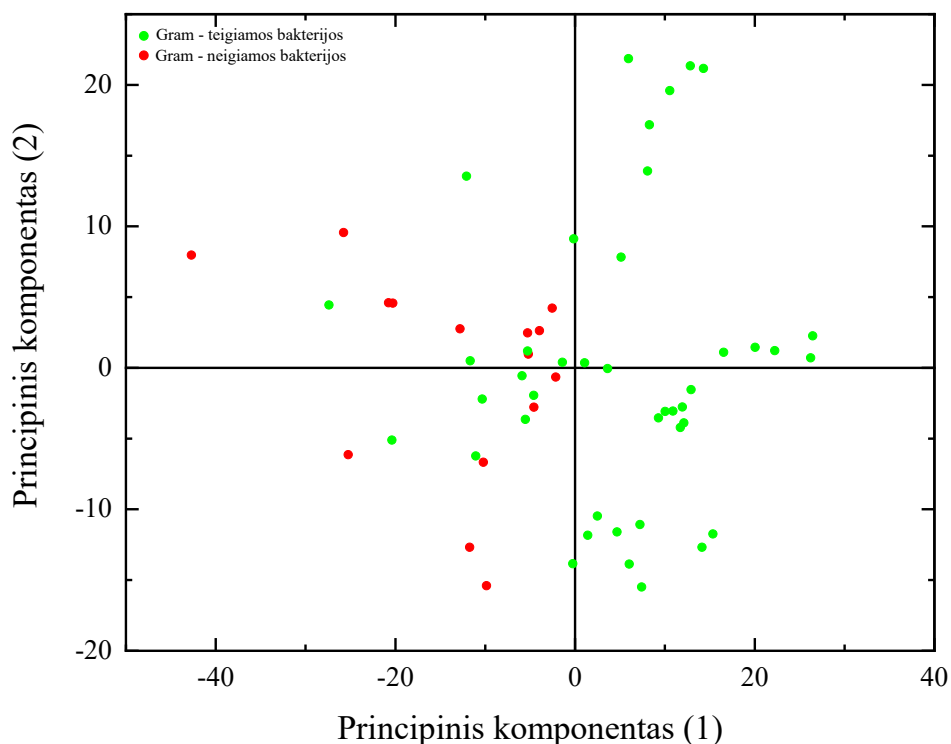
Kadangi yra žinoma, kad bakterijos gali būti skirstomos į gram – teigiamas ir gram – neigiamas bakterijas, siekiant tiksliai identifikuoti bakterijų rūšį pirmiausia atlikta statistinė ATR IR sugerties spektrų analizė, kurios tikslas spektrus išskirti į dvi atskiras grupes. Baigiamojo darbo metu gauta penkiolika gram – neigiamų bakterijų bandinių (septyni *E. coli* ir aštuoni *P. aeruginosa* bakterijų bandiniai) ir keturiasdešimt du gram – teigiamų bakterijų bandiniai (septyni *Arthrobacter* sp., septyni *S. aureus*, septyni *S. pyogenes*, septyni *Streptomyces* sp., septyni *Bacillus* sp. ir septyni *Sarcina* sp. bakterijų bandiniai). Statistinei analizei atlikti taikyti du statistinės analizės metodai – HCA ir PCA. HCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, taikant Ward algoritimą, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1440 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} . HCA dendrograma pateikiama 15 pav.



15 pav. Skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1440 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} (gram – teigiamos bakterijos pažymėtos žalia, gram – neigiamos – raudona spalvomis, neteisingai grupei priskirti ATR IR sugerties spektrai pažymėti rodyklėmis)

Galima pastebėti, kad gram – teigiamų ir gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra gerai išskirti į atskirus klasterius. Kairėje dendrogramos pusėje yra sugrupuota didžioji dalis gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų, kuri pažymėta raudona spalva, dešinėje dendrogramos pusėje didžioji dalis gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų, kuri pažymėta žalia spalva. Gram – neigiamų bakterijų klasteriui teisingai priskirta keturiolika ATR IR sugerties spektrų, o gram – teigiamų bakterijų klasteriui – trisdešimt septyni ATR IR sugerties spektrai. Neteisingoms grupėms priskirtas vienas *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektras, du *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrai ir trys *Streptomyces sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrai. Todėl galima teigti, kad gram – neigiamos bakterijos gali būti identifikuojamos 93,3 % tikslumu, o gram – teigiamos bakterijos 88,1 % tikslumu.

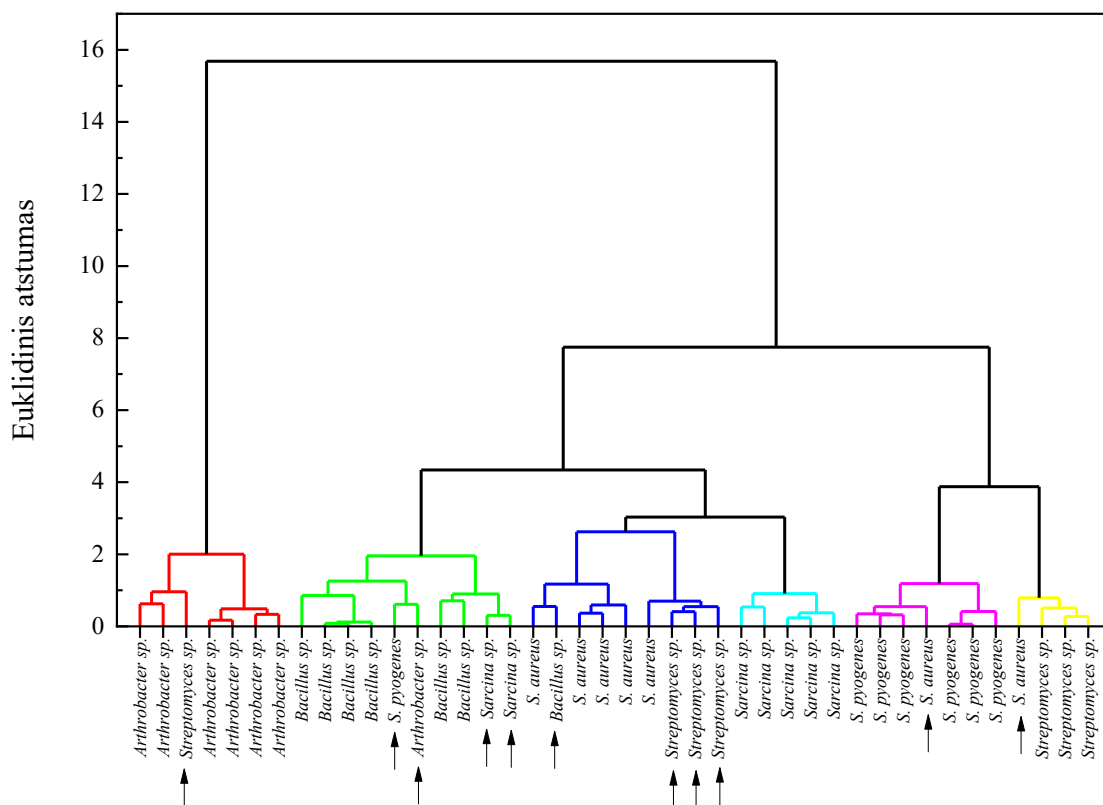
PCA analizė atlikta taikant programinį paketą „Origin“, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1800 cm^{-1} iki 750 cm^{-1} . PCA diagrama pateikiama 16 pav.



16 pav. Skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1800 cm^{-1} iki 750 cm^{-1} (gram – teigiamos bakterijos yra pažymėtos žalia, o gram – neigiamos bakterijos - raudona spalvomis)

Didesnė dalis gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų (trisdešimt vienas ATR IR sugerties spektras) yra sugrupuojami dešinėje PCA diagramos pusėje, tačiau vienuolika gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų yra priskiriami arčiau gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasterio. Todėl remiantis PCA diagrama galima teigti, kad gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 %, o gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 73,6 % tikslumu.

Atskyrus gram – teigiamų ir gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrus baigiamojo darbo metu siekta nustatyti ar galima tiksliai identifikuoti bakterijų rūšį remiantis ATR IR sugerties spektrais. Tam tikslui buvo pritaikyti HCA ir PCA statistinės analizės metodai. Skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA atlikta naudojant programinį paketa „Origin“, taikant *Ward* algoritimą, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1264 cm^{-1} iki 951 cm^{-1} . HCA dendrograma pateikiama 17 pav.

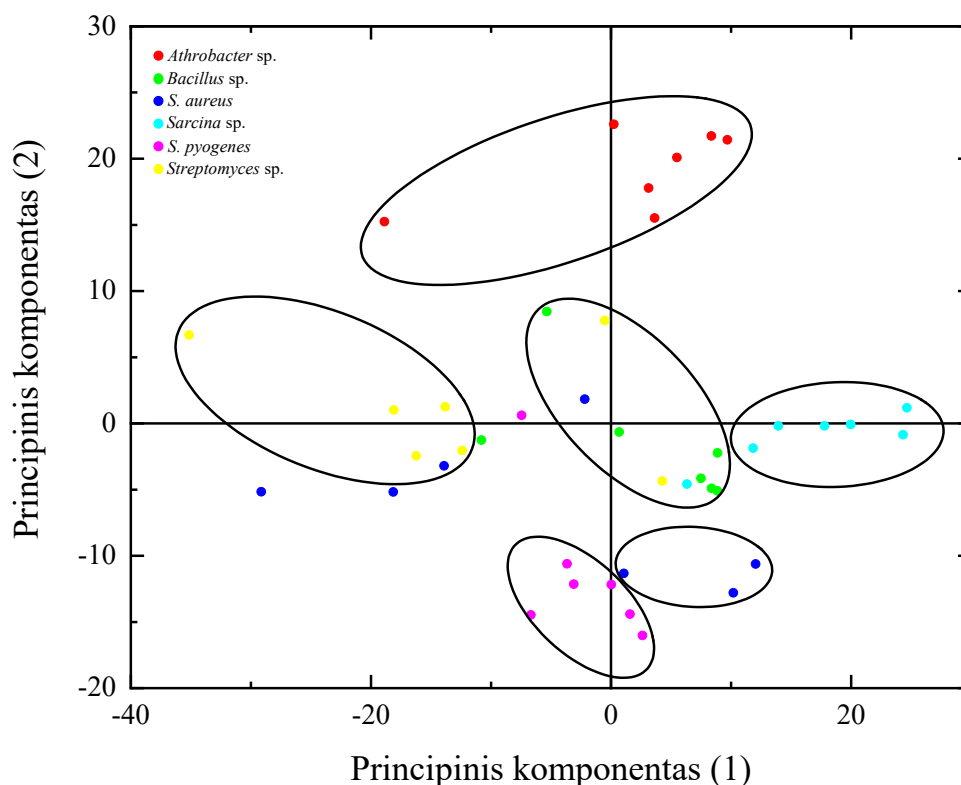


17 pav. Skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1264 cm^{-1} iki 951 cm^{-1} (neteisingai grupei priskirti ATR IR sugerties spektrai pažymėti rodyklėmis)

Skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrai išskirti į šešis atskirus klasterius. Galima pastebėti, kad *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, kuris pažymėtas raudona spalva, priskiriami šeši *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai ir vienas *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektras. *Bacillus* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, kuris pažymėtas žalia spalva, priskiriami šeši *Bacillus* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai, po vieną *S. pyogenes* ir *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrą ir du *Sarcina* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai. *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, kuris pažymėtas mėlyna spalva, priskiriami penki *S. aureus*, trys *Streptomyces* sp. ir vienas *Bacillus* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai. *Sarcina* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, kuris pažymėtas žydra spalva, priskirti penki *Sarcina* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai. *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, kuris pažymėtas rožine spalva, priskirti šeši *S. pyogenes* ir vienas *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrai. *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, kuris pažymėtas geltona spalva, priskirti trys *Streptomyces* sp. ir vienas *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrai. Įvertinus identifikavimo tikslumą galima teigti, kad *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 85,7 % tikslumu, *Sarcina* sp. ir *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 71,4 % tikslumu, o *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai 42,9 % tikslumu. Identifikavimo tikslumui didelę įtaką gali daryti žymus tos pačios rūšies

bakterijų ATR IR sugerties spektruose stebimas spektrinių juostų intensyvumo kitimas, kuris gali priklausyti nuo nehomogeninio bandinio pasiskirstymo Petri lėkštelėje, bei nuo auginimo sąlygų, kurias sunku kiekvieną kartą išlaikyti identiškas.

Skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, pasirenkant visą tiriamą spektrinį intervalą ($1800\text{ cm}^{-1} - 750\text{ cm}^{-1}$). PCA diagrama pateikiama 18 pav.

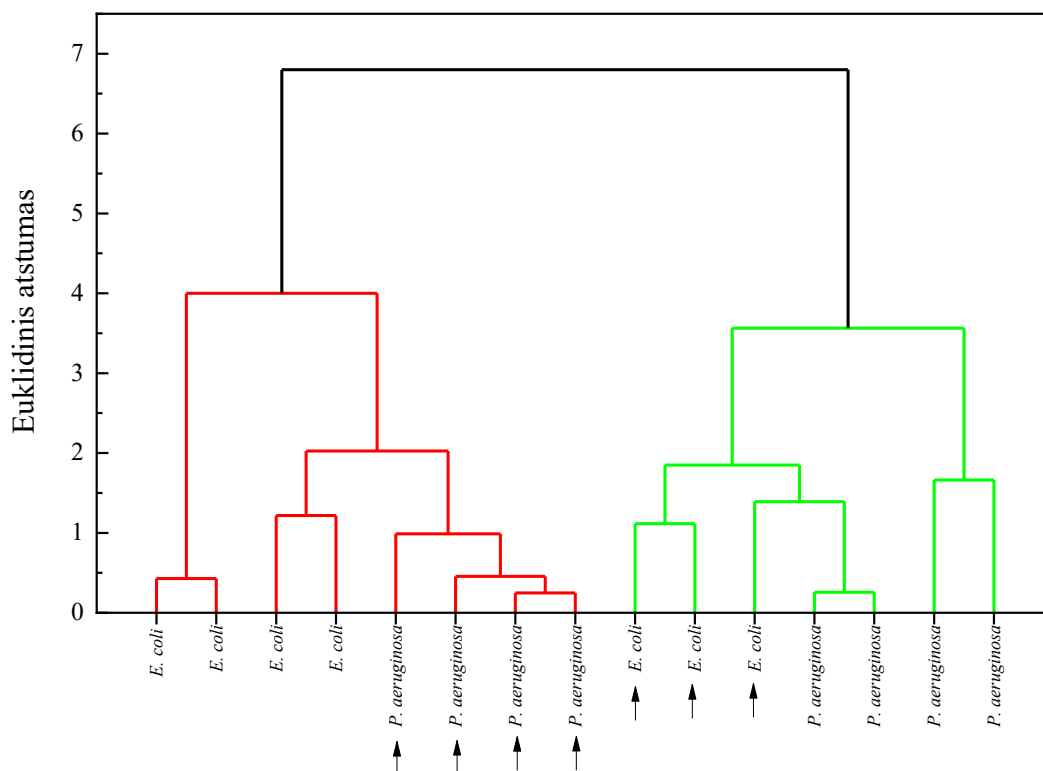


18 pav. Skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1800 cm^{-1} iki 750 cm^{-1}

PCA diagramoje, kaip ir HCA dendrogramoje, skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų klasteriai nėra tiksliai išskiriami, o skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektram būdinga didelė dispersija. Didelė ATR IR sugerties spektrų dispersija, kaip ir HCA atveju, gali būti paaiškinta prastu spektrų atsikartojamumu. Remiantis PCA diagrama galima teigti, kad *Arthrobacter sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu. *Bacillus sp.*, *Sarcina sp.* ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 85,7 % tikslumu. Vienas *Bacillus* bakterijų ATR IR sugerties spektras yra priskiriamas arčiau *Streptomyces sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasterio, ir po vieną *Sarcina sp.* ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrą yra priskiriama arčiau *Bacillus sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasterio. *Streptomyces sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 71,4 % tikslumu, netiksliai priskirti du *Streptomyces sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrai, kurie yra priskiriami arčiau *Bacillus sp.* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasterio. Taikant PCA

statistinės analizės metoda prasčiausiai identifikuojami *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrai. Šios rūšies bakterijų ATR IR sugerties spektrai identifikuojami 42,9 % tikslumu.

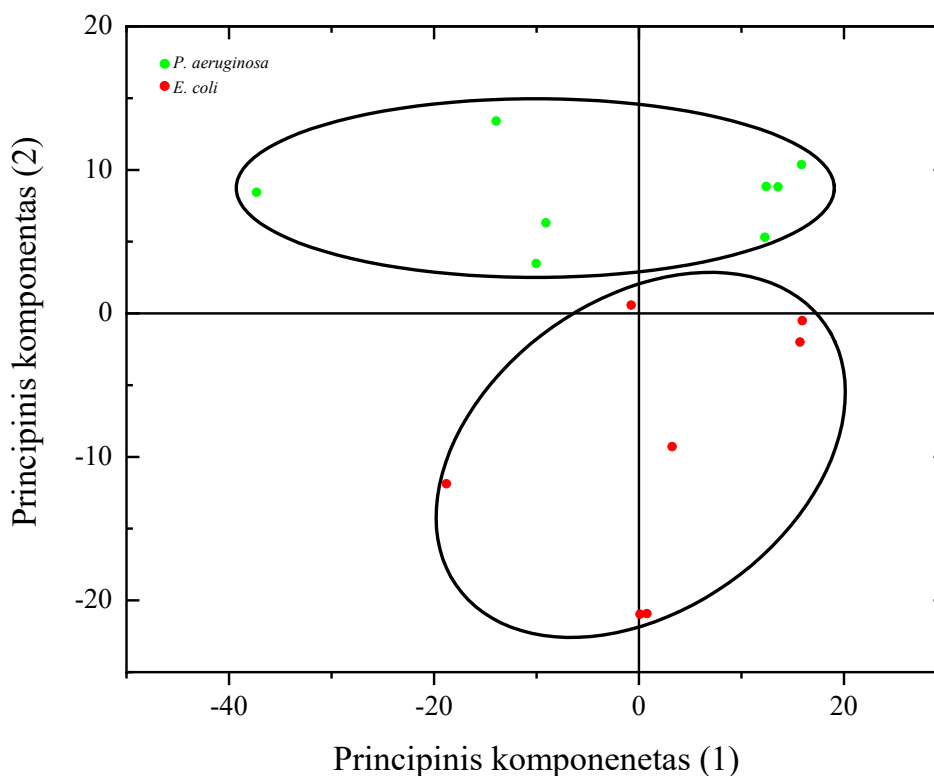
Siekiant nustatyti skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumą taip pat atliktos HCA ir PCA. HCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, taikant *Ward* algoritimą, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1720 cm⁻¹ iki 951 cm⁻¹. HCA dendrograma pateikiama 19 pav.



19 pav. Skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1720 cm⁻¹ iki 951 cm⁻¹ (neteisingai grupei priskirti ATR IR sugerties spektrai pažymėti rodyklėmis)

Remiantis HCA dendrograma, galima pastebėti, kad *E. coli* ir *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra netiksliai išskiriami į atskirus klasterius. Keturi *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra priskiriami *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui ir trys *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra priskiriami *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrų klasteriui, todėl *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas siekia tik 57,1 %, o *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas siekia tik 50 %. Mažas identifikavimo tikslumas gali būti siejamas su prastu tos pačios rūšies bakterijų ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumu.

Skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, pasirenkant 1800 cm⁻¹ – 750 cm⁻¹ spektrinį intervalą. PCA diagrama pateikiama 20 pav.



20 pav. Skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1800 cm^{-1} iki 750 cm^{-1}

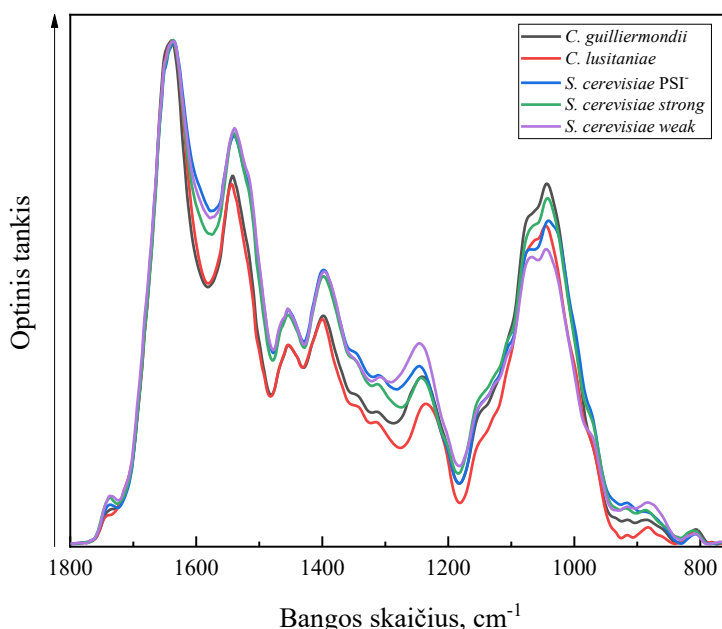
Galima pastebėti, kad *E. coli* ir *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrams būdinga didelė dispersija, kuri gali būti nulemta prasto tos pačios rūšies bakterijų ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumo. Tačiau didelė duomenų dispersija, priešingai nei HCA atveju, nedaro įtakos skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių identifikavimui, todėl remiantis PCA *E. coli* ir *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuoti 100 % tikslumu.

Apibendrinus, galima teigti, kad FT-IR ATR spektrinis metodas yra tinkamas skirtingų bakterijų rūšių identifikavimui. Siekiant tiksliai identifikuoti patogeninių bakterijų rūšį pirmiausia galima išskirti bakterijų ATR IR sugerties spektrus į gram – teigiamų ir gram – neigiamų bakterijų grupes. Baigiamojo darbo metu nustatyta, kad tam tikslui pasiekti yra tinkamesnis HCA statistinės analizės metodas, kadangi gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 93,3 % tikslumu, o gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai 88,1 % tikslumu. Taikant PCA statistinės analizės metodą gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas padidėja ir siekia 100 %, tačiau pablogėja gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas, kuris siekia 73,6 %. Siekiant identifikuoti skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrus gali būti taikomi abu statistinės analizės metodai. Taikant abu statistinės analizės metodus skirtingos gram – teigiamų bakterijų rūšys yra identifikuojamos panašiu tikslumu, kuris svyruoja nuo 42,6 % iki 100 % ir priklauso nuo tiriamos bakterijų rūšies. Skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių identifikavimui yra tinkamesnis PCA statistinės analizės metodas, kadangi taikant PCA *P. aeruginosa* ir *E. coli* bakterijų ATR IR sugerties

spektrai yra išskiriami į atskirus klasterius 100 % tikslumu. Tačiau siekiant dar tiksliau įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų patogeninių bakterijų rūšių identifikavimui gali būti taikomi abu statistinės analizės metodai, tyrimus atliekant su didesne bandinių imtimi, kuri leistų dar tiksliau įvertinti identifikavimo tikslumą ir pasirinkti tinkamiausią statistinės analizės metodą.

2.2.4. Skirtingų mielių rūšių identifikavimo tyrimas

Magistrantūros studijų baigiamojo darbo metu taip pat siekta įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų mielių rūšių identifikavimui. Suvidurkinti skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrai pateikiami 21 pav.

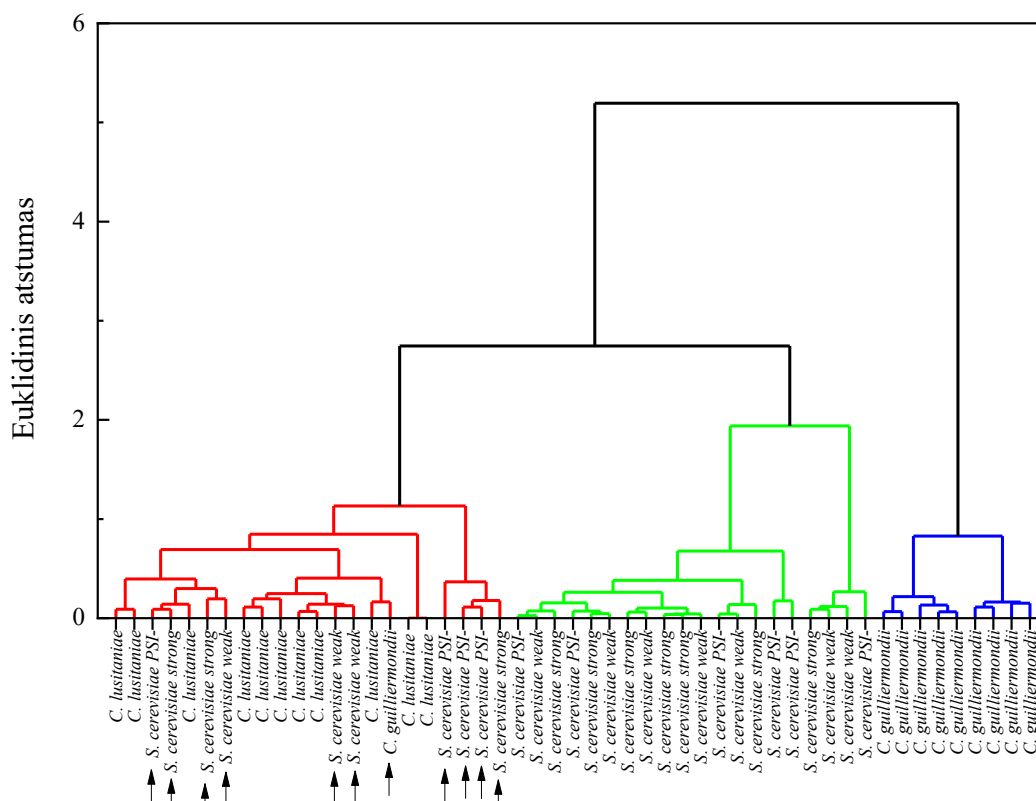


21 pav. Skirtingų rūšių mielių ATR IR sugerties spektrai

Galima pastebėti, kad skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrai yra panašūs. Yra stebimas spektrinių juostų, esančių ties 1543 cm^{-1} (baltymai (Amidas II, $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$)), 1453 cm^{-1} (alkanai, acikliniai junginiai, $\delta_z(\text{CH}_2)$), 1398 cm^{-1} (riebiosios ir amino rūgštys, $\nu_s(\text{C=O})$), 1340 cm^{-1} (baltymai (kolagenas, $\delta_w(\text{CH}_2)$)), 1312 cm^{-1} (baltymai), 1238 cm^{-1} (fosfatas I, baltymai, $\nu_a(\text{P=O})$), 1151 cm^{-1} (angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), 1074 cm^{-1} (angliavandeniai, $\nu(\text{C-O})$), 1043 cm^{-1} (angliavandeniai (gliukozė, fruktozė, glikogenas, $\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{C-O})$)), 967 cm^{-1} (angliavandeniai (deoksiribozė, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$)), intensyvumo kitimas. Taip pat skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektruose stebimas ir spektrinės juostos, esančios ties 1238 cm^{-1} , poslinkis. Visų minėtų spektrinių juostų intensyvumas bei spektrinės juostos, esančios ties 1238 cm^{-1} , poslinkis gali priklausyti nuo nehomogeninio bandinio pasiskirstymo Petri lėkštelėje ir nuo bandinio auginimo

sąlygų, todėl sunku nustatyti spektrinius žymenis, kurie leistų tiksliai identifikuoti patogeninių mielių rūšį.

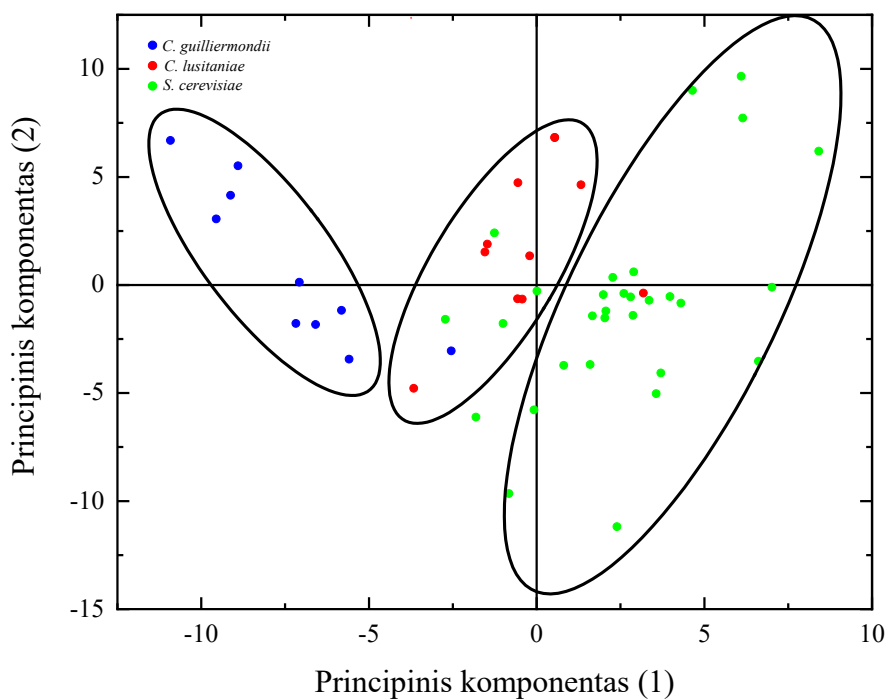
Kadangi vizualiai sunku tiksliai įvertinti spektrinius žymenis, leidžiančius identifikuoti skirtingų patogeninių mielių rūšių ATR IR sugerties spektrus, atliktos HCA ir PCA. HCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, taikant *Ward* algoritimą, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1700 cm⁻¹ iki 1600 cm⁻¹. HCA dendrograma pateikiama 22 pav.



22 pav. Skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1700 cm⁻¹ iki 1600 cm⁻¹ (neteisingai grupei priskirti ATR IR sugerties spektrai pažymėti rodyklėmis)

Skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrai yra išskiriami į tris atskirus klasterius. Kairėje dendrogramos pusėje, kuri pažymėta raudona spalva, yra sugrupuota didžioji dalis *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų. Vidurinėje dendrogramos dalyje, kuri pažymėta žalia spalva, yra sugrupuota didžioji dalis *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrų, o dešinėje dendrogramos dalyje, kuri pažymėta mėlyna spalva, didžioji dalis *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų. Neteisingoms grupėms priskirta dešimt *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrų ir vienas *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektras. Visi minėti spektrai priskirti *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų klasteriui. Todėl galima teigti, kad *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 %, *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 66,7 %, o *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai – 90 % tikslumu.

Skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, pasirenkant 1700 cm⁻¹ – 1600 cm⁻¹ spektrinį intervalą. Skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama pateikiama 23 pav.



23 pav. Skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama atlikta pasirinkus spektrinį intervalą, esantį nuo 1700 cm^{-1} iki 1600 cm^{-1}

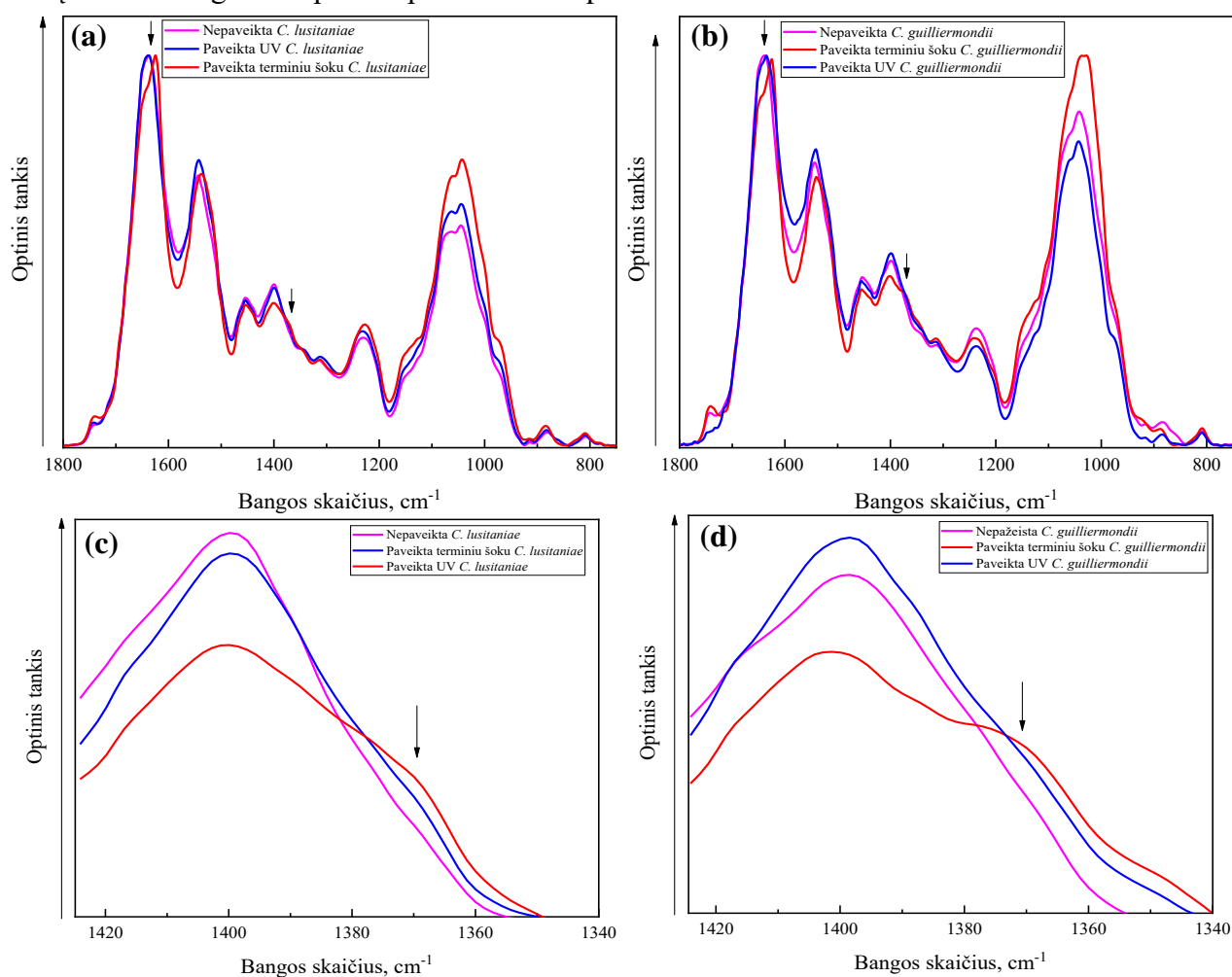
Galima pastebėti, kad skirtingų rūšių mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti suskirstyti į tris atskiras grupes. Kairėje diagramos pusėje yra sugrupuota didžioji dalis *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų, vidurinėje diagramos dalyje didžioji dalis *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų, o dešinėje diagramos pusėje didžioji dalis *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrų. Penki *S. cerevisiae* ir vienas *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai yra sugrupuojami arčiau *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų klasterio ir vienas *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektras yra sugrupuojamas arčiau *S. cerevisiae* mielių ATR IR spektrų klasterio. Netikslus skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų priskyrimas gali būti paaiškintas tuo, kad skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrai yra panašūs, o stebimas spektrinių juostų intensyvumo kitimas priklauso nuo bandinio pasiskirstymo Petri lėkštelėje ir nuo mielių auginimo sąlygų. Taigi, remiantis PCA diagrama, *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 90 %, *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 90,1 %, o *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 83,3 % tikslumu.

Apibendrinus skirtingų mielių rūšių identifikavimo tyrimą, galima teigti, kad FT-IR ATR spektrinis metodas yra tinkamas skirtingų patogeninių mielių rūšių identifikavimui. Remiantis magistrantūros studijų baigiamojo darbo metu gautais rezultatais skirtingų rūšių mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimui yra tinkamesnis PCA statistinės analizės metodas, kadangi tikslumas svyruoja nuo 83,3 % iki 90,1 %, kai tuo tarpu remiantis HCA statistinės analizės dendrograma identifikavimo tikslumas stipriai priklauso nuo tiriamos patogeninių mielių rūšies ir svyruoja nuo 66,7 % iki 100 %.

2.2.5. Mielių žūties mechanizmo tyrimas

Mokslo tiriamojo darbo metu siekta įvertinti, ar remiantis ATR IR sugerties spektrais galima identifikuoti patogeninių mikroorganizmų žūties mechanizmą, kadangi yra galimi du ląstelių žūties būdai – apoptozė (lėta, užprogramuota mirtis) ir nekrozė (greita, atsitiktinė žūtis). Tam tikslui buvo registruojami patogeninių mikroorganizmų, paveiktų ultravioletine (UV) spinduliuote ar terminiu šoku, ATR IR sugerties spektrai. Tyrimo metu buvo gauta vienuolika *C. lusitaniae* ir vienuolika *C. guilliermondii* rūšių mielių, paveiktų UV spinduliuote, bandinių bei vienuolika *C. lusitaniae* ir devyni *C. guilliermondii* rūšių mielių, paveiktų terminiu šoku, bandiniai. UV spinduliuote paveiktų mikroorganizmų bandiniai laikyti 10 minučių juos apšviečiant intensyvia 320 nm bangos ilgio spinduliuote. Siekiant sukelti terminį šoką mikroorganizmai laikyti 14 val. 55 °C temperatūroje (tyrimui paruošti bandiniai gauti iš JGMC). Paveikus mikroorganizmą UV spinduliuote yra pažeidžiama ląstelių DNR, įvyksta mutacijos ir mikroorganizmus ištinka greita žūtis, o paveikus mikroorganizmą terminiu šoku taip pat yra paveikiama mikroorganizmų ląstelių DNR, tačiau šiuo atveju ląstelių žuvimo procesas – lėtas.

Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai pateikiami 24 pav.



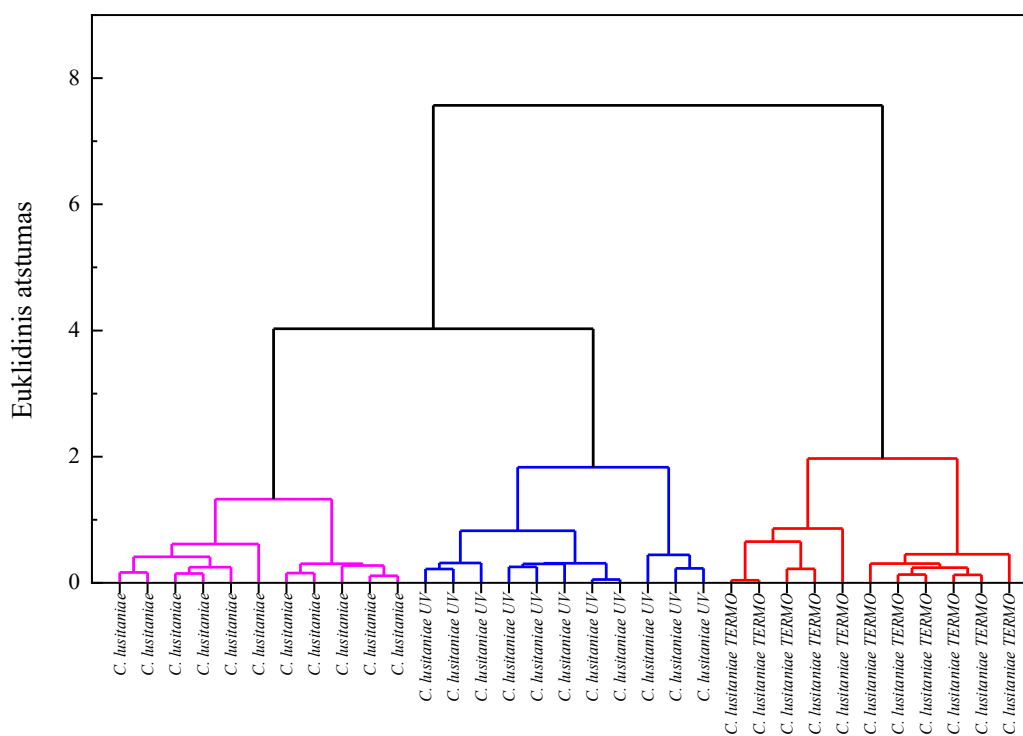
24 pav. Nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku (a) *C. lusitaniae* ir (b) *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai 1800 cm⁻¹ – 750 cm⁻¹ spektrinėje srityje ir (c), (d) 1423 cm⁻¹ – 1356 cm⁻¹ spektrinėje srityje

Galima pastebėti, kad terminiu šoku paveiktų *C. guilliermondii* ir *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektruose yra stebimas spektrinės juostos, esančios ties 1370 cm^{-1} , atsiradimas. Ši spektrinė juosta yra stebima kaip spektrinės juostos, esančios ties 1398 cm^{-1} , petys. Spektrinė juosta, esanti ties 1370 cm^{-1} , yra priskiriama nukleobazių, guanino arba citozino, $\nu(\text{C-N})$ virpesiui. Šios spektrinės juostos intensyvumo padidėjimas gali būti siejamas su padidėjusiu nukleobazių kiekiu mielėse. Einant laikui mielėms pradeda trūkti maistinių medžiagų bei energijos, o nukleobazės veikia kaip energijos šaltinis. Mielės taip pat gali naudoti puriną (šiuo atveju guaniną) kaip azoto šaltinį, kuris yra reikalingas aminorūgštims sudaryti [42-43]. Ankstesnių tyrimų metu pastebėta, kad registruojant *C. guilliermondii* ir *C. lusitaniae* mielių bandinių ATR IR sugerties spektrus, praėjus skirtingam laiko tarpui nuo mikroorganizmų užauginimo, taip pat yra stebimas minėtos spektrinės juostos intensyvumo padidėjimas (spektrai pateikiami 2 priedo 1 pav.) [44], todėl ši spektrinė juosta gali būti siejama su mielių žūtimi.

Terminiu šoku paveiktų *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektruose taip pat stebimas spektrinės juostos poslinkis iš 1637 cm^{-1} į 1625 cm^{-1} , kuri priskiriama baltymų Amidas I grupės $\nu(\text{C=O})$ ir $\delta(\text{C-N})$ virpesiams. Baltymų Amidas I grupei priskiriama spektrinė juosta yra sudaryta iš atskirų tarpusavyje persiklojančių spektrinių juostų, o jos padėtis ir kontūras teikia informaciją apie antrinę baltymo struktūrą (α spirales, β klostes ir kitas atsitiktines struktūras). Spektriniai skirtumai, spektriniame intervale, esančiame nuo 1640 cm^{-1} iki 1615 cm^{-1} , yra susiję su struktūriniais pokyčiais β klostėse. Struktūriniai pokyčiai paveikus mieles terminiu šoku gali būti stebimi dėl baltymų agregacijos, kadangi yra žinoma, kad agregavus baltymams Amidas I spektrinė juosta pasislenka į mažesnių bangos skaičių pusę ir yra stebima spektrinėje srityje, esančioje nuo 1625 cm^{-1} iki 1620 cm^{-1} [45-46].

Palyginus nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* ir *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrus, sunku vizualiai nustatyti spektrinius požymius, kurie leistų identifikuoti žūties mechanizmą. Yra stebimas tik nežymus spektrinių juostų intensyvumo kitimas, kuris, remiantis ankstesniais magistro studijų I kurso pavasario semestro mokslo tiriamojo darbo metu gautais rezultatais, gali priklausyti nuo mielių auginimo sąlygų, kurias kiekvieną kartą sunku išlaikyti identiškais bei gali priklausyti nuo maistinės terpės, kurioje auginami bandiniai, nevienalytiškumo.

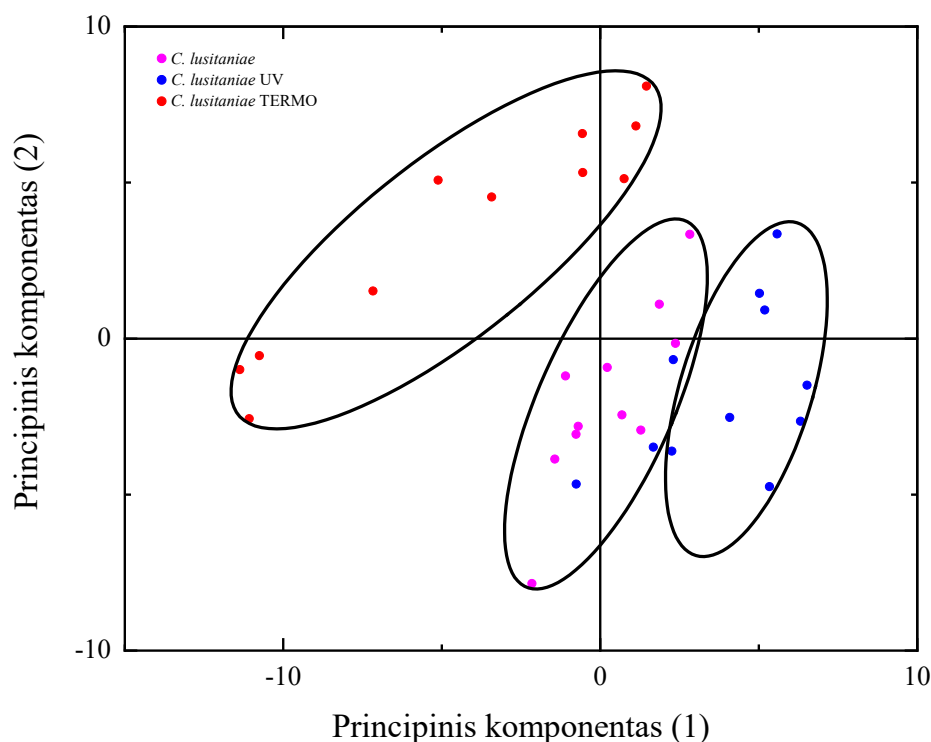
Siekiant įvertinti, ar pritaikius statistinius analizės metodus, galima iš ATR IR sugerties spektrų identifikuoti mikroorganizmų žūties mechanizmą, atliktos HCA ir PCA. *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų HCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, taikant Ward algoritimą, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1724 cm^{-1} iki 1535 cm^{-1} , kuriame yra stebima baltymams (1637 cm^{-1}) priskiriama spektrinė juosta. HCA dendrograma pateikiama 25 pav.



25 pav. Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma (pavadinimuose trumpinys TERMO atitinka terminiu šoku paveiktus bandinius, o UV – UV spinduliuote paveiktus bandinius).

Galima pastebėti, kad nepaveiktų bei paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai yra sugrupuojami į tris atskirus klasterius 100 % tikslumu. Kairėje dendrogramos pusėje sugrupuojami nepaveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai, vidurinėje dendrogramos dalyje – UV spinduliuote paveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai. Šie du klasteriai toliau apjungiami į vieną didesnę klasterį, kadangi spektriniai skirtumai tarp minėtų ATR IR sugerties spektrų yra nežymūs. Terminiu šoku paveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai yra išskiriami į atskirą klasterį dendrogramos dešinėje pusėje, kadangi analizei pasirinktoje spektrinėje srityje, šiems spektrams būdingas baltymams priskiriamos spektrinės juostos, esančios ties 1637 cm^{-1} , poslinkis.

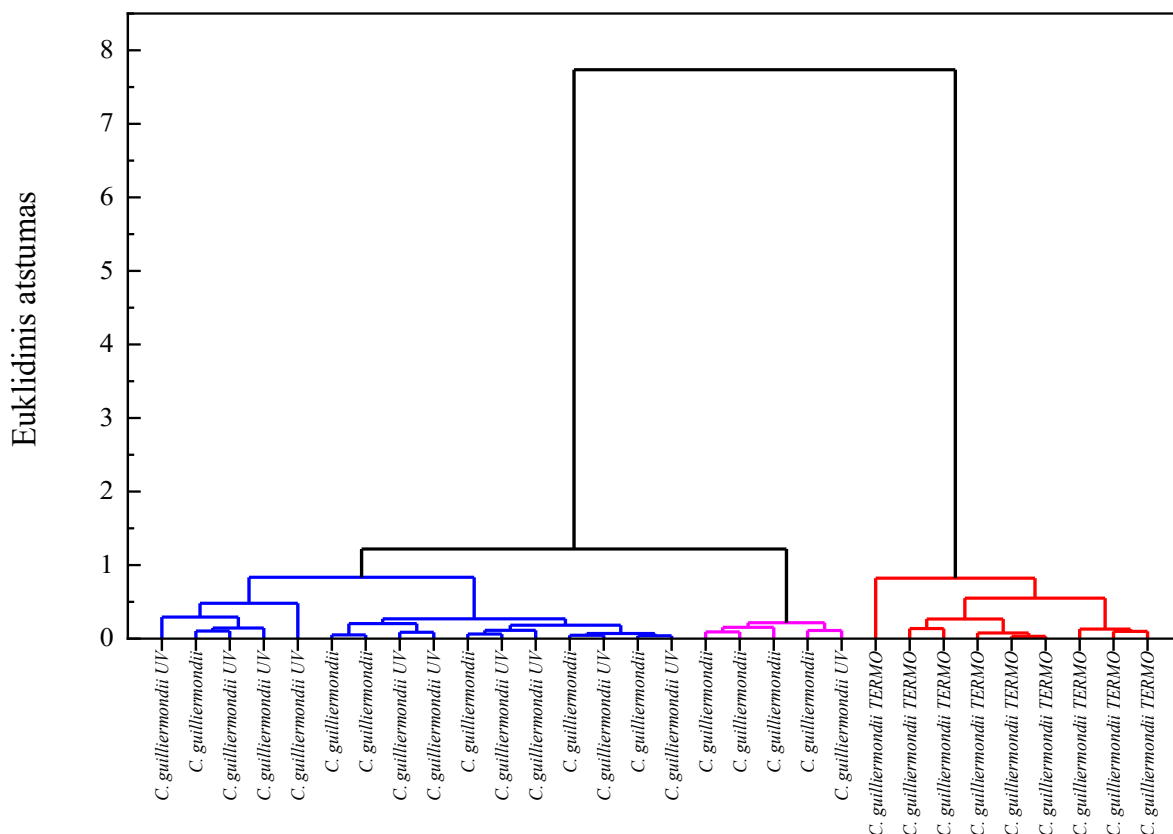
Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų PCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, pasirenkant 1700 cm^{-1} – 1600 cm^{-1} spektrinį intervalą. PCA diagrama pateikiama 26 pav.



26 pav. Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama

Paveiktų terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai yra gerai išskiriami į atskirą klasterį, todėl, remiantis PCA diagrama, terminiu šoku paveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu. Tačiau nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų grupės yra šiek tiek persiklojusios, todėl nepaveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 %, o paveiktų UV spinduliuote *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai 72,7 % tikslumu.

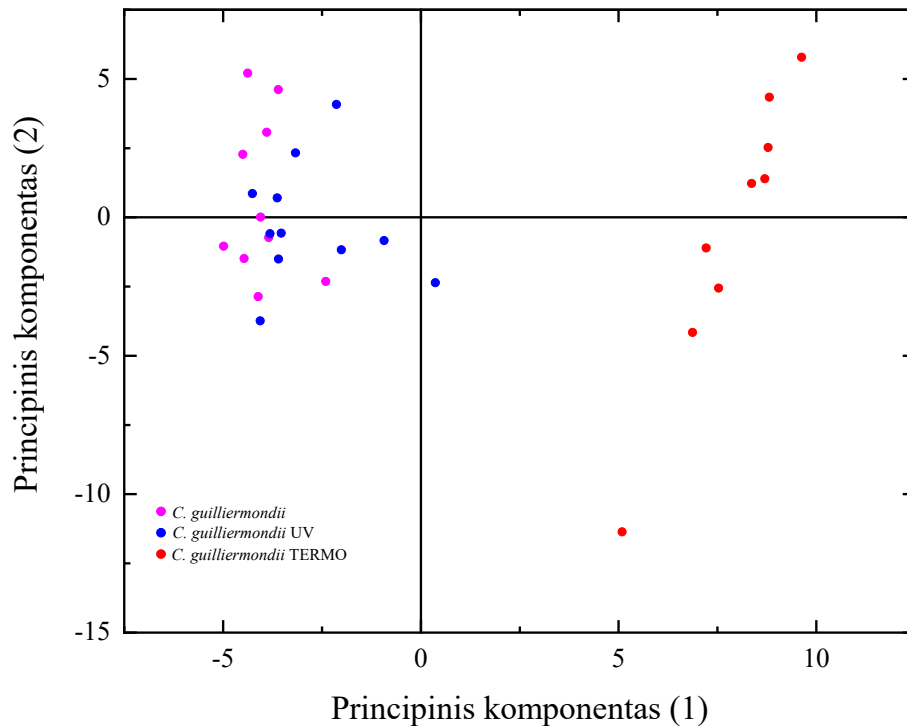
Siekiant nustatyti kaip tiksliai gali būti identifikuojamas *C. guilliermondii* mielių žūties mechanizmas taip pat atliktos nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų HCA ir PCA. HCA atlikta taikant Ward algoritimą, pasirenkant 1690 cm^{-1} – 1611 cm^{-1} spektrinį intervalą. HCA dendrograma pateikiama 27 pav.



27 pav. Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma (pavadinimuose trumpinys TERMO atitinka terminiu šoku paveiktus bandinius, o UV – UV spinduliuote paveiktus bandinius).

Galima pastebėti, kad terminiu šoku paveiktų *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai yra sugrupuojami dešinėje dendrogramos pusėje, kuri pažymėta raudona spalva. Kairėje dendrogramos pusėje yra sugrupuojami nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai. Nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai HCA dendrogramoje nėra gerai išskiriami į du atskirus klasterius, todėl remiantis HCA dendrograma sunku identifikuoti nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrus, tačiau paveiktų terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu.

Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių PCA atlikta pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1700 cm^{-1} iki 1600 cm^{-1} . PCA diagrama pateikiama 28 pav.



28 pav. Nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama

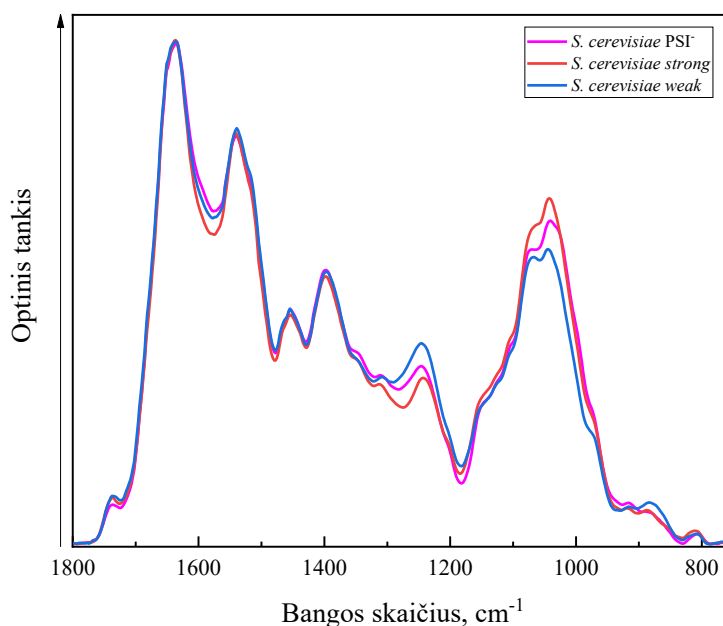
Terminiu šoku paveiktų *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai, kaip ir HCA atveju, yra gerai išskiriama į atskirą klasterį, todėl terminiu šoku paveiktos *C. guilliermondii* mielės, remiantis ATR IR sugerties spektrais, gali būti identifikuojamos 100 % tikslumu. Nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų klasteriai persikloja, todėl remiantis PCA diagrama sunku tiksliai įvertinti nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumą.

Apibendrinus mielių žūties mechanizmo tyrimą, galima teigti, kad FT-IR ATR spektrinis metodas yra tinkamas siekiant identifikuoti terminiu šoku paveiktas mieles iš ATR IR sugerties spektrų. Tiek *C. guilliermondii*, tiek *C. lusitaniae* mielės, kurios paveiktos terminiu šoku, gali būti identifikuojamos 100 % tikslumu, taikant HCA ir PCA statistinės analizės metodus. Nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu tik taikant HCA statistinės analizės metodą. Remiantis PCA diagrama, paveiktų UV spinduliuote *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai yra sugrupuojami arčiau nepaveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų klasterio, todėl UV spinduliuote paveiktų *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas sumažėja iki 72,7 %. FT-IR ATR spektrinis metodas nėra tinkamas siekiant identifikuoti nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrus, kadangi HCA dendrogramoje ir PCA diagramoje spektrų klasteriai persikloja. Spektrų klasterių persiklojimas gali būti stebimas dėl to, kad nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai yra panašūs, stebimas

tik spektrinių juostų intensyvumo kitimas, kuris gali priklausyti nuo mielių savybių skirtingai reaguoti į UV spinduliuotės poveikį. Taip pat gali būti susijęs su nehomogeniniu bandinio pasiskirstymu Petri lėkštelėje bei priklausyti nuo mielių auginimo sąlygų.

2.2.6. Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių identifikavimo tyrimas

Magistrantūros studijų baigiamojo darbo metu tirti skirtingi *S. cerevisiae* mielių porūšiai (*S. cerevisiae* PSI, *S. cerevisiae weak*, *S. cerevisiae strong*). Pagrindinis skirtumas tarp skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių yra ląstelėse egzistuojantys epigenetiniai elementai – prionai. Mielių prionai yra baltymų pagrindu sukurti genetiniai elementai, kurie dėl savaiminių baltymų struktūros pokyčių lemia skirtingus fenotipus. Prionui [PSI] yra galimi variantai, kurių fenotipas yra stiprus (*S. cerevisiae strong*) arba silpnas (*S. cerevisiae weak*), o *S. cerevisiae* PSI priono neturi [47]. Tyrimų metu gauti dešimt *S. cerevisiae* PSI, dešimt *S. cerevisiae weak* ir dešimt *S. cerevisiae strong* mielių bandiniai. Suvidurkinti skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai yra pateikiami 29 pav.

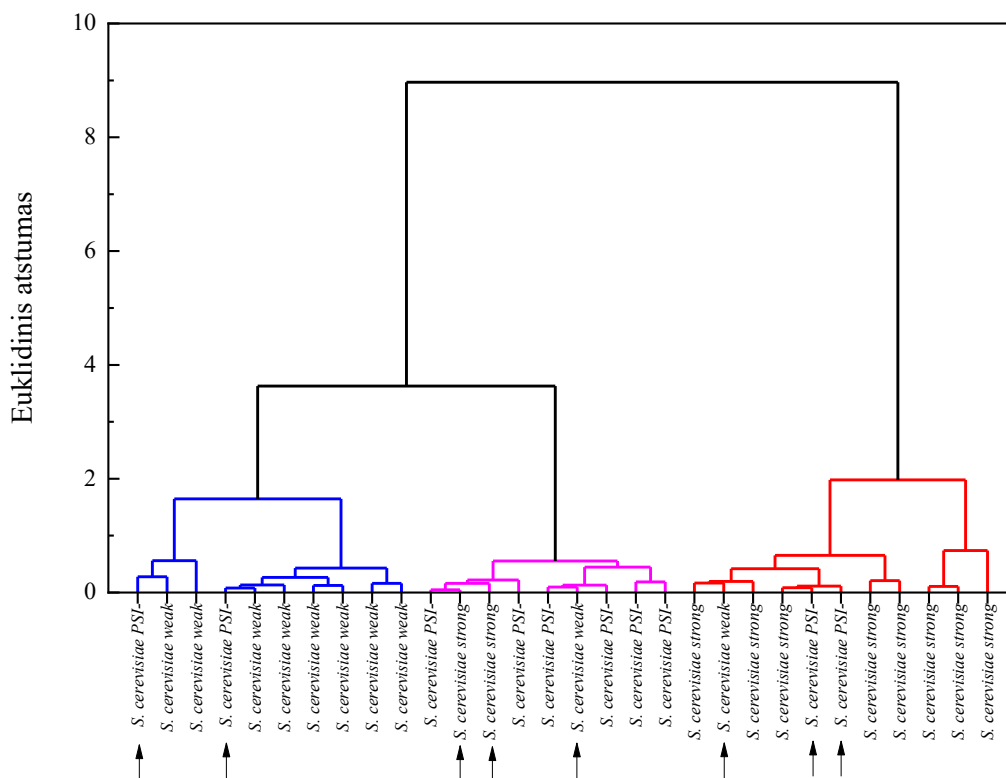


29 pav. Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai

Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai yra panašūs ir stebimi tik nežymūs spektrinių juostų intensyvumo pokyčiai, bei spektrinės juostos, esančios ties 1238 cm⁻¹ (fosfatas I, baltymai), poslinkis. Intensyvumo pokyčiai spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm⁻¹ iki 930 cm⁻¹, bei spektrinės juostos, esančios ties 1238 cm⁻¹, poslinkis gali priklausyti nuo mielių auginimo sąlygų, kurias sunku išlaikyti identiškas, bei nuo mitybinės terpės, esančios Petri lėkštelėje. Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektruose taip pat stebimas spektrinių juostų, esančių ties 1312 cm⁻¹ (baltymai), 1340 cm⁻¹ (baltymai (kolagenas)), 1398 cm⁻¹ (riebiosios ir

amino rūgštys), 1453 cm⁻¹ (alkanai, acikliniai junginiai), intensyvumo kitimas. Šis spektrinių juostų intensyvumo kitimas nėra reikšminis ir gali būti stebimas dėl jau įvardintų priežasčių.

Kadangi vizualiai nebuvo stebimi reikšmingi spektriniai žymenys, kurie leistų identifikuoti skirtingus *S. cerevisiae* mielių porūšius, atliktos HCA ir PCA. HCA atlikta naudojant programinį paketą „Origin“, taikant *Ward* algoritimą, pasirenkant spektrinį intervalą, esantį nuo 1021 cm⁻¹ iki 940 cm⁻¹. HCA dendrograma pateikiama 30 pav.

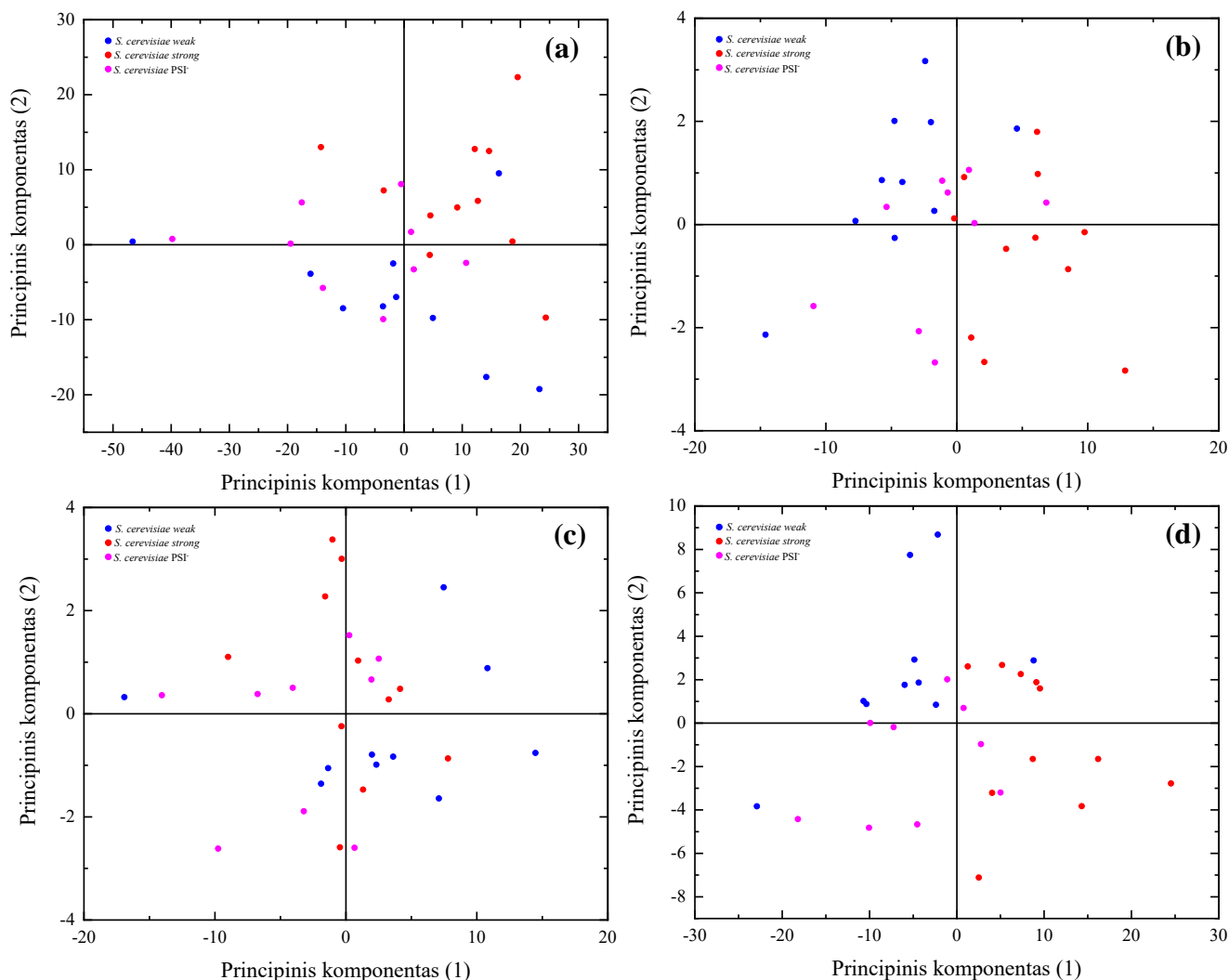


30 pav. Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrų HCA dendrograma (neteisingai grupei priskirti ATR IR sugerties spektrai pažymėti rodyklėmis)

Galima pastebėti, kad skirtingi *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai yra suklasifikuojami į tris atskiras grupes. Kairėje dendrogramos pusėje yra sugrupuota didžioji dalis *S. cerevisiae weak* mielių ATR IR sugerties spektrų, vidurinėje dendrogramos dalyje didžioji dalis *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrų, o dešinėje dendrogramos dalyje didžioji dalis *S. cerevisiae strong* mielių ATR IR sugerties spektrų. Neteisingai priskirti aštuoni ATR IR sugerties spektrai, t.y. *S. cerevisiae weak* mielių ATR IR sugerties spektrų grupei priskirti du *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrai, *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrų grupei priskirti vienas *S. cerevisiae weak* ir du *S. cerevisiae strong* mielių ATR IR sugerties spektrai, *S. cerevisiae strong* mielių ATR IR sugerties spektrų grupei priskirtas vienas *S. cerevisiae weak* ir du *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrai. Du *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrai galėjo būti priskirti *S. cerevisiae weak* mielių ATR IR sugerties spektrų grupei dėl to, jog mielės, neturinčios priono, gali mažai skirtis nuo mielių su silpnai išreikštu prionu. Dėl šios priežasties vienas *S. cerevisiae weak* mielių spektras priskirtas *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrų

grupei. Kad *S. cerevisiae weak* ir *S. cerevisiae* PSI mielių porūšiai yra panašūs, rodo ir tai, kad *S. cerevisiae* PSI ir *S. cerevisiae weak* mielių ATR IR sugerties spektrų grupių klasteriai yra apjungiami į vieną didesnę klasterį. Teisingoms grupėms iš viso priskirti dvidešimt du ATR IR sugerties spektrai, o metodo tikslumas siekia 73,3 %. *S. cerevisiae weak* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 80 %, *S. cerevisiae* PSI mielių ATR IR sugerties spektrai – 60 %, o *S. cerevisiae strong* mielių ATR IR sugerties spektrai – 80 % tikslumu.

Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagramos, kurios atliktos skirtinguose spektriniuose intervaluose, pateikiamos 31 pav.



31 pav. Skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrų PCA diagramos, atliktos pasirenkant (a) $1800\text{ cm}^{-1} - 750\text{ cm}^{-1}$, (b) $1021\text{ cm}^{-1} - 940\text{ cm}^{-1}$, (c) $1281\text{ cm}^{-1} - 1184\text{ cm}^{-1}$, (d) $1183\text{ cm}^{-1} - 930\text{ cm}^{-1}$ spektrinius intervalus

Galima pastebėti, kad nepriklausomai nuo pasirinkto spektrinio intervalo, PCA diagramose skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrams būdinga didelė dispersija, spektrai nėra sugrupuojami į atskirus klasterius. Visų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai persikloja, todėl remiantis PCA diagrama sunku identifikuoti skirtingus *S. cerevisiae* mielių porūšius.

Remiantis atliktu tyrimu, galima teigti, kad siekiant identifikuoti skirtingus *S. cerevisiae* mielių porūšius tinkamesnis yra HCA statistinės analizės metodas, kadangi priklausomai nuo porūšio *S. cerevisiae* mielės gali būti identifikuojamos 60 % – 80 % tikslumu. Taikant PCA statistinės analizės metodą sunku identifikuoti skirtingus *S. cerevisiae* mielių porūšius, nes skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai persikloja. Netiksliai *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai gali būti priskiriami dėl to, jog skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai yra gana panašūs ir stebimas tik nežymus spektrinių juostų intensyvumo kitimas. Nežymus spektrinių juostų intensyvumo kitimas leidžia daryti išvadą, kad mikroorganizmai yra labai panašūs, o kadangi iš atliktų tyrimų yra žinoma, kad spektrinių juostų intensyvumo kitimas gali priklausyti nuo maitinamosios terpės, esančios Petri lėkštelėje, ir nuo bandinio auginimo sąlygų, negalima tiksliai įvertinti spektrinių požymių būdingų skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugertiems spektrams. Siekiant tiksliau įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių identifikavimui yra svarbu atlikti tyrimus su didesne bandinių imtimi.

2.3. Tyrimo rezultatų apibendrinimas

Apibendrinus magistrantūros studijų baigiamojo darbo rezultatus galima teigti, kad FT-IR ATR sugerties spektrinis metodas yra tinkamas patogeninių mielių ir bakterijų identifikavimui. Atlikus bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų atsikartojamumo tyrimą pastebėta, kad mielių ATR IR sugerties spektrai atsikartoja geriau nei bakterijų ATR IR sugerties spektrai. Spektuose stebimi spektrinių juostų intensyvumo, padėties bei kontūro pokyčiai daugiausia gali būti siejami su patogeninių mikroorganizmų auginimo sąlygų kitimu, kadangi jas sunku kiekvieną kartą išlaikyti identiškais. Taip pat gali būti siejami su nehomogeniniu bandinio pasiskirstymu Petri lėkštelėje.

Pagrindiniai spektriniai skirtumai tarp mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrų yra stebimi spektrinėje srityje, esančioje nuo 1183 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , kuri susijusi su bakterijų ir mielių ląstelių sienelėse esančiais angliavandeniais.

Siekiant įvertinti, kaip tiksliai gali būti identifikuojami patogeninių mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrai, atliktos HCA ir PCA. Nustatyta, kad atlikus HCA spektriniame intervale, esančiame nuo 1800 cm^{-1} iki 750 cm^{-1} , bakterijų ATR IR sugerties spektrai identifikuojami 89,9 %, o mielių ATR IR sugerties spektrai – 100 % tikslumu. Atlikus PCA spektriniame intervale, esančiame nuo 1345 cm^{-1} iki 930 cm^{-1} , bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra identifikuojami 91,2 %, o mielių ATR IR sugerties spektrai - 100 % tikslumu. Bakterijų ATR IR sugerties spektrai identifikuojami mažesniu tikslumu, nei mielių ATR IR sugerties spektrai, kadangi *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR

IR sugerties spektrai yra priskiriami mielių ATR IR sugerties spektrų klasteriui. Taikant abu statistinės analizės metodus mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra identifikuojami panašiu tikslumu, todėl siekiant identifikuoti patogeninių mikroorganizmų rūšį gali būti taikoma tiek HCA, tiek PCA.

Baigiamojo darbo metu taip pat atliktas skirtingų bakterijų ir mielių rūšių identifikavimo tyrimas. Atliekant skirtingų bakterijų rūšių identifikavimo tyrimą pirmiausia atliktos HCA ir PCA siekiant nustatyti kaip tiksliai gali būti identifikuojamos gram – teigiamų ir gram – neigiamų bakterijų rūšys. Atlikus HCA nustatyta, kad gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 93,3 %, o gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 88,1 % tikslumu. Taikant PCA statistinės analizės metodą nustatyta, kad gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 %, o gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 73,6 % tikslumu. Kadangi abiem atvejais gram – teigiamų ir gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumo pokyčiai nėra žymūs svarbu atlikti tyrimą su didesne bandinių imtimi taikant abu statistinės analizės metodus.

Įvertinus gram – teigiamų ir gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumą siekta nustatyti kaip tiksliai gali būti identifikuojamos skirtingos bakterijų rūšys. Atlikus skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA nustatyta, kad *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 85,7 % tikslumu, *Sarcina* sp. ir *S. aureus* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 71,4 % tikslumu, o *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 42,9 % tikslumu. Remiantis PCA diagrama *Arthrobacter* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 %, *Bacillus* sp., *Sarcina* sp. ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 85,7 %, *Streptomyces* sp. bakterijų ATR IR sugerties spektrai - 71,4 %, *S. aureus* ATR IR sugerties spektrai – 42,9 % tikslumu. Taikant abu statistinės analizės metodus skirtingų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas panašus, todėl svarbu atliekant tolimesnius tyrimus, su didesne bandinių imtimi, taikyti abu statistinės analizės metodus.

HCA ir PCA statistinės analizės metodai taip pat pritaikyti ir siekiant nustatyti kaip tiksliai gali būti identifikuojami skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrai. Taikant HCA statistinės analizės metodą, sunku tiksliai identifikuoti skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrus, tačiau taikant PCA statistinės analizės metodą *E. coli* ir *P. aeruginosa* bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuoti 100 % tikslumu. Todėl remiantis atliktais tyrimais, galima teigti, siekiant identifikuoti skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrus yra tinkamesnis PCA statistinės analizės metodas.

Palyginus skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrus nustatyta, kad vizualiai įvertinti spektrinius žymenis sunku, o stebimas spektrinių juostų intensyvumo pokytis gali būti susijęs su

mielių auginimo sąlygomis bei priklausyti nuo nehomogeninio bandinių pasiskirstymo Petri lėkštelėje. Atlikus HCA nustatyta, kad *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 %, *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 66,7 % , o *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai – 90 % tikslumu. Taikant PCA statistinės analizės metodą *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 90 %, *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 90,1 %, o *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 83,3 % tikslumu. Remiantis gautais rezultatais PCA statistinės analizės metodas yra tinkamesnis skirtingų mielių rūšių identifikavimui.

Magistrantūros studijų baigiamojo darbo metu registruoti mielių, kurios paveiktos UV spinduliuote ar terminiu šoku, ATR IR sugerties spektrai, siekiant nustatyti spektrinius požymius, leidžiančius identifikuoti mikroorganizmo žūties mechanizmą. Palyginus nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrus, nustatyta, kad *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių, kurios paveiktos terminiu šoku, ATR IR sugerties spektruose yra stebimas baltymams priskiriamos spektrinės juostos, esančios ties 1637 cm^{-1} , poslinkis į 1625 cm^{-1} . Taip pat yra stebimas spektrinės juostos, esančios ties 1370 cm^{-1} , kuri priskiriama nukleobazėms, intensyvumo padidėjimas. Vizualiai nėra stebimi žymūs spektriniai skirtumai tarp nepaveiktų ir UV spinduliuote paveiktų *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų, todėl, siekiant įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą žūties mechanizmo identifikavimui, atliktos HCA ir PCA. Atlikus HCA nustatyta, kad nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu, paveiktų terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai – 100 % tikslumu, o nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumo įvertinti nepavyko dėl persiklojančių klasterių. Atlikus PCA nustatyta, kad nepaveiktų ir paveiktų terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu, o paveiktų UV spinduliuote *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 72,7 % tikslumu. Remiantis nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų PCA diagrama, paveiktų terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu, o nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų, kaip ir taikant HCA statistinės analizės metodą, identifikuoti nepavyko. Apibendrinus galima teigti, kad siekiant nustatyti *C. lusitaniae* mielių žūties mechanizmą HCA statistinės analizės metodas yra tikslesnis, tačiau atliekant tyrimus su didesne bandinių imtimi gali būti ir toliau taikomi abu statistinės analizės metodai siekiant patikslinti identifikavimo tikslumą. Pritaikius abu statistinės analizės metodus nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrams nustatyta, kad 100 % tikslumu galima identifikuoti tik terminiu šoku paveiktų

C. guilliermondii mielių ATR IR sugerties spektrus. Nepaveiktų ir paveiktų UV spinduliuote *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumą įvertinti sunku, kadangi stebimas šių ATR IR sugerties spektrų klasterių persiklojimas. Siekiant įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą *C. guilliermondii* mielių žūties mechanizmo identifikavimui yra svarbu ir toliau taikyti abu statistinės analizės metodus, tyrimus atliekant su didesne bandinių imtimi.

Baigiamojo darbo metu siekta išsiaiškinti ar FT-IR ATR spektrinis metodas yra tinkamas skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių identifikavimui. Vizualiai nebuvo stebimi žymūs spektriniai skirtumai tarp skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrų, todėl atliktos HCA ir PCA. Atlikus HCA nustatyta, kad *S. cerevisiae weak* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 80 %, *S. cerevisiae PSI* mielių ATR IR sugerties spektrai – 60 %, o *S. cerevisiae strong* mielių ATR IR sugerties spektrai – 80 % tikslumu. Taikant PCA statistinės analizės metodą nepavyko identifikuoti skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrų.

Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Atlikus 150 patogeninių mikroorganizmų bandinių ATR IR sugerties spektrų analizę nustatyta, kad vizualinės analizės, siekiant identifikuoti mikroorganizmo tipą, nepakanka, todėl būtina atlikti statistinę analizę.
2. Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą gali būti identifikuoti skirtingi patogeninių mikroorganizmų tipai. Identifikavimo tikslumas priklauso nuo pasirinkto statistinės analizės metodo ir siekia nuo 89,9 % iki 100 %.
3. Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą gali būti identifikuotos skirtingos bakterijų rūšys. Identifikavimo tikslumas priklauso nuo tiriamos bakterijų rūšies bei nuo pasirinkto statistinės analizės metodo ir kai kurioms bakterijoms gali siekti 100 %.
4. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad taikant FT-IR ATR spektrinį metodą gali būti identifikuotos skirtingos mielių rūšys. Identifikavimo tikslumas priklauso nuo pasirinkto statistinės analizės metodo bei nuo tiriamos mielių rūšies ir siekia nuo 66,7 % iki 100 %.
5. Atlikus nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų statistinę analizę nustatyta, kad nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų identifikavimo tikslumas gali siekti 100 %, o *C. guilliermondii* mielių atveju 100 % tikslumu gali būti identifikuojami tik terminiu šoku paveiktų mielių ATR IR sugerties spektrai.
6. Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą skirtingus *S. cerevisiae* mielių porūšius galima identifikuoti atliekant tik hierarchinę klasterių analizę. Metodo tikslumas gali siekti nuo 60 % iki 80 %.

PADĖKA

Už tyrimui paruoštus bandinius ir bendradarbiavimą dėkojame Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir Biotechnologijos katedros (VU JGMC) docentei Eglei Lastauskienei ir jos vadovaujamai tyrėjų grupei.

LITERATŪROS ŠALTINIŲ SĄRAŠAS

- [1] 2016 metų mirčių nuo infekcinių ligų statistika, prieiga per internetą: <<https://www.bcm.edu/departments/molecular-virology-and-microbiology/emerging-infections-and-biodefense/introduction-to-infectious-diseases>> [žiūrėta 2020-06-18]
- [2] M. Piękowski, *Pathogenic and Non-Pathogenic Microorganisms in the Rapid Alert System for Food and Feed*, International journal of environmental research and public health 16, 477 (2019)
- [3] M. Harz, P. Rösch, J. Popp, *Vibrational Spectroscopy – A Powerful Tool for the Rapid Identification of Microbial Cells at the Single Cell Level*, Cytometry 75A, 104-113 (2009)
- [4] D. R. Soll, Mixed Mycotic Infections, in: *Polymicrobial Diseases*, eds. K. A. Brogden, J. M. Guthmiller, Chapter 17 (Washington (DC), ASM Press, 2002)
- [5] B. Buszewski, A. Rogowska, P. Pomastowski, M. Złoch, V. Railean-Plugaru, *Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques*, Journal of AOAC International 100, 1607-1623 (2017)
- [6] Tim Sandle, 9 - Microbial identification, in: *Pharmaceutical Microbiology* ed. Tim Sandle (Sawston, Woodhead Publishing, 2016) pp. 103 – 113
- [7] V. Erukhimovitch, V. Pavlov, M. Talyshinsky, Y. Souprun, M. Huleihel, *FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 1105–1108 (2005)
- [8] V. Erukhimovitch, M. Huleihel, M. Huleihel, *Identification of Contaminated Cells with Viruses, Bacteria, or Fungi by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy*, Journal of Spectroscopy 2013, 1-6 (2013)
- [9] K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stammler, H. P. Endtz, H. A. Bruining, D. Naumann, G. J. Puppels, *Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures*, Journal of Clinical Microbiology 41, 324–329 (2003)
- [10] V. Šablinskas, J. Čeponkus, *Modernioji molekulių virpesinė spektrometrija*, Vilnius (2014)
- [11] G. Ramer, B. Lendl, Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, eds. R.A. Meyers, R.A. Meyers (Hoboken, John Wiley & Sons, 2013)
- [12] Įvadas į pažeisto vidaus atspindžio spektroskopijos metodą, prieiga per internetą: <<https://nicoletcz.cz/app/uploads/2019/03/Introduction-ATR-SpectraTech.pdf>> [žiūrėta 2021-01-25]
- [13] B. E. de Pauw, *What are fungal infections?*, Mediterranean journal of hematology and infectious diseases 3, e2011001 (2011)

- [14] A. Cassini, L. Diaz Högberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G. S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M. E. Kretzschmar, B. Devleeschauwer, M. Cecchini, D. Ait Ouakrim, T. Cravo Oliveira, M. J. Struelens, C. Suetens, D. L. Monnet, the Burden of AMR Collaborative Group, *Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis*, *The Lancet Infectious Diseases* 19, 56-66 (2019)
- [15] Naujų grybelių rūšių plitimas Europoje, prieiga per internetą: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/emerging-spread-new-fungal-species-poses-risk-healthcare-settings-eueea>> [žiūrėta 2020-05-14]
- [16] Grybelio sandara, prieiga per internetą: <<https://sciencefivekingdoms.weebly.com/fungi.html>> [žiūrėta 2020-02-27]
- [17] R. Garcia-Rubio, H. C. de Oliveira, J. Rivera, N. Trevijano-Contador, *The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species*, *Frontiers in Microbiology* 10, 2993 (2020)
- [18] J. Ruiz-Herrera, L. Ortiz-Castellanos, *Cell wall glucans of fungi. A review*, *The Cell Surface* 5, 100022 (2019)
- [19] A. Dani, *Colonization and infection*, *Central European journal of urology* 67, 86–87 (2014)
- [20] Kandidozė, prieiga per internetą <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>> [žiūrėta 2020-04-28]
- [21] S. Wawrysiuk, T. Rechberger, K. Futyma, P. Miotła, *Candida lusitanae – a case report of an intraperitoneal infection*, *Przegląd menopauzalny* 17, 94–96 (2018)
- [22] C. Girmenia, G. Pizzarelli, F. Cristini, F. Barchiesi, E. Spreghini, G. Scalise, P. Martino, *Candida guilliermondii Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies*, *Journal of clinical microbiology* 44, 2458-2464 (2006)
- [23] M. Al-mohanna, *Bacterial introduction* (2016)
- [24] N. Allocati, M. Masulli, M. F. Alexeyev, C. Di Ilio, *Escherichia coli in Europe: An Overview*, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 6235-6254 (2013)
- [25] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, V. G. Fowler Jr, *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*, *Clinical Microbiology Reviews* 28, 603-661 (2015)
- [26] Bakterijos sandara, prieiga per internetą: <https://lt.wikipedia.org/wiki/Bakterijos_sandara> [žiūrėta 2020-02-17]
- [27] W. Krüger, S. Vielreicher, M. Kapitan, I. D. Jacobsen, M. J. Niemiec, *Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease*, *Pathogens* 8, 70 (2019)

- [28] Chemometrinė analizė spektroskopijoje, prieiga per internetą: <<https://www.yumpu.com/en/document/view/7708399/chemometric-analysis-for-spectroscopy-camo-software>> [žiūrėta 2021-01-25]
- [29] H. Abdi, *Partial Least Squares (PLS) Regression*, Encyclopedia of Social Sciences Research Methods, Thousand Oaks (2003)
- [30] G. Dzemyda, O. Kurasova, J. Žilinskas, *Daugiamatčių duomenų vizualizavimo metodai*, Vilnius (2008)
- [31] A. Tharwat, *Principal component analysis – a tutorial*, International Journal of Applied Pattern Recognition 3, 197-240 (2016)
- [32] Kovariacija ir principinė komponentų analizė, prieiga per internetą: <https://www.ocean.washington.edu/courses/ess522/lectures/14_covarianceandPCA.pdf> [žiūrėta 2021-05-03]
- [33] I. T. Jolliffe, J. Cadima, *Principal component analysis: a review and recent developments*, Philosophical Transactions of The Royal Society A 374, 1-16 (2016)
- [34] A. Salmana, E. Shufana, U. Sharahab, I. Lapidot, S. Mordechaid, M. Huleihelb, *Distinction between mixed genus bacteria using infrared spectroscopy and multivariate analysis*, Vibrational Spectroscopy 100, 6-13 (2019)
- [35] A. Salman, I. Lapidot, A. Pomerantz, L. Tsrer, E. Shufan, R. Moreh, S. Mordechai, M. Huleihel, *Identification of fungal phytopathogens using Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy and advanced statistical methods*, Journal of Biomedical Optics 17, 017002 (2012)
- [36] A. Salman, L. Tsrer, A. Pomerantz, R. Morehc, S. Mordechai, M. Huleihel, *FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes*, Spectroscopy 24, 261–267 (2010)
- [37] L. M. T. Lam, P. J. Dufresne, J. Longtin, J. Sedman, A. A. Ismail, *Reagent-Free Identification of Clinical Yeasts by Use of Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Journal of Clinical Microbiology 57, e01739-18 (2019)
- [38] G. Fischer, S. Braun, R. Thissen, W. Dott, *FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi*, Journal of Microbiological Methods 64, 63-77 (2006)
- [39] C. Quintelas, E. C. Ferreira, J. A. Lopes, C. Sousa, *An Overview of the Evolution of Infrared Spectroscopy Applied to Bacterial Typing*, Biotechnology Journal 13, 1700449 (2018)
- [40] D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann, *Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy*, Journal of General Microbiology 137, 69-79 (1991)
- [41] K. S. Egorova, A. N. Kondakova, Ph. V. Toukach, *Carbohydrate Structure Database: tools for statistical analysis of bacterial, plant and fungal glycomes*, Database 2015, bav073 (2015)

- [42] A. Pantazopoulou, G. Diallinas, *Fungal nucleobase transporters*, FEMS Microbiology Review 31, 657–675 (2007)
- [43] C. Girke, M. Daumann, S. Niopek-Witz, T. Möhlmann, *Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism*, Frontiers in Plant Science 5, 443 (2014)
- [44] G. Mickūnaitė, *Žmogaus patogeninių mikroorganizmų tyrimas infraraudonosios sugerties spektriniu metodu*, Magistro studijų mokslo tiriamasis darbas (2020)
- [45] L. M. Miller, M. W. Bourassa, R. J. Smith, *FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 1828, 2339-2346 (2013)
- [46] J. Kong and S. Yu, *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*, Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39, 549-559 (2007)
- [47] S. M. Uptain, G. J. Sawicki, B. Caughey, S. Lindquist, *Strains of [PSI+] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion*, The EMBO journal 20, 6236-6245 (2001)
- [48] I. D. Singhalage, G. Seneviratne, H. M. S. P. Madawala, I. S. Manawasinghe, *Characterization of structural properties of fungal-bacterial biofilms by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Ceylon Journal of Science 47, 77-83 (2018)
- [49] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman, *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues*, Applied Spectroscopy Reviews 43, 134–179 (2008)
- [50] E. Wiercigroch, E. Szafraniec, K. Czamara, M. Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek, *Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 185, 317-335 (2017)

IDENTIFICATION OF HUMAN PATHOGENIC FUNGI AND BACTERIA BY MEANS OF FT-IR ATR SPECTROSCOPY

Gerda Mickūnaitė

Summary

Pathogenic microorganisms can cause infectious diseases; the complications of these diseases endanger human life. Currently, medication is usually prescribed to cure patients of infectious diseases. Medication affect microorganisms and cause apoptosis or necrosis - the cells of microorganisms die. For this reason, it is important to identify the species of the microorganisms to accurately prescribe the treatment, and to identify the mechanisms of microorganism death in order to evaluate the patient's recovery process. Identification of microorganisms is carried out by using molecular biology, chemical or physical methods that take a long time until the identification results are obtained. Also, while using these methods, sample preparation, which is often complex and requires expenses, is needed. FT-IR ATR spectroscopy is a non-destructive method where almost any sample preparation is required. The collection of the ATR IR absorption spectrum takes several minutes therefore the identification of pathogenic microorganisms can be accomplished faster.

The aim of this work is to investigate the applicability of the FT-IR ATR spectroscopic method for the identification of pathogenic microorganisms.

The goals of this study:

1. To do statistical spectral analysis and evaluate the reliability of the FT-IR ATR spectroscopic method for the identification of different types of pathogenic microorganisms.
2. To do qualitative spectral analysis and apply different methods of statistical analysis, to evaluate the applicability of FT-IR ATR spectroscopic method for identification of different bacterial species.
3. To do qualitative spectral analysis and apply different methods of statistical analysis, to evaluate the applicability of FT-IR ATR spectroscopic method for identification of different fungal species.
4. To do statistical spectral analysis and evaluate the reliability of the FT-IR ATR spectroscopic method for the identification of undamaged, damaged by UV light and thermal shock fungi.

It was determined that the FT-IR ATR spectroscopic method is suitable for the identification of different types of pathogenic microorganisms. Hierarchical cluster analysis (HCA) of the ATR IR absorption spectra of 150 samples showed that the ATR IR absorption spectra of bacteria can be identified with 89,9 % accuracy and the ATR IR absorption spectra of yeast with 100 % accuracy. The principal component analysis (PCA) showed that the ATR IR absorption spectra of bacteria can be identified with 91,2 % accuracy and the ATR IR absorption spectra of yeast with 100 % accuracy.

Using the FT-IR ATR spectroscopic method the ATR IR absorption spectra of bacteria can be separated into gram – negative and gram – positive bacterial classes. Using HCA, it was found that the ATR IR absorption spectra of gram - positive bacteria can be identified with 88,1% accuracy, and the ATR IR absorption spectra of gram – negative bacteria with 93,3% accuracy. After PCA was applied it showed that the ATR IR absorption spectra of gram – positive bacteria can be identified with 73,6 % accuracy, and the ATR IR absorption spectra of gram – negative bacteria with 100 % accuracy.

Different species of bacteria can be identified using the FT-IR ATR spectroscopic method. It was found that by applying HCA and PCA, the ATR IR absorption spectra of different species of gram - positive bacteria can be identified with 42,6 % – 100 % accuracy. The ATR IR absorption spectra of different species of gram - negative bacteria can only be identified by applying PCA. The accuracy of this method reaches 100 %.

HCA of the ATR IR absorption spectra of different species of yeast showed that the ATR IR absorption spectra of *C. lusitaniae* yeast can be identified with 100 % accuracy, ATR IR absorption spectra of *S. cerevisiae* yeast with 66,7 % accuracy, ATR IR absorption spectra of *C. guilliermondii* yeast with 90 % accuracy. Based on the diagram of PCA the ATR IR absorption spectra of *C. lusitaniae* yeast can be identified with 90,1 % accuracy, the ATR IR absorption spectra of *S. cerevisiae* yeast with 83,3 % accuracy, and the ATR IR absorption spectra of *C. guilliermondii* yeast with 90 % accuracy.

HCA of the ATR IR absorption spectra of undamaged, damaged by UV light and thermal shock *C. lusitaniae* yeast showed that the ATR IR absorption spectra of undamaged, damaged by UV light and thermal shock *C. lusitaniae* yeast can be separated into different clusters with 100% accuracy. PCA of the ATR IR absorption spectra of undamaged, damaged by UV light and thermal shock *C. lusitaniae* yeast showed that the ATR IR absorption spectra of undamaged and damaged by thermal shock *C. lusitaniae* yeast can be identified with 100% accuracy and the ATR IR absorption spectra of damaged by UV light *C. lusitaniae* yeast can be identified with 72,7 % accuracy.

HCA and PCA of the ATR IR absorption spectra of undamaged, damaged by UV light and thermal shock *C. guilliermondii* yeast showed that only the ATR IR absorption spectra of damaged by thermal shock *C. guilliermondii* yeast can be identified with 100 % accuracy.

Using FT-IR ATR spectroscopic method, different subtypes of *S. cerevisiae* yeasts can be identified. HCA showed that the ATR IR absorption spectra of *S. cerevisiae weak* and *S. cerevisiae strong* yeast can be identified with 80% accuracy, and the ATR IR absorption spectra of *S. cerevisiae PSI* yeast can be identified with 60% accuracy. ATR IR absorption spectra of different subspecies of *S. cerevisiae* yeast can not be identified using PCA.

PATOGENINIŲ GRYBELIŲ IR BAKTERIJŲ IDENTIFIKAVIMAS FT-IR ATR SPEKTRINIŲ METODU

Gerda Mickūnaitė

Santrauka

Patogeniniai grybeliai ir bakterijos gali sukelti infekcines ligas, kurių komplikacijos kelia pavojų žmogaus gyvybei. Šiuo metu siekiant išgydyti pacientus nuo infekcinių ligų dažniausiai yra skiriami medikamentai. Medikamentai paveikia mikroorganizmų ląsteles ir jos žūva – sukeliama apoptozė arba nekrozė. Siekiant tiksliai paskirti medikamentus yra svarbu identifikuoti mikroorganizmo rūšį, o siekiant įvertinti paciento sveikimo procesą – įvertinti žūties mechanizmą. Mikroorganizmų tyrimai šiuo metu dažniausiai yra atliekami taikant molekulinės biologijos, cheminius ar fizikinius metodus, kuriems būdinga ilga analizės trukmė, reikalingas specialus bandinių paruošimas. FT-IR ATR spektrinis metodas yra nedestruktyvus, nereikalingas sudėtingas bandinio paruošimas, o spektro registravimas trunka keletą minučių, todėl patogeninių mikroorganizmų identifikavimas gali būti atliekamas greičiau.

Šio darbo **tikslas** – ištirti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą patogeninių mikroorganizmų identifikavimui.

Siekiant įvykdyti šiame darbe suformuluotą tikslą, **iškeliami šie uždaviniai**:

1. Atlikti statistinę spektrinę analizę ir įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo patikimumą skirtingų patogeninių mikroorganizmų tipų identifikavimui.
2. Atlikti kokybinę spektrinę analizę ir pritaikius skirtingus statistinės analizės metodus, įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų bakterijų rūšių identifikavimui.
3. Atlikti kokybinę spektrinę analizę ir pritaikius skirtingus statistinės analizės metodus, įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo pritaikomumą skirtingų grybelių rūšių identifikavimui.
4. Atlikti statistinę spektrinę analizę ir įvertinti FT-IR ATR spektrinio metodo patikimumą nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ar terminiu šoku patogeninių grybelių identifikavimui.

Magistrantūros studijų baigiamojo darbo metu nustatyta, kad FT-IR ATR spektrinis metodas yra tinkamas skirtingų patogeninių mikroorganizmų rūšių identifikavimui. Atlikus 150 bandinių ATR IR sugerties spektrų hierarchinę klasterių analizę (HCA) nustatyta, kad bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 89,9 % tikslumu, o mielių ATR IR sugerties spektrai 100 % tikslumu. Atlikus principinių komponentų analizę (PCA) nustatyta, kad bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 91,2 % tikslumu, o mielių ATR IR sugerties spektrai 100 % tikslumu.

Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą bakterijų ATR IR sugerties spektrus galima išskirti į gram – neigiamų ir gram – teigiamų bakterijų klases. Taikant HCA nustatyta, kad gram – teigiamų

bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 88,1 % tikslumu, o gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 93,3 % tikslumu. Taikant PCA nustatyta, kad gram – teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 73,6 % tikslumu, o gram – neigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrai – 100 % tikslumu.

Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą gali būti identifikuojamos skirtingos bakterijų rūšys. Nustatyta, kad taikant HCA ir PCA skirtingų gram – teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 42,6 % – 100 % tikslumu ir tikslumas priklauso nuo tiriamos bakterijų rūšies. Skirtingų gram – neigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami tik taikant PCA, o identifikavimo tikslumas siekia 100 %.

Atlikus skirtingų mielių rūšių ATR IR sugerties spektrų HCA nustatyta, kad *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu, *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 66,7 % tikslumu, *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai – 90 % tikslumu. Taikant PCA *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 90,1 % tikslumu, *S. cerevisiae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 83,3 % tikslumu, *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrai – 90 % tikslumu.

Atlikus nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų HCA nustatyta, kad nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai yra sugrupuojami į atskirus klasterius 100 % tikslumu. Atlikus nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrų PCA nustatyta, kad nepaveiktų ir paveiktų terminiu šoku *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu, o paveiktų UV spinduliuote *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai – 72,7 % tikslumu.

Atlikus nepaveiktų, paveiktų UV spinduliuote ir terminiu šoku *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrų HCA ir PCA nustatyta, kad 100 % tikslumu galima identifikuoti tik terminiu šoku paveiktų *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektrus.

Taikant FT-IR ATR spektrinį metodą galima identifikuoti skirtingus *S. cerevisiae* mielių porūšius. Atlikus HCA nustatyta, kad *S. cerevisiae weak* ir *S. cerevisiae strong* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrai yra identifikuojami 80 % tikslumu, o *S. cerevisiae* PSI mielių ATR IR sugerties spektrai – 60 % tikslumu. Taikant PCA skirtingų *S. cerevisiae* mielių porūšių ATR IR sugerties spektrų identifikuoti nepavyko.

Priedai

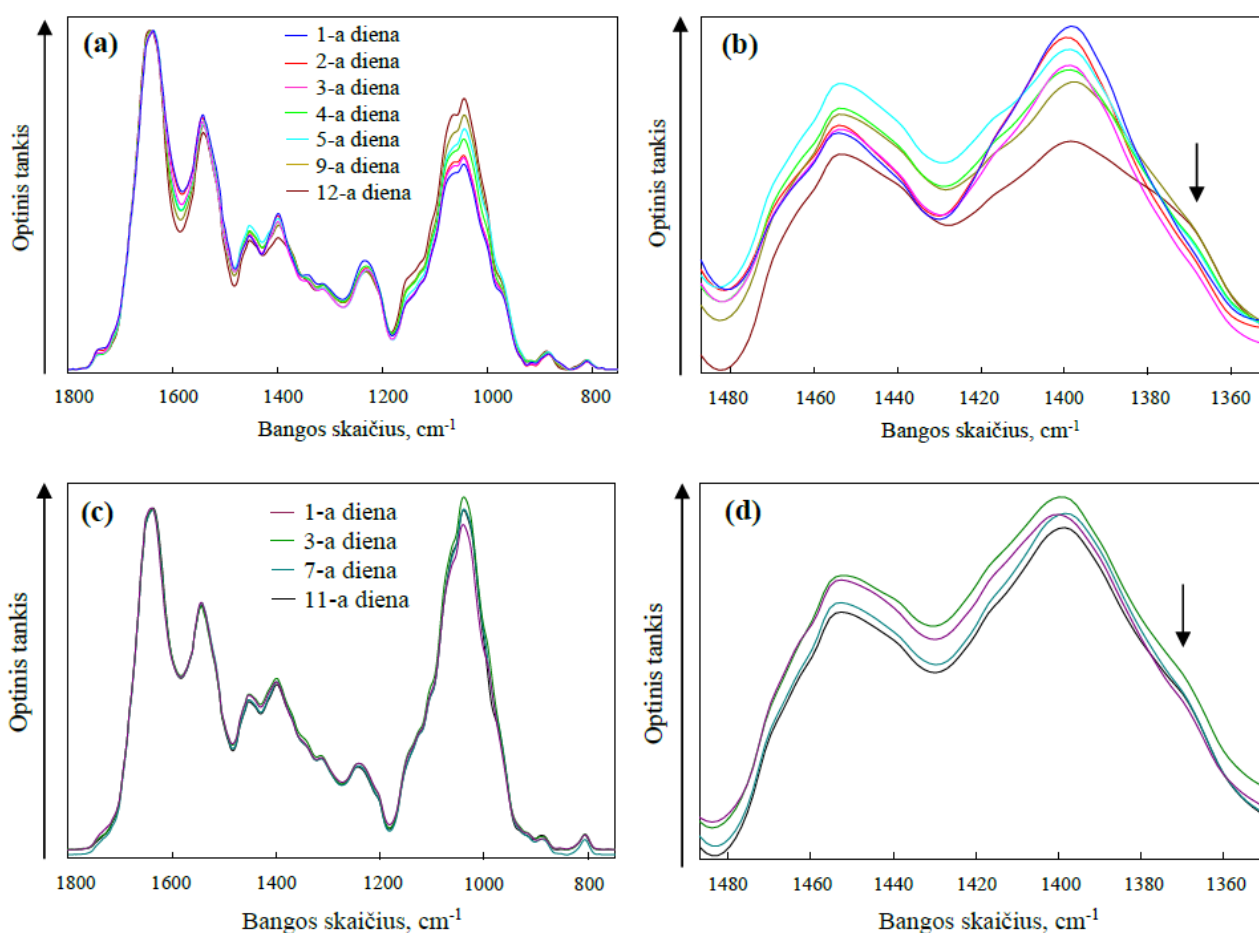
1 priedas *Spektrinių juostų padėtys ir jas atitinkantys molekulių virpesiai*

1 lentelė. Mielių ir bakterijų ATR IR spektruose stebimų virpesinių juostų priskyrimas.

Bangos skaičius, cm ⁻¹	Medžiaga	Virpesys	Šaltinis
1737	Lipidai	$\nu(\text{C}=\text{O})$	[30]
1637	Baltymai (Amidas I)	$\nu(\text{C}=\text{O}), \delta(\text{C}-\text{N})$	[30, 48]
1597	Adeninas	$\nu(\text{C}=\text{N})$	[49]
1581	Fenilas	$\nu(\text{C}-\text{C})$	[49]
1543	Baltymai (Amidas II)	$\delta(\text{N}-\text{H}), \nu(\text{C}-\text{N})$	[30, 48]
1510	Fenilas	$\delta(\text{CH})$	[49]
1470	Lipidai	$\delta(\text{CH}_2)$	[48]
1453	Alkanai, alicikliniai junginiai	$\delta_z(\text{CH}_2)$	[48]
1440	Lipidai	$\delta(\text{CH}_2)$	[48]
1398	Riebiosios ir amino rūgštys	$\nu_s(\text{C}=\text{O})$	[48-49]
1382	Angliavandeniai	$\delta(\text{COH})$	[50]
1370	Guaninas, citozinas	$\nu(\text{C}-\text{N})$	[50]
1354	Angliavandeniai	-	[50]
1330	Angliavandeniai	-	[50]
1340	Kolagenas	$\delta_w(\text{CH}_2)$	[49]
1312	Baltymai	-	[49]
1277	Kolagenas, baltymai (Amidas III)	-	[49]
1260	Fosfatas I	$\nu_a(\text{PO}_2^-)$	[49]
1238	Fosfatas I, Baltymai (Amidas III), Kolagenas	$\nu_a(\text{P}=\text{O})$	[48-49]
1200	Fosfatas I	$\nu_a(\text{P}=\text{O})$	[49]
1170	Baltymai	$\nu_a(\text{CO}-\text{O}-\text{C})$	[49]
1159	Baltymai, angliavandeniai	$\nu(\text{C}-\text{O})$	[49]
1151	Angliavandeniai	$\nu(\text{C}-\text{O})$	[30]
1117	RNR	$\nu(\text{C}-\text{O})$	[49]
1106	Polisacharidai	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{CC})$	[49]
1082	Fosfatas	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	[49]
1074	Angliavandeniai	$\nu(\text{C}-\text{O})$	[49]
1057	Angliavandeniai (deoksiribozė)	$\nu(\text{C}-\text{O})$	[48-49]
1043	Angliavandeniai (gliukozė, fruktozė, glikogenas)	$\nu(\text{C}-\text{O}), \delta(\text{C}-\text{O})$	[49]
1038	Ribozė	$\nu(\text{C}-\text{O})$	[49]
1028	Angliavandeniai (glikogenas)	$\nu(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{C}), \delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$	[49]
1016	Polisacharidai	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{CC}), \delta(\text{OCH})$	[49]
997	Ribozė	$\nu(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{C})$	[49]
992	Ribozė	$\nu(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{C})$	[49]
967	Angliavandeniai (deoksiribozė)	$\nu(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{C})$	[49]
915	Fosfodiesteriai	-	[49]

ν – valentinis virpesys, δ – deformacinis virpesys, ν_s – valentinis simetrinis virpesys, ν_a – valentinis asimetrinis virpesys, δ_z – deformacinis žirklinis virpesys, δ_w – deformacinis vėduoklinis virpesys

2 priedas *C. guilliermondii* ir *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektrai



1 pav. *C. lusitaniae* ATR IR sugerties spektrai: (a) 1800 cm⁻¹ – 750 cm⁻¹ ir (b) 1483 cm⁻¹ – 1350 cm⁻¹ spektrinėse srityse ir *C. guilliermondii* ATR IR sugerties spektrai: (c) 1800 cm⁻¹ – 750 cm⁻¹ ir (d) 1483 cm⁻¹ – 1350 cm⁻¹ spektrinėse srityse. (b) paveiksle spektrai pažymėti spalvomis atitinkančiomis (a) paveikslo legendą, (d) paveiksle spektrai pažymėti spalvomis atitinkančiomis (c) paveikslo legendą (adaptuota pagal [42])

C. lusitaniae ir *C. guilliermondii* mielių ATR IR sugerties spektruose, kurie registruoti praėjus keletui dienų nuo mielių užauginimo, yra stebimas 1370 cm⁻¹ spektrinės juostos atsiradimas. Ši spektrinė juosta yra stebima kaip spektrinės juostos, esančios ties 1398 cm⁻¹, petys. Spektrinė juosta, esanti ties 1370 cm⁻¹, yra intensyvesnė *C. lusitaniae* mielių ATR IR sugerties spektruose (1 pav. (b)), kai tuo tarpu *C. guilliermondii* mielių spektruose stebimas tik nežymus šios spektrinės juostos intensyvumo pokytis (1 pav. (d)). Šios spektrinės juostos intensyvumo padidėjimas gali būti siejamas su padidėjusiu nukleobazių kiekiu mielėse [44].