



**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS INSTITUTAS  
NEORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

**Roberta Povilavičiūtė**

Farmacinė chemija  
Magistro baigiamasis darbas

**VAISTAŽOLIŲ MIKROBIOLOGINĖS TARŠOS  
IDENTIFIKAVIMAS IR MAŽINIMAS**

Darbo vadovė  
doc. dr. Eglė Lastauskienė  
Darbo konsultantai  
doc. dr. Ramūnas Skaudžius  
dokt. Justina Jurgelevičiūtė

---

*(leidimas ginti, data, parašas)*

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

Vilnius 2020

## TURINYS

ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	5
1.1 Vaistažolių aktualumas šiandien.....	5
1.1.1 Taršos atsiradimo aplinkybės.....	6
1.1.2 Potencialūs mikrobiologinės taršos organizmai ir jų sukeltamos grėsmės.....	7
1.2 Užterštumo naikinimo būdai.....	8
1.2.1 Tinkamas paruošimas prieš pat vartojimą.....	8
1.2.2 Žaliavos apdorojimas: dujos .....	9
1.2.3 Žaliavos apdorojimas: gama spinduliuotė.....	9
1.2.4 Žaliavos apdorojimas: šalta plazma.....	10
1.2.5 Produkto apdorojimas: elektriniai mikroimpulsai – elektroporacija.....	11
1.3 Veiksmingų vaistažolių komponentų tyrimas.....	12
2. DARBO METODIKOS.....	13
2.1 Mikroorganizmų išskyrimas iš vaistažolių.....	13
2.1.1 Mikroorganizmų ekstrakcija D–sorbitoliu.....	13
2.1.2 Auginimas agarizuotose terpėse Petri lėkštelėse.....	13
2.2 Mikroorganizmų atskyrimas ir identifikavimas.....	13
2.2.1 Mikrobiologinis klonavimas .....	13
2.2.2 Mikroskopinė analizė .....	14
2.2.3 Gramo dažymo metodas.....	14
2.2.4 Genominės DNR išskyrimas.....	14
2.2.5 Elektroforezė.....	15
2.2.6 Polimerazinė grandininė reakcija.....	15
2.3 Mikrobiologinės taršos mažinimas.....	17
2.3.1 Elektroporacija.....	17
2.3.2 Šalta plazma.....	17
2.3.3 Vaistažolių tyrimas po poveikio šalta plazma .....	17
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	18
3.1 Mikroorganizmai išskirti iš vaistažolių.....	18
3.1.1 Mikrobiologinis klonavimas .....	18
3.1.2 Mikrobiologinė analizė .....	20
3.2 Atrinktų organizmų identifikavimas.....	21
3.2.1 Genominės DNR išskyrimas.....	21
3.2.2 PGR.....	21
3.2.3 Sekoskaita .....	22
3.3 Mikrobiologinės taršos naikinimas.....	24

3.3.1	Elektroporacija.....	24
3.3.2	Šalta plazma.....	25
3.3.3	Šaltos plazmos poveikis vaistažolēms.....	28
IŠVADOS.....		31
LITERATŪROS SARAŠAS.....		32
SANTRAUKA.....		35
SUMMARY.....		36

## ĮVADAS

Gamtinės kilmės žaliavos yra kasdien sutinkamos daugumos žmonių buityje ir plačiai naudojamos maisto produktų, papildų bei farmacijos pramonėse pasauliniu mastu. Toks platus ir gausus panaudojimas reikalauja aukštos kokybės ir saugumo vartotojui užtikrinimo. Priklausomai nuo augimo aplinkos ir išorinių veiksnių, augalinė žaliava gali būti užteršta labai plataus spektro nepageidautinomis priemaišomis.

Šiame darbe akcentuojama biologinė tarša, kurią plika akimi galima pamatyti nebent rimtos augalo pažaidos atveju. Tuo tarpu sąlyginai nedidelės, tačiau pavojingos mikroorganizmų koncentracijos gali apsunkinti žaliavų ar galutinių produktų saugojimą, transportavimą ir galiausiai kokybės užtikrinimą [1,2]. Mikrobiologinė tarša yra neišvengiama, todėl atsakingos institucijos visame pasaulyje yra nustačiusios leistinus nepatogeninių organizmų kiekius pagal galutinio produkto panaudojimo pobūdį. Vartotojai, turintys silpną imuninę sistemą ar kitokių sutrikimų, kurie gali būti nualinę organizmą, potencialiai rizikuoja vartodami produktus, kuriuose yra leistini bakterijų ar pelėsių kiekiai.

Vienas iš plačiausiai pasaulyje paplitusių žolelių produktų yra arbata, daugelyje šalių tai yra neatsiejama kultūros dalis. Dažnai arbatos gėrimai naudojami ligų simptomams malšinti tiek individualiai namuose, tiek stacionariose gydymo įstaigose. Būtent pastaruoju atveju rizika išauga, nes arbatoje gali būti antibiotikams atsparių ar kitokių patogeninių organizmų, kurie pacientams gali sukelti infekcijas. Pagrindinė naudojama mikrobiologinio užterštumo mažinimo priemonė prieš vartojimą arbatos atveju – tinkamas paruošimas, t. y. aukšta vandens temperatūra ir užplikymo trukmė. Temperatūrinis šokas gali sunaikinti daugelį organizmų, kurie nėra atsparūs, tačiau tam tikrų bakterijų sporos gali išgyventi ar net suaktyvėti [2,3]. Svarbu paminėti ir pelėsines kultūras, kurios yra labai paplitęs natūralus teršalas. Pasak mokslininkų, augalo dalys, esančios virš dirvožemio potencialiai yra užterštos pelėsiais. Pastarieji yra alergenai ir mikotoksinų gamintojai. Šios cheminės medžiagos priklauso stipriausių, natūraliai atsirandančių, kancerogeninių medžiagų grupei, yra gana stabilios ir išlieka po pelėsių ar grybų mirties [4,5].

Mikrobiotos naikinimas yra didelis iššūkis dėl savo įvairovės ir skirtingo atsparumo išoriniam poveikiui. Taip pat būtina atsižvelgti į augalo sudėtines dalis, nepažeisti aktyviųjų komponentų. Iki 1989 metų augalinės kilmės žaliavų dezinfekcijai plačiai buvo naudojamas etileno oksidas, tačiau ištyrus jo žalingą poveikį buvo uždraustas. Viena iš alternatyvų – gama spinduliuotė, tačiau poveikis žaliavų veiklosiems medžiagoms nėra pilnai iširtas [6,7]. Tiriamojo darbo metu išbandyti kiti alternatyvūs dezinfekciniai metodai – elektroporacija ir poveikis šalta plazma. Pastarasis metodas yra labai perspektyvus, nes dezinfekcijos metu veikiamą medžiagą nėra įkaitinama ir nereikia daug papildomų paruošimo procedūrų ir greičiausiai būtų sėkmingai sumažintas biologinis žolelių užterštumas be žymių kokybinės sudėties pakitimų [8].

Darbo tikslas – kokybiškai nustatyti mikrobiologinę taršą vaistažolėse ir išbandyti alternatyvius jos mažinimo metodus.

Darbo uždaviniai:

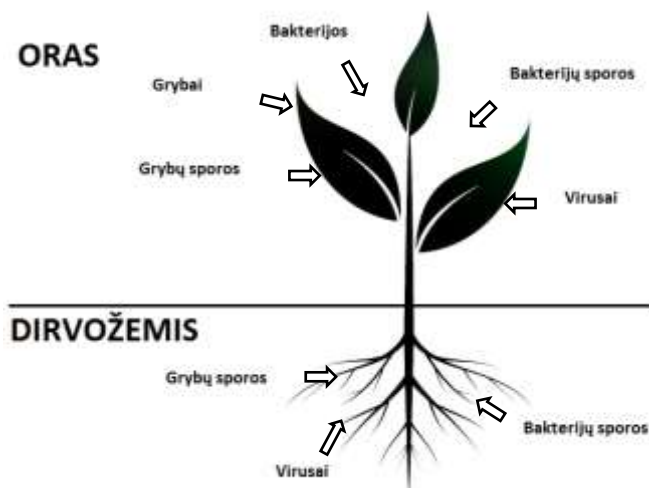
1. Išskirti mikroorganizmus iš tiriamų vaistažolių ir užauginti mitybinėse terpėse.
2. Optinės mikroskopijos pagalba nustatyti eukariotinius ir prokariotinius mikroorganizmus.
3. Pasirinkus keletą mikroorganizmų, išskirti jų genomine DNR ir amplifikavus ją atlikti sekoskaitą – identifikuoti organizmų gentis.
4. Iširti elektrinių mikroimpulsų ir šaltos plazmos poveikį mikrobiologinei taršai.
5. Optimizavus sąlygas nustatyti poveikio trukmę bei įtaką vaistažolių kokybei.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Vaistažolių aktualumas šiandien

Vaistažolių naudingosios savybės pastebėtos jau nuo senų laikų, tačiau dar ir šiomis dienomis didelė dalis žmonių pasitiki „liaudies medicina“. Pasaulio sveikatos organizacijos (angl. *World Health Organization*) atliktos apklausos rezultatai parodė, jog 70–80 % apklaustųjų renkasi augalinės kilmės, natūralius preparatus. Fitoterapija yra integruota beveik į visas tradicinės medicinos sritis, ypač tai aktualu šalims, kuriose tradicijos ir papročiai turi didelę svarbą, skurdesnėms ar besivystančioms valstybėms ir atskiroms žmonių bendruomenėms, besidominčiomis natūralios kilmės preparatais. Kadangi vaistažolių produktai yra tokie populiarūs pasauliniu mastu labai svarbu užtikrinti jų saugumą tiek kilmės šalyje tiek eksporto atveju [9,10].

Medicinoje naudojami augalai yra kompleksinės struktūros. Juose gausu įvairių medžiagų, kurių dalis yra naudinga ir naudojama terapiniais tikslais, tačiau būtina atsižvelgti ir į pašalines medžiagas. Augalo kilmė, augimo aplinka, rinkimo ir saugojimo sąlygos daro įtaką galutinės žaliavos kokybei. Augmenija yra puiki terpė gyvuoti mikroorganizmams, kurie gali būti pernešami oru, dirvožemiu (1 paveikslas), vandens pagalba ir kitais natūraliais ar dirbtiniais būdais. Mikrobiota yra platus spektras organizmų, kurie gali gyventi tiek augalo viduje tiek ant jo paviršiaus. Jų įvairovė ir gausa gali būti traktuojama kaip mikrobiologinė vaistinių augalų tarša [11].



1 pav. Galimas vaistinių augalų mikrobiologinio užteršimo kelias.

Bakterijų endosporos ir grybų sporos – dominuojantys mikrobiologiniai teršalai. Tarp šių organizmų gali atsirasti ir patogeninių, kurie kelia grėsmę vartotojui [12]. Būtent organizmų sporos yra itin pavojinga užterštumo forma, nes jos gali išlikti gyvybingos sąlyginai ilgą laiko tarpą ir susiklosčius palankioms sąlygoms mikroorganizmas gali vėl produktyviai daugintis. Biologinio pobūdžio užterštumą plika akimi sunku pamatyti ir neatlikus tam tikrų prevencinių veiksmų galima sulaukti nepageidaujamo žaliavos ar galutinio produkto užteršimo.

Nors ir pačiame augale yra gausu cheminių komponentų, dažniausia išskiriamas vienas arba grupė konkrečių junginių, turinčių specifinių teigiamų savybių žmogaus organizmui. Dažnai, norint išgauti kuo geresnėmis savybėmis pasižymintį produktą, naudojami vaistažolių ar prieskoninių žolelių mišiniai ir jeigu nors vienas iš komponentų bus užterštas visas galutinis produktas gali tapti kenksmingu. Būtent toks atvejis buvo tirtas 2002–2003 metais Vokietijoje. Padaugėjo *Salmonella*

*agona* bakterijos sukeltos infekcijos protrūkių tarp mažamečių vaikų, kurie vartojo specialią vaikams skirtą vaistažolių arbatą su anyžiaus sėklomis [13].

Nors dauguma vaistažolių pagrindu sukurtų preparatų nėra traktuojami kaip vaistiniai, nereikia pamiršti kokybės reikalavimų ir saugumo užtikrinimo. Būtent šioje sferoje galima remtis kai kuriomis gairėmis naudojamomis maisto, maisto papildų ar vaistų kokybės užtikrinimui. Gausu pasauliniu mastu naudojamų rekomendacijų, taip pat kiekviename regione ar net atskirose valstybėse yra reglamentuoti tam tikri kokybės reikalavimai, kuriais remtis yra itin svarbu, norint išvengti infekcijų ar net mirčių [14].

### 1.1.1 Taršos atsiradimo aplinkybės

Augalų produktų mikrobiologinė tarša priklauso nuo labai plataus spektro faktorių. Visų pirma pati augalo prigimtis turi didelę įtaką taršos atsiradimo galimybėms – augalo dalių, kurios yra naudojamos kaip žaliava, padėtis dirvožemio atžvilgiu, augalo šakotumas ir kitos išorinės fizinės savybės dėl kurių gali būti užstojama saulė ar lietus. Augalo pasiekiamumas tam tikriems gyvūnams ar klimato sąlygoms turi įtaka galimiems teršalų patekimo keliams. Svarbu paminėti ir augalo vidinės kompozicijos svarbą. Kai kurie augalai pvz.: melisa, bazilikas turi natūralias sudėtines dalis, kurios padidina atsparumą mikroorganizmams. Augalų, kurių sudėtyje gausu antiseptinėmis, antibakterinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų yra naudojami būtent dėl šių savybių terapiniais ar prevenciniais tikslais. Tokie augalai gali patys apsisaugoti nuo mikrobiologinės taršos. Galima net panaudoti tokius augalus augalinės kilmės žaliavų apsaugai. Buvo iširta, jog cinamonas gali būti panaudotas žaliavoms apsaugoti nuo grybelių ir aflatoksino B1 užteršimo [15]. Taip pat mikrobiologinė tarša galima esant grybelinėms ar bakterinėms augalo ligoms, kurios gali persiduoti per dirvožemį, užterštą vandenį ar net per augalus. Tokiu būdu augalas užsiterš pirminiais ligos sukėlėjais ar jų sporomis, o galiausiai gali išsivystyti ir didesnio lygio užterštumas, esant augalo pažaidai, t. y. išsivysčius ligai, sutrikus maistingųjų medžiagų gavimui ar susidarius toksiškų mikroorganizmų sancaupai [16].

Labai didelę įtaką augalo savybėms turi ir geografinė padėtis. Esama dirvožemio kokybė, klimatas, drėgmė – visi šie faktoriai lemia augalo galimybes vešėti tam tikroje lokacijoje, taip pat esant gamtinių išteklių trūkumui ar pertekliui galimas maistingų medžiagų gavimo sutrikimas ir netinkamas augalo vystymasis. Dėl tam tikrų klimato sąlygų daug augalų yra linkę į grybelines infekcijas. Taip pat dėl klimato gali pasikeisti ir aplinkos floros ir faunos sąlygos pvz.: padaugėti kenkėjų, gyvūnų migracijos metu pernešti įvairius mikroorganizmus ir kt.

Taip pat rinkimo ir saugojimo būdai, kurie nėra pagrįsti jokiais mokslinėmis rekomendacijomis gali būti potencialūs veiksniai, lemiantys kokybės reikalavimų neatitikimą ir grėsmes vartotojui. Yra pranešimų apie iš Indijos importuotas žaliavas, kurios buvo užkrėstos aflatoksinais, kuriuos išskiria grybinės kultūros [17]. Infekcinės augalų ligos gali sumažinti augalinės kilmės žaliavos panaudojimą terapiniams tikslams. Grybų išskiriami fermentai pažeidžia augalo ląstelių sienelės ir taip patekę į gilesnius sluoksnius gali pažeisti augalo gyvybines funkcijas bei skatinti vertingųjų cheminių medžiagų, pvz.: alkaloidų, degradaciją [18].

Auginimo ir derliaus nurinkimo metodika daro didelę įtaką galutinėms augalo savybėms. Kultivuojant ūkyje stebimos auginimo sąlygos, atsižvelgiama į augalo augimo stadijas, priklausomai nuo poreikio galima suteikti papildomos drėgmės, apšvietimo ar kitų augalui reikalingų ir naudingų preparatų. Tačiau ūkiuose išauga rizika greitai pasklisti augalų ligoms. Atlikta tyrimų, kurie bando palyginti kultivuojamų kultūrų mikrobiologinį užterštumą atitinkamai pagal auginimo sąlygas – šiltnamyje ar atviroje erdvėje, remiantis tradiciniais ar organiniais kultivavimo metodais. Tokio

po būdžio tyrimai rodo labai įvairias tendencijas ir rezultatai nėra galutiniai. Tačiau galima priėti prie išvados, jog tokie tyrimai reikalingi, norint surinkti pakankamą kiekį duomenų ir tobulinti esamas arba kurti naujas gaires ir rekomendacijas, kurios galėtų sumažinti mikrobiologinę taršą ir praplėstų ūkininkų žinias šiuo klausimu [19, 20]. Tuo tarpu renkant laukines vaistažoles rizikų spektras išauga. Laukinėje gamtoje surinktos vaistažolės gali būti užterštos sunkiaisiais metalais, pesticidų liekanomis. Keletas tyrimų parodė, jog jų tirtos laukinės vaistažolės buvo labiau užterštos mikotoksinais, nei kultivuojamos [21].

Žaliavos apdorojimas po surinkimo taip pat daro didelę įtaką kokybei. Jeigu nėra atliekama veikliųjų medžiagų ekstrakcija, tuomet dažniausiai augale esančių fermentų ir mikroorganizmų slopinimas yra atliekamas išdžiovinant žaliavą. Taip prailginamas eksploatacijos laikas ir apsaugoma nuo degradacijos [22]. Yra daug džiovavimo būdų, tačiau populiariausias ir mažiausiai išteklių reikalaujantis – paskleidus augalinės kilmės produktus ant paviršiaus šalia surinkimo vietos, atviraime lauke, saulės atokaitoje. Toks būdas nėra saugus ir geras produkto kokybei. Daug saugiau džiovinti uždaroje, gerai vėdinamoje patalpoje, kur džiovinamos vaistažolės negautų tiesioginių saulės spindulių. Staigus ir labai kaitrus išdžiovinimas gali lemti temperatūrai neatsparių veikliųjų medžiagų degradaciją [23].

Netinkamas išdžiovinusių žaliavų saugojimas gali lemti jų cheminę ir biologinę degradaciją. Priklausomai nuo būsimo panaudojimo reikia atsižvelgti į sandėliavimo temperatūrą – jeigu bus išskiriami eteriniai aliejai dauguma rekomenduoja vėsesnę temperatūrą, nes saugojimo metu lakiosios medžiagos gali išgaruoti. Pastebėta, kad geresnė kiekybinė sudėtis išlieka nesmulkintuose augaluose, todėl patariama susmulkinti nebent prieš pat produkto gamybą ar prieš vartojimą. Mikrobiologinio užterštumo atžvilgiu vienas svarbiausių dalykų yra drėgmės kiekis sandėliavimo patalpoje. Pasiekus tam tikrą santykinį oro drėgmės lygį mikroorganizmai gali ir vėl pradėti funkcionuoti, sugertas vanduo gali suaktyvinti tam tikrų fermentų veiklą [24,25].

### 1.1.2 Potencialūs mikrobiologinės taršos organizmai ir jų sukeltos grėsmės

Apsinuodijimai maisto produktais nėra labai retas reiškinys. Infekcijų atvejai fiksuojami dėl įvairių priežasčių: netinkamo maisto paruošimo – mėsos ar kiaušinių vartojimo atveju, netinkamo produktų laikymo iki vartojimo – per aukštoje temperatūroje, saulės atokaitoje, atviroje erdvėje. Dažnai infekcijos šaltinis gali būti džiovintos prieskoninės žolelės ar vaistažolių gėrimai.

Pasaulyje užfiksuotas ne vienas salmoneliozės protrūkio atvejis susijęs būtent su džiovintų vaistažolių vartojimu [13]. Patogeniniai organizmai gali ilgą laiką tarpą išgyventi ant išdžiovinusių žaliavų ir būti gyvybingi prieš vartojimą. Priklausomai nuo augalinės kilmės žaliavos vartojimo pobūdžio yra nustatyti tam tikri leistini mikroorganizmų kiekiai.

Viena iš dažniausiai pasitaikančių bakterijų rūšių augalinės kilmės žaliavose yra *Escherichia coli*. Tai yra savotiškas fekalinės taršos indikatorius, nes šios bakterijos yra aptinkamos šiltakraujų organizmų žarnyne. Taip pat dažnai aptinkamos bakterijų rūšys, kurių sporos yra itin atsparios atšiaurioms sąlygoms pvz.: *Bacillus* ar *Clostridia* genčių bakterijos. Aptiktos *Staphylococcus aureus* taip pat gali būti prastos higienos padarinys ir antrinio užterštumo požymis.

Didžiausią susirūpinimą kelia užterštumas mielėmis ir grybeliais. Natūraliai jų žmogaus organizme nėra, todėl gavus didesnę dozę, ypač esant nusilpusiam organizmui, gali kilti įvairių sveikatos sutrikimų. Užterštumas grybeliais padidina riziką mikotoksinų, ypač aflatoksino kiekio atsiradimo ant augalinės kilmės produktų. Yra įrodyta, jog tokie toksinai gali sukelti kepenų, inkstų, nervų sistemos, kvėpavimo takų, virškinamojo trakto ir kitas ligas. Literatūroje aptartuose tyrimuose augalinės kilmės produktuose dažnai aptinkamos *Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Aspergillus flavus*

grybelių gentys. Dalis jų rūšių gamina minėtuosius toksinus. Tačiau svarbu suprasti, jog radus mikotoksinius sintetinančių organizmų, dar nereiškia, jog tikrai rasime ir pačių mikotoksinų, kadangi reikia labai didelio santykinio drėgnumo 83–99 % ir tinkamos 18–24 °C temperatūros mikotoksinų sintezei. Todėl yra labai svarbu tinkamos saugojimo sąlygos, norint išvengti papildomo užteršimo [26,27].

Mikrobiologinė tarša itin pavojinga žmonėms, kurių imuninė sistema yra nusilpusi. Puikus pavyzdys yra ligoninės pacientai, kurie, stacionarinio gydymo metu, tikėtina taiko ir arbatą. Dažnai ji naudojama, norint padidinti skysčių vartojimą, tačiau galimi panaudojimo būdai yra įvairūs – antpilai/užpilai burnos higienos palaikymui, kurios metu gali būti atvirų žaizdelių ir t.t. Kartais tokios arbatos yra paruošiamos ne pagal instrukcijas, vėsinašamos vandentiekio vandeniū ar pakartotinai skiedžiamos, naudojant koncentratą, kuris gali stovėti net kelias dienas. Tokie veiksmai gali sukelti nosokomines infekcijas ir sukelti pavojų pacientams [28]. Nors vaistažolių panaudojimą reglamentuojančiuose dokumentuose yra nurodyti leistini mikroorganizmų kiekiai, tačiau antibiotikams atsparūs mikroorganizmai neturi būti randami. Pastarieji organizmai kelia didelį rūpestį, kadangi ir itin maži jų kiekiai gali būti labai pavojingi. Organizmo atsparumas antibiotikams – preparatams, kurie stabdo augimą ir/arba žudo mikroorganizmą, reiškia ir tai, jog greičiausiai šis organizmas gali išgyventi ir aršias sąlygas, vaistažolių apdorojimo stadijas ir ilgą laiką išlikti gyvybingu [29].

## 1.2 Užterštumo naikinimo būdai

Svarbu rasti tokį optimalų mikrobiologinės taršos naikinimo būdą, kuris būtų pigus, greitas, neturėtų pašalinių produktų ir kiek galima būtų kuo mažiau kenksmingas dezinfekcijos metu ir po jos. Patys svarbiausi kriterijai yra veiksmingų vaistažolių komponentų išsaugojimas, pačios žaliavos prekinės išvaizdos išlaikymas, nesutrumpintas galiojimo terminas ir t. t.. Yra daug būdų, kurie yra veiksmingi dezinfekcijai, tačiau šiuo atveju visai netinkami dėl tam tikrų tiriamos žaliavos savybių ir reikalavimų jai, todėl bus aptariame patys populiariausi ir tinkamiausi metodai.

### 1.2.1 Tinkamas paruošimas prieš pat vartojimą

Farmakopėjoje yra nurodyti kiekiai vaistažolėms, kurios bus naudojamos be jokio apdorojimo ir tokioms, kurios bus naudojamos po terminio apdorojimo. Farmakopėjos 9 leidime skyriuje 5.1.8 „Geriamų augalinių vaistų ir jų ruošimui naudojamų ekstraktų mikrobiologinė kokybė“ yra nurodyta, jog leistinas bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius yra  $10^7$  KFV (kolonijas formuojantys vienetai) /g, o bendras kombinuotas mielių / pelėsių skaičius yra  $10^5$  KFV/g. Taip pat išskirtos ir *E. coli*  $10^3$  KFV/g ir *Salmonella* – neturi būti rasta 25 g žaliavos.

Yra daug mikroorganizmų, kurie gali išgyventi aukštas temperatūras. Todėl labai svarbu, jog arbata būtų paruošiama užplikius aukštos temperatūros vandeniū, kadangi yra atliktas ne vienas tyrimas [3], kurių metu buvo nustatyta, jog esant žemesnei temperatūrai pakankamai didelis kiekis mikroorganizmų vis tiek išgyvena ir gali patekti į žmogaus organizmą ir ten sukelti infekciją. Būtinai reiktų atsižvelgti į gamintojo nurodytas arbatos paruošimo rekomendacijas, tačiau dauguma nurodo apie 80 °C vandens temperatūrą arbatžolių užplikymui. Tokiu atveju reiktų įvertinti vartotojo būklę ir jeigu tai yra pacientas, kurio organizmas nusilpęs, geriau nerizikuoti ir užpilti arbatžoles 90–95 °C temperatūros vandeniū. Vartojant arbatą dideliais kiekiais dažnai pasitaiko atvejų, kai pagaminamas koncentratas – didelis kiekis vaistažolių užpilamas mažu kiekiu vandens ir paskui skiedžiama prieš pat vartojimą. Tokiu būdu galima sudaryti palankias sąlygas mikroorganizmas daugintis būtent tame



koncentrate, ypač jeigu jis nebuvo užplikytas pakankamai aukštos temperatūros vandeniu ir/ar buvo laikomas netinkamomis sąlygomis ilgą laiką, todėl esant galimybei reikėtų vengti tokio vartojimo būdo.

### 1.2.2 Žaliavos apdorojimas: dujos

Cheminiis žaliavų apdorojimas dujomis buvo ilgą laiką populiarus ir plačiai naudojamas pasauliniu mastu dėl savo efektyvumo ir sąlyginai nedidelės kainos.

Nors dujos buvo naudojamos sterilizuoti tiek įvairius šviežius maisto produktus, tiek ir džiovintas žaliavas, tame tarpe ir vaistažoles, nebuvo pastebėta jokių pokyčių. Po kiek laiko buvo atliktas išsamus dujų poveikio sterilinamai medžiagai tyrimas ir nustatyta, jog sumažėja terpės pH. Buvo išsiaiškinta, jog natūraliai esantis chloras sterilinamuose junginiuose sureaguoja su etileno oksidu ir susidaro etileno chlorohidrinai, kuris yra toksiškas [30]. Toksiškumo problema gali būti dalinai išspręsta išvedinant ar maišant su kitomis dujomis, tačiau reikia atsižvelgti ir į žalą gamtai gamybos ir eksploatavimo procesų metu. Taip pat kaip alternatyva ilgą laiką buvo naudojamas formaldehidai, tačiau šiandien žinoma, jog jis yra toksiškas ir juo sterilinti maisto produktus yra draudžiama.

Yra ir kitų alternatyvų norint dujomis sterilizuoti sausas medžiagas. Viena iš jų yra vandenilio peroksido garai – efektyvus prieš platų spektrą virusų, bakterijų, grybų ir bakterijų sporų. Tačiau šios dujos tik dalinai sunaikina endotoksinus, taip pat kiti paviršiniai nešvarumai gali silpninti dezinfekcinį poveikį. Nors vandenilio peroksidas greitai suskyla ir nelieka jokių pavojingų pašalinių produktų, bet sterilinimo metu ir iškart po jo operatoriai gali būti veikiami toksiškai. Taip pat minimas ir ozono panaudojimas sterilinimui. Ši medžiaga yra oksidatorius ir sėkmingai suardo mikroorganizmų membranas, tačiau pasižymi silpnesniu poveikiu sporoms. Ozonas yra nestabilus, todėl norint naudoti jį sterilinimui reikia prieš pat naudojimą vietoje jį pasigaminti, o tam reikalinga specifinė ir brangi įranga [31]. Kiekvienam vartotojui yra pažįstamos ir CO<sub>2</sub> dujos, kurios taip pat naudojamos ir biologinio užterštumo mažinimui. Tačiau šių dujų vartojimas taip pat turi ir savų niuansų – norint veiksmingesnio efekto reikia gana didelio kiekio dujų, aukštesnės temperatūros arba ilgo veikimo laiko [32].

Sterilinimas dujomis yra seniai naudotas ir pažįstamas metodas, tačiau tik laikui bėgant paaiškėja galimas toksiškumas, dažnai operatoriams sukeliama rizika. Taip pat būtina atsižvelgti ir į daromą įtaką gamtai, todėl pravartu ieškoti vis tobulesnio, efektyvesnio metodo.

### 1.2.3 Žaliavos apdorojimas: gama spinduliuotė

Vienas iš alternatyvių būdų padidinti produktų saugumą ir prailginti sandėliavimo trukmę yra paveikimas radiacija. Šis metodas yra gana plačiai ištirtas ir naudojamas komerciniu lygiu. Valstybės yra nustačiusios leistinus radiacijos lygius arba prekybą tik tam tikrais produktais. Vis dar pastebima vartotojų neigiama reakcija į tokio pobūdžio dezinfekciją, o tai turi įtakos ekonominiu atžvilgiu – mažėja vartojimas.

Medžiagos paveikiamos fiksuoto stiprumo jonizuojančia energija, šiuo atveju konkrečiai gama spinduliuote. Nors pačio mėginio papildomai paruošti nereikia, tačiau spinduliuotės šaltiniai yra labai specifiniai – <sup>60</sup>Co ir <sup>137</sup>Cs. Taip pat gana problematiška nustatyti ir atitaikyti tinkamą dozę konkrečiu atveju. Tai yra taikant radiaciją tam tikram produktui ar produktų grupei, kuri yra kompleksinė savo morfologija, chemine sandara. Atlikta daug tyrimų, kurie parodo labai gerą momentinį mikrobiologinės taršos sumažėjimą, tačiau trūksta duomenų apie ilgalaikį poveikį. Tai ypač svarbu

produktams, kurie gali būti sandėliuojami ilgesnį laiką iki vartojimo. Atlikti tyrimai su kalendra parodė, jog net ir po švitinimo reikia produktą laikyti vėsioje temperatūroje, kitu atveju organizmai ir vėl gali daugintis. Taip pat pastebėta, kad nustatytos dozės dažnai tirtos vienam konkrečiam organizmui ir negali atitikti biologinės taršos realiamė mėginyje [33]. Kartais produktai praranda savo prekinę išvaizdą, atsiranda specifinis kvapas ar skonis, tačiau yra įrodyta, jog nėra jokio ilgalaikio poveikio dėl radiacijos.

Dauguma šio metodo tyrėjų vis dėlto rekomenduoja alternatyvių priemonių paiešką arba bandyti pritaikyti kelis būdus, norint pasiekti maksimalų rezultatą su mažiausia žalinga įtaka galutiniam produktui.

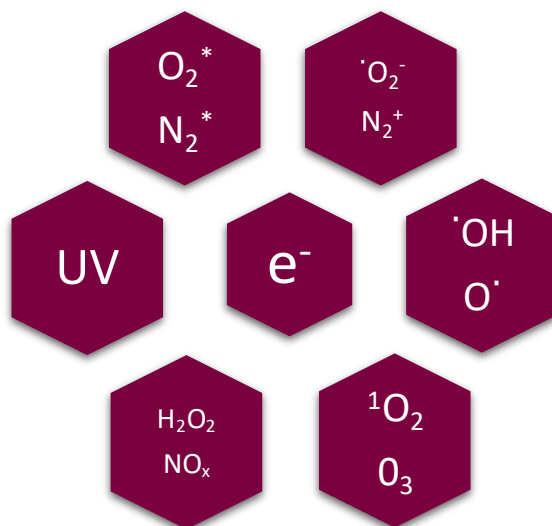
#### 1.2.4 Žaliavos apdorojimas: šalta plazma

Šaltos plazmos dezinfekcija yra labai perspektyvi, nes tai nėra terminis metodas, nereikalauja jokio papildomo žaliavos paruošimo ir remiantis mokslininkų bendruomenės atliktais tyrimais nedaro visai arba daro itin minimalią įtaką substratui. Buvo ištirtas šaltos plazmos poveikis sėklų paviršiaus mikrobiotai – didinant poveikio trukmę atitinkamai buvo sumažinta mikrobiologinė tarša. Kadangi vis ieškoma optimaliausios metodikos, kuri efektyviai naikintų taršą, neturėtų pašalinių produktų ir nedarytų neigiamos įtakos žaliavos cheminei ir fizinei kompozicijai šalta plazma yra potencialiai perspektyvus būdas [8].

Plazma yra jonizuotos dujos, kuriose yra elektronų, jonų ir neutralių atomų ar molekulių. Elektronai plazmoje yra daug aukštesnės temperatūros, o pačios dujos lieka maždaug kambario temperatūros. Šalta plazma indukuojama, kai esant pakankamai žemam slėgiui, dujos yra veikiamos aukšto dažnio svyruojančio elektromagnetinio lauko. Kai neutraliose dujų molekulėse esantys elektronai įgyja kinetinę energiją, kuri viršija jonizacijos slenkstį, tolimesni susidūrimai sukelia jonizaciją. Dujose esantys jonai susiduria su juos jonizuojančiomis dujų molekulėmis ir taip seka virtinė susidūrimų, kurių rezultatas yra neutralių atomų jonizacija, molekulių suskaldymas – reaktyvių radikalų susidarymas, sužadintos būsenos atomai. Priklausomai nuo proceso parametrų ir naudojamų dujų šalta plazma gali atlikti mechaninį darbą – abliacinį elektronų ar jonų perkėlimą į paviršių. Taip pat galimas ir cheminis poveikis, kai reaktyvios radikalų rūšys sąveikauja su paviršiumi.

Šalta plazma gali būti sudaryta naudojant įvairias dujas, tačiau būtent aplinkos oro naudojimas kelia didžiausią susidomėjimą dėl galimo pigesnio panaudojimo. Pagrindiniai oro komponentai yra deguonis ir azotas, todėl daugiausiai susidariusių reaktyviųjų rūšių irgi yra deguonies bei azoto dariniai. Plazma, kurios sudarymui naudotas oras, emituoja violetinės spalvos šviesą, kurią lemia būtent sužadintos azoto molekulės [34].

Pats poveikis mikroorganizmams – plazma yra sudaryta iš UV fotonų, elektrinio lauko, reaktyviųjų dalelių. Plazmos iškrovos metu susidaro reakingosios dalelės (2 paveikslas), kurios gali paveikti ląstelių membraną arba bent labai trumpam laikui padaryti ją pralaidžia. Būtent dėl to reaktyviosios deguonies ar azoto dalelės gali patekti į ląstelės vidų. Ten patekę reaktyvūs radikalai ar stiprūs oksidatoriai gali padaryti žalingą poveikį ląstelei jos citoplazmoje – oksiduoti baltymus, DNR. Jeigu membrana buvo pralaidi tik trumpam, patekę į ląstelės vidų oksidatoriai gali paveikti ląstelės struktūros integralumą – paskatinti lipidų peroksidazę – kas lemtų ląstelės struktūros pokyčius ir galimai žūtį [35].



**2 pav.** Dalis šaltos plazmos indukuotų rūšių, naudojant laboratorijos orą.

Puikus šaltos plazmos poveikio panaudojimas yra įvairiais tikslais paveikti augalų sėklas. Yra atlikta daug tyrimų, kurie parodo, jog paveikus sėklas šalta plazma augalai daug geriau veši, greičiau auga, užauginamas daug didesnis derlius ir pan. Kai kurias ligas augalas gauna per šaknis jau augimo procese, tačiau svarbus faktorius yra ir pati sėkla. Galima nusipirkti jau pelėsiomis, grybeliais ar kitais mikroorganizmais užterštas sėklas, kruopščiai auginti ir prižiūrėti augalą, tačiau mikroorganizmai puikiai įsigalės augale jau nuo pat daigo stadijos. Paveikus sėklas šalta plazma galima išvengti tokio efekto. Puikus pavyzdys yra mokslininkų atliktas tyrimas su pomidorais. Tyrėjai paveikė pomidorų sėklas šalta plazma ir išvengė kasmet kankinamos bakterinės ligos, tuo pačiu paspartino augimą ir pagerino pomidorų kokybę [36].

Šaltos plazmos dezinfekcija yra itin saugi, nes reaktingosios dalelės egzistuoja ir yra veiklios tik operacijos metu, vos išjungus aparatūrą dalelės beveik iš karto išnyksta.

### 1.2.5 Produkto apdorojimas: elektriniai mikroimpulsai – elektroporacija

Elektroporacija tai technologija, kurios metu naudojami labai trumpi (mikrosekundžių trukmės) stiprūs elektros impulsai, kurių metu ląstelės membranoje susidaro poros per kurias gali migruoti viduląstelinis turinys. Pasinaudojant šia technologija galima į ląstelės vidų įvesti tikslinį produktą. Priklausomai nuo impulso stiprumo, amplitudės, trukmės ir ciklų kiekio šis procesas gali būti grįžtamas arba negrįžtamas. Pastarasis yra naudojamas norint nužudyti ląsteles [37].

Priklausomai nuo ląstelės tipo jos atsparumas elektros impulsams yra vis kitoks, nes transmembraninis potencialas tiesiškai koreliuoja su ląstelės spinduliu. Tai reiškia, jog didesnių ląstelių transmembraniniai potencialai yra didesni esant tam tikram elektrinio lauko stiprumui, todėl tokių ląstelių sienelės yra labiau pažeidžiamos [38]. Svarbus parametras yra mikroimpulsų tipas, nuo jo priklauso elektroporatoriaus pajėgumas. Dėl išstobulintos pulsų energijos kontrolės, dažniausiai naudojami stačiakampių impulsų elektroporatoriai [39].

Šis metodas jau seniai naudojamas ir maisto pasterizavimui, tačiau vaistažolių atveju galimas veikimas tik skystoje terpėje – jau pagaminus arbatžolių ekstraktą. Tokiu atveju yra veikiamos tik patekusių į terpę mikroorganizmų ląstelės [40].

### 1.3 Veiksmingų vaistažolių komponentų tyrimas

Labai svarbu atliekant vaistažolių sterilinimą nepakenkti aktyviesiems komponentams. Dažniausiai augalinės kilmės produktų veikliosios medžiagos yra polifenoliniai kompleksiniai junginiai, kurių tarpe yra alkaloidų, įvairių organinių rūgščių, lakūs aromatiniai organiniai junginiai – eteriniai aliejai, flavanoidai ir kitos medžiagos. Būtent išvardintų organinių junginių visuma, kartais cheminėje kompozicijoje vyrauja vienas ar keli junginiai, yra veikloji augalo cheminė kompozicija.

Ištirti tokio tipo sudėtingas struktūras yra gana didelis iššūkis. Tačiau pasitelkus įvairias chromatografijos rūšis ar chromatografijos metodikas suderintas su masių spektrometriu detektavimu galima identifikuoti individualius junginius. Dažniausiai lakiems organiniams junginiams tirti naudojama dujų chromatografija, o norint ištirti platesnį spektrą junginių, pasitelkiama skysčių chromatografija.

## 2. DARBO METODIKOS

### 2.1 Mikroorganizmų išskyrimas iš vaistažolių

Tirtos jau išdžiovinotos ir pardavimui paruoštos vaistažolės: pataisų sporos, ugniažolė, jonažolė, ramunė ir gysločių luobelės. Siekiant sumažinti riziką dėl taršos iš aplinkos, laboratorijoje dirbta palaikant sterilią aplinką. Pagrindinis darbas atliktas Thermo Scientific Safe 2020 biologinės saugos spintoje.

#### 2.1.1 Mikroorganizmų ekstrakcija D–sorbitoliu

Norint išskirti mikroorganizmus iš vaistažolių, pasveriami 1–2 g žaliavos ir užpilamas šviežiai pagamintu ir autoklave sterilizuotu 1 M D–sorbitolio (Carl Roth, Nr. 6213.1) tirpalu. Kiekvienas bandinys purtomas 2 min Vortex purtykle ir tirpalas dekantuojamas.

#### 2.1.2 Auginimas agarizuotose terpėse Petri lėkštelėse

Paruošiami terpių (komponentai pateikti 1 lentelėje) tirpalai, autoklavuojami ir išpilstomi į Petri lėkšteles. Terpėms atvėsus ir sustingus pilama 100 µl paruošto (aprašyta 2.1.1) ekstrakto ir jis kruopščiai paskirstomas, naudojant stiklinę sterilizuotą lazdelę, visame terpės paviršiaus plote. Mėginiai dedami į inkubatorių ir auginami 24–48 valandas 37 °C temperatūroje. Po užauginimo sandėliuojama šaltame kambaryje, kuriame palaikoma 4 °C temperatūra

**1 lentelė.** Terpių ir jų komponentų sąrašas.

Terpės pavadinimas	Komponentai	Gamintojas, Nr.
TSA	Paruoštas mišinys	Carl Roth, CP70.1
LB	Agaras, 2 % Mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl, 1 % Peptonas, 1 %	Carl Roth, 5210.2 Carl Roth, 8986.2 Carl Roth, 2363.3 Carl Roth, 8986.2
YPD	Agaras, 2 % D(+)-Gliukozė, monohidratas, 2 % Mielių ekstraktas, 1 % Peptonas, 1 %	Carl Roth, 5210.2 Carl Roth, 6887.1 Carl Roth, 2363.3 Carl Roth, 8986.2

### 2.2 Mikroorganizmų atskyrimas ir identifikavimas

Po pirmojo mikroorganizmų užauginimo kiekvienoje lėkštelėje užaugo gausi įvairovė mielių ir bakterijų, todėl antras žingsnis buvo juos atskirti ir identifikuoti.

#### 2.2.1 Mikrobiologinis klonavimas

Apžiūrėtos visos lėkštelės ir vizualiai atrinkti visi skirtingai morfologiškai atrodantys organizmai. Pasiruošta naujų terpių (aprašyta 2.1.2) ir kiekvienas skirtingai atrodantis mikroorganizmas mikrobiologiškai klonuojamas į švirią lėkštelę. Kadangi organizmai nėra skysti, jų užsėjimo procesas kitoks: naudojant liepsną dezinfekuojama mikrobiologinė kilpelė, ja paimamas

nedidelis kiekis organizmo ir vedžiojamas terpės paviršiumi taip, kad atsiskirtų skirtingų morfologijų mikroorganizmų ląstelės. Auginama inkubatoriuje 24–48 valandas 37 °C. Po užauginimo sandėliuojama 4 °C temperatūroje.

### 2.2.2 Mikroskopinė analizė

Kiekvienas iš klonuotų mikroorganizmų stebėtas pro mikroskopą Olympus CX21 naudojant aliejaus–imersinį objektyvą, didinant vaizdą 1000 kartų. Mikroskopinis stikliukas nuvalomas su spiritu ir užlašinamas lašas dejonizuoto sterilaus vandens. Su sterilia metaline lazdele paaimamas nedidelis kiekis mikroorganizmo ir paskirstomas vandens laše. Mėginiai stebimi pro mikroskopą, norint identifikuoti ar tai eukariotas ar prokariotas, bakterijų atveju dar galima nustatyti ląstelių morfologiją.

### 2.2.3 Gramo dažymo metodas

Paruošus mėginį stebėjimui mikroskopu (aprašyta 2.2.2) palaukiama, kol vandens lašas nudžius. Tepinėlis fiksuojamas karščiu – pertraukiant 3–4 kartus virš spiritinės degiklio liepsnos, tam, kad dažymo ir plovimo metu mikroorganizmai nebūtų nuplauti nuo stiklo. Visų pirma dažoma kristaliniu violetu (baziniu dažu), palaikoma apie 60 sekundžių ir plaunama steriliu dejonizuotu vandeniu. Užpilama liugolio tirpalo (Gramo jodo reagentas), palaikoma apie 60 sekundžių ir plaunama vandeniu ir etanolu. Nuplovus tepinėlį jis dažomas safraninu, palaikoma apie 60 sekundžių ir vėl plaunama vandeniu. Preparatas džiovinamas kambario temperatūroje ir tiriamas mikroskopu.

### 2.2.4 Genominės DNR išskyrimas

Prieš išskiriant genominę DNR mikroorganizmai buvo šviežiai užauginti skystose terpėse – terpės paruoštos be agaro, į 5 ml skystos terpės steriliomis sąlygomis perkeliamas nedidelis kiekis mikrobiologiškai klonuoto mikroorganizmo ir auginama inkubatoriuje 12–14 valandų 37 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos mikro–centrifuginiame mėgintuvėlyje: pilama terpė su mikroorganizmu ir centrifuguojama 5000 × g (g – gravitacijos jėga), 10 min, terpė dekantuojama, o ląstelės renkamos. Plaunama steriliu dejonizuotu vandeniu ir 1 M D–sorbitolio tirpalu. Tuomet priklausomai nuo mikroorganizmo pobūdžio naudojant komercinį Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit rinkinį ir naudojantis protokolu išskiriamos genominės DNR. Naudojami tirpalai yra rinkinio sudėtinės dalys ir sandėliuojami pagal gamintojo rekomendacijas. Prieš pat bandymą reikia šviežiai reikia pasiruošti: gramteigiamų bakterijų lizės tirpalą – (20 mM Tris–HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA (Etilendiamintetraacto rūgštis), 1,2 % Tritono X–100 ir pripilti 20 mg/ml lizocimo prieš pat naudojimą, mielių lizės tirpalą – 10 mg/ml mielių lizinio fermento, 1M D–sorbitolio, 0,1 M EDTA.

*Gramneigiamos bakterijos*: surinktos ląstelės perkeliamos į 1,5 ml mėgintuvėlius užpilama 180 μl ląstelių lizės tirpalo (angl. *digestion solution*) ir 20 μl proteinazės K tirpalo ir sumaišoma maišykle (Vortex). Mėginys laikomas inkubatoriuje 56 °C temperatūroje apie 30 minučių, dažnais intervalais pamašomas maišykle. Įpilama 20 μl Rnazės A tirpalo, sumaišoma maišykle ir laikoma 10 minučių kambario temperatūroje. Įpilama 200 μl lizės tirpalo ir maišoma purtykle apie 15 sekundžių, kol mėginys tampa visiškai homogenišku. Įpilama 400 μl 50 % etanolio tirpalo ir sumaišoma purtykle. Mėginys perkeliamas į GeneJET Genomic DNA Purification kolonėlę su specialiu skysčių surinkimo mėgintuvėliu ir centrifuguojamas 1 min 6000 × g greičiu. Pakeičiamas mėgintuvėlis ir kolonėlė

užpilama 500 µl plovimo skysčio I, centrifuguojama 1 min 8000 × g ir surinktas skystis išpilamas. Ant kolonėlės pilama 500 µl plovimo skysčio II ir centrifuguojama maksimaliu greičiu tol, kol ant kolonėlės nebelieka skysčio. Kolonėlė perkeliama į naują sterilų mėgintuvėlį ir kolonėlės centras užpilamas 200 µl eliuacijos tirpalo. Inkubuojama 2 min kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min 8000 × g greičiu. Mėginys laikomas -20 °C temperatūroje.

*Gramteigiamos bakterijos*: surinktos ląstelės perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlius užpilama 180 µl gramteigiamų bakterijų lizės tirpalo ir laikoma inkubatoriuje 30 min 37 °C temperatūroje. Užpilama 200 µl lizės tirpalo ir 20 µl proteinazės K tirpalo gerai išmaišoma purtykle ir laikoma inkubatoriuje 56 °C temperatūroje apie 30 minučių, dažnais intervalais pamaišomas maišykle. Įpilama 20 µl Rnazės A tirpalo, sumaišoma maišykle ir laikoma 10 minučių kambario temperatūroje. Tuomet plaunama 50 % etanolio tirpalu ir toliau plovimo ir gryninimo procedūra identiška, kaip ir gramneigiamų bakterijų atveju. Mėginys laikomas -20 °C temperatūroje.

*Mielės*: surinktos ląstelės perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlius užpilama 500 µl mielių lizės tirpalo ir laikoma inkubatoriuje 60 min 37 °C temperatūroje. Ląstelės centrifuguojamos 10 min 3000 × g greičiu. Užpilama 180 µl audinių ardymo tirpalo ir 20 µl proteinazės K tirpalo ir sumaišoma maišykle. Mėginys laikomas inkubatoriuje 56 °C temperatūroje apie 45 minutes, dažnais intervalais pamaišomas maišykle. Įpilama 20 µl Rnazės A tirpalo, sumaišoma maišykle ir laikoma 10 minučių kambario temperatūroje. Įpilama 200 µl lizės tirpalo ir maišoma purtykle apie 15 sekundžių, kol mėginys tampa visiškai homogenišku. Tuomet plaunama 50 % etanolio tirpalu ir toliau plovimo ir gryninimo procedūra identiška, kaip ir gramneigiamų bakterijų atveju, tik mėginys yra daromas didesnės koncentracijos ir paskutiniame žingsnyje pilama 50 µl eliuacijos tirpalo. Mėginys laikomas -20 °C temperatūroje.

### 2.2.5 Elektroforezė

Naudojamas paruoštas pradinis 50×TAE tirpalas: Tris–bazė 242 g; Acetatas (100% acto rūgštis) 57,1 ml; EDTA 100 ml 0,5 M ir pripilta distiliuoto vandens iki 1000 ml ribos. Darbinis tirpalas 1×TAE : 20 ml pradinio tirpalo skiedžiama iki 1000 ml. Ruošiamas 1 % agarozės tirpalas: 1 g agarozės tirpinamas 100 ml 1×TAE. Tirpalas pašildomas mikrobangų krosnelėje vis pamaišant iki kol agarozė pilnai ištirps. Įpilama 5 µl EtBr (etidžio bromido) tirpalo (galutinė koncentracija gelyje 0,2–0,5 µg/ml). Palaukiama, kol agarozės tirpalas atvės ir jis išpilamas į specialią gelio formą su įstatytomis šukomis, kurios suformuos takelius. Paruošiami mėginių tirpalai: naudojamas markeris GeneRuler (100 bp DNA Ladder Plus) 0,5 µl + 2 µl bromfenolio dažo (angl. *6X Loading dye solution*) + 7 µl dejonizuoto vandens; mėginio 5 µl sumaišoma su 2 µl dažo. Galutiniai sukietėjus geliui jis dedamas į elektroforezės kamerą ir užpilamas 1×TAE tirpalu taip, kad apsemtų gelį. Į takelius supilami paruošti mėginių ir markerio tirpalai. Elektroforezė vykdoma esant 4 V/cm režimui (120 V įtampa, atstumas tarp elektrodų 30 cm) iki bromfenolio dažo linija pasieks kitame gelio krašte esančius šulinėlius. Pasibaigus elektroforezei išjungiamas elektros šaltinis ir gelis atsargiai išimamas iš kameros, su filtro popieriumi atsargiai nuvalomas tirpalo perteklius ar susidarę burbuliukai. Gelis fotografuojamas UV šviesoje, naudojant DNR Bio–Imaging System elektroforezės rezultatų fiksavimo sistemą (MiniBIS Pro). Mėginiai įvertinami remiantis markeriu.

### 2.2.6 Polimerazinė grandininė reakcija

Atlikta polimerazinė grandininė reakcija (PGR), siekiant padauginti išgrynintus tikslinius DNR fragmentus. Reakcijos atliktos naudojant Biorad T100 termociklerį. Biologinės saugos spintoje,

steriliomis sąlygomis yra sumaišomi PGR reakcijai reikalingi komponentai. 2 lentelėje pateikti visi komponentai: maišyta didesniais kiekiais ir vėliau mišinys išskirstomas taip, jog kiekvienas mėginys būtų 50 µl tūrio. Bakterijų atveju PGR atlikta kontrolei (nededama DNR, norint įsitikinti, jog reagentai nėra užteršti ir pasirinktos sąlygos yra tinkamos), gramteigiamoms ir gramneigiamoms bakterijoms. Mielių atveju: mėginys su DNR ir kontrolė.

**2 lentelė.** PGR reakcijos komponentai.

Bakterijos		Mielės	
PGR komponentas	Kiekis 3 mėginiams, µl	PGR komponentas	Kiekis 2 mėginiams, µl
H <sub>2</sub> O	101,25	H <sub>2</sub> O	67,50
PGR buferis (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	PGR buferis (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
dNTP	12	dNTP	8
MgCl <sub>2</sub>	12	MgCl <sub>2</sub>	8
F pradmuo	3	pITS–F pradmuo	2
R pradmuo	3	pITS–R pradmuo	2
PFU DNR polimerazė	0,3	PFU DNR polimerazė	0,2

Paruošus mėginius jie dedami į termociklerį ir nustatoma programa, atitinkamai pagal organizmo pobūdį (reakcijų sąlygos nurodytos 3 lentelėje).

**3 lentelė.** PGR reakcijos sąlygos, priklausomai nuo mikroorganizmo.

Bakterijos			Mielės		
95 °C	2 min		95 °C	8 min	
95 °C	1 min	Ciklas kartojamas 29 kartus	95 °C	30 s	Ciklas kartojamas 35 kartus
50 °C	2 min		60 °C	40 s	
72 °C	3 min		72 °C	40 s	
72 °C	7min		73 °C	5 min	
4 °C	∞		4 °C	∞	

Atlikus PGR reakciją amplifikuotos DNR produktai gryninami naudojant Thermo Scientific GeneJET PCR Purification rinkinį. Reakcijos produktai santykiu 1:1 sumaišomi su surišimo buferiu (angl. *binding buffer*), gerai išmaišoma ir pilama į GeneJET gryninimo kolonėlę. Centrifuguojama 60



s  $12000 \times g$ , skystis dekantuojamas. Plaunama ir eliuojama su atitinkamais buferiais ir produktas saugomas  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

## **2.3 Mikrobiologinės taršos mažinimas**

### 2.3.1 Elektroporacija

Prieš pat bandymą mikroorganizmai visų pirma yra šviežiai užauginami agarizuotoje terpėje Petri lėkštelėje (aprašyta 2.2.1 skyriuje) ir po to skystoje terpėje (aprašyta 2.2.4 skyriuje). Užaugintos mikroorganizmų ląstelės yra surenkamos vienkartiniam mėgintuvėlyje: pilama terpė su mikroorganizmu ir centrifuguojama 10 min  $5000 \times g$  greičiu. Vėliau ląstelės plaunamos 3 kartus su dejonizuotu steriliu vandeniu ir 2 kartus su steriliu 1 M D–sorbitolio tirpalu. Naudojant Eppendorf BioPhotometer, režimu OD 600 ( $\lambda=600\text{ nm}$ ), matuojamas mėginio optinis tankis. Ląstelės skiedžiamos sorbitoliu tokiu santykiu, kad galutinio tirpalo optinis tankis ties 600 nm bangos ilgiu būtų apie 1. Elektroporacijai naudojamas VGTU Stiprių magnetinių laukų instituto mokslininkų sukurtas didelės galios, stačiakampių elektrinių impulsų generatorių (elektroporatorius). Naudojama speciali kiuvetė, kuri pritaikyta šiam elektroporatoriui. Imama 50  $\mu\text{l}$  ankščiau minėto ląstelių tirpalo, jis paveikiamas 2,7,12,17 kV/cm elektrine įtampa atitinkamai 1 ms trukmės mikroimpulsais po 5 kartus. Po poveikio ląstelės iš kiuvetės išplaunamos 200  $\mu\text{l}$  1 M steriliu sorbitoliu. Mikroorganizmai auginami iš anksto šviežiai paruoštose Petri lėkštelėse su agarizuotomis terpėmis (aprašyta 2.1.2). Kiekvienam mėginiui auginama kontrolė (ląstelės neveiktos elektriniais mikroimpulsais) ir paveiktas mėginys. Po inkubacijos stebimi skirtumai ir skaičiuojamos užaugusios kolonijos.

### 2.3.2 Šalta plazma

Neapdorotos vaistažolės paskirstytos stiklinėse Petri lėkštelėse sterilioje aplinkoje ir paveiktos plazma naudojant Plasma Cleaner PDC–002–CE vidutiniu režimu jonizuojant laboratorijos orą. Kiekviena vaistažolių rūšis veikta didėjančiais laiko intervalais. Kiekvienas mėginys turi savo kontrolę, t.y. paraleliai sterilioje aplinkoje paskirstomas panašus kiekis vaistažolių ir sandariai laikomas stiklinėje Petri lėkštelėje. Po poveikio iš mėginio ir jo kontrolės steriliomis sąlygomis sveriami 0,05–0,06 g vaistažolių, užpilama šviežiai pagamintu 1 M D–sorbitolio tirpalu. Mišinys maišomas Vortex purtykle, surenkamas tirpalas. Matuojamas optinis tankis ties 600 nm bangos ilgiu, skiedžiama 1 M sorbitoliu siekiant turėti mėginius, kurių optinis tankis yra apie 1. Organizmai auginami iš anksto paruoštose agarizuotose terpėse ir stebimi skirtumai.

### 2.3.3 Vaistažolių tyrimas po poveikio šalta plazma

Tirti vaistažolių ekstraktai po poveikio šalta plazma. Pasirinkti organiniais tirpikliai: metanolis, acetonas ir chloroformas. Lyginami kontroliniai bandiniai ir vaistažolės, šalta plazma veiktos 15 minučių. Bandinių paruošimas: pasveriami 0,1 g kontrolės ir plazma veikto vaistažolių, užpilama 20 ml tirpiklio. 10 minučių purtoma kambario temperatūroje ir filtruojama. Ekstraktai tirti dujų chromatografijos metodu, naudojant Shimadzu GC–2010 chromatografą (Japonija). Lyginamos šalta plazma paveiktų vaistažolių ir kontrolinių bandinių chromatogramos.

### 3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Mikroorganizmai išskirti iš vaistažolių

Darbo metu tirtos vaistažolės gautos iš UAB „Švenčionių vaistažolės“. Tai žaliavos, kurios jau paruoštos prekybai arba mišinių gamybai be papildomo apdorojimo. Tirtos: pataisų sporos, ugniažolė, jonažolė, ramunė ir gysločių luobelės. Pirmo tyrimo etapo metu mikroorganizmai iš vaistažolių ekstrahuojami steriliu 1 M D–Sorbitolio tirpalu ir auginami ant terpių Petri lėkštelėse. Pataisų sporos ir gysločių luobelės tolimesniems tyrimams buvo atmestos, kadangi itin sunkus tyrimo atkartojamumas ir tuo pačiu patikimumas dėl gautos želės konsistencijos. Pirmieji auginimo rezultatai parodė, jog vaistažolėse gausu įvairių mikroorganizmų ir lėkštelėse užaugo didelė įvairovė organizmų, kuriuos net vizualiai sunku atskirti vieną nuo kito (3 paveikslas).



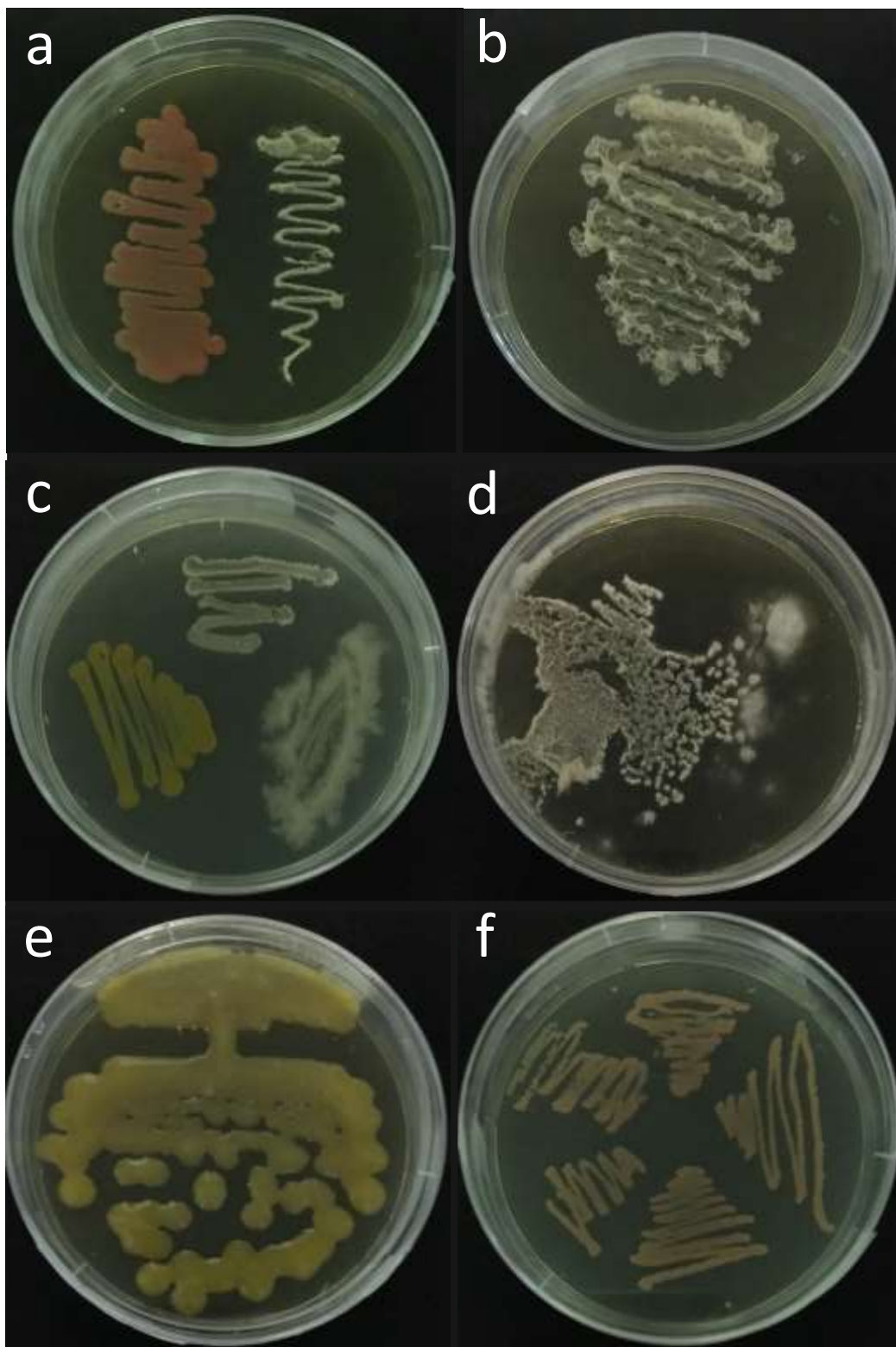
**3 pav.** Kultūrų įvairovė po pirmo užsėjimo iš balkšvųjų gysločių sėklų YPD terpėje.

##### 3.1.1 Mikrobiologinis klonavimas

Norint organizmus atskirti, jie palaiptai buvo atskiriami ir auginami individualiai atskirose lėkštelėse, naudojant tris skirtingas terpes. Pastebėta, jog organizmai lengviau ir gausiau dauginasi ant turtingesnių terpių – YPD ir TSA.

Atliktas vizualiai skirtingai morfologiškai atrodančių organizmų mikrobiologinis klonavimas (4 paveiksle e). Mėginiai buvo gana koncentruoti, labai gausiai dauginosi ir kai kuriose lėkštelėse užaugo net iki pat dangtelio ar bandė skverbtis į išorę. Kai kurie organizmai skleidė specifinį, ne itin malonų kvapą. Sunkiai sekėsi klonuoti siūline struktūra pasižyminčias – pelėsinės kultūras. Taip galėto atsitikti dėl organizmų konkurencijos dėl maistingųjų medžiagų ar netinkamai atlikto organizmų mikrobiologinio klonavimo, auginimo sąlygų pasirinkimo. 4 paveikslo f nuotraukoje organizmas išskirtas iš visų pradinių mėginių. Pastebėtas labai geras atkartojamumas auginant ant bet kurios terpės, nuotraukoje organizmai auginami ant LB terpės, kuri plačiausiai naudojama bakterijoms. Nustatyta, jog tirtose vaistažolėse minėtais kriterijais ir sąlygomis išskirti 33 skirtingi izoliatai. Tarp

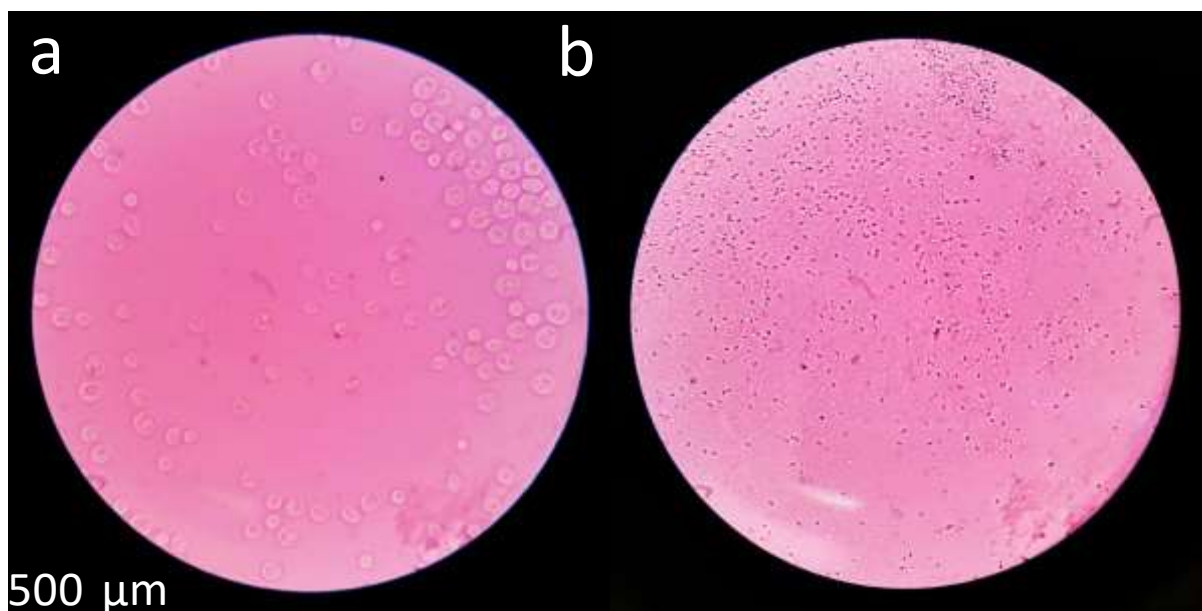
kurių vyravo intensyvaus atspalvio spalvomis pasižymintys organizmai, augantys labai aiškiai matomais kolonijomis formuojančiais vienetais, kurie po laiko susijungia. Siūlinių, „pūkelio“ pavidalo organizmų izoliuota tik keletas. Pastarosios pastebėtos praėjus kiek laiko po inkubavimo termostate, sandėliuojant šaltame kambaryje. Tačiau kultūros pastebėtos sandėliavimo metu neįtrauktos į tyrimą, nes negalima garantuoti, kad jų kilmė yra tyrimo objektas, o ne aplinkos faktoriai.



**4 pav.** Klonuoti mikroorganizmai YPD terpėje: a, b iš balkšvųjų gysločių sėklų, c, d, e iš jonažolės. F lėkštelėje klonuotas mikroorganizmas iš visų tirtų vaistažolių LB terpėje.

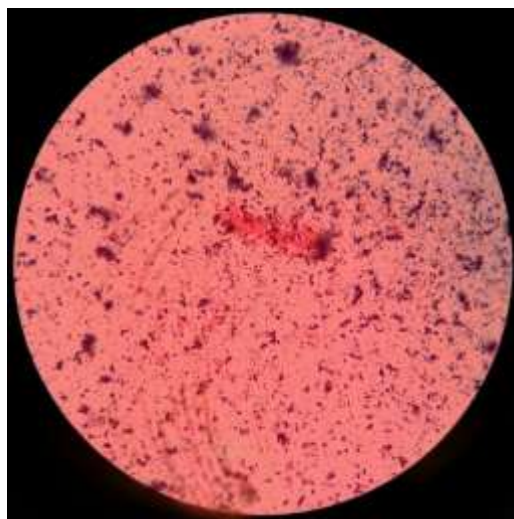
### 3.1.2 Mikrobiologinė analizė

Organizmų grupės identifikavimas atliktas naudojant mikroskopiją ir priskiriant ląsteles eukariotų arba prokariotų tipui. Vertinimas vykdytas atskiriant pagal ląstelės tipui būdingą struktūrą. Eukariotų ląstelės turi branduolį, kuris nuo citoplazmos atskirtas membrana, jos yra didesnės nei prokariotinės ląstelės. Tinkamai suregulius optinį mikroskopą galima pamatyti ir kitas organeles ir lengvai atskirti šiuos du ląstelių tipus (5 paveikslas). Prokariotų ląstelėms būdingos lazdelės ar rutulio formos. Išnagrinėjus visus organizmus nustatyta, kad kaip ir buvo tikėtasi, vyrauja prokariotinės ląstelės – 90 % sėkmingai klonuotų organizmų.



**5 pav.** Klonuoti mikroorganizmai: a – eukariotinė, b – prokariotinė ląstelės. Šviesinio mikroskopo didinimas 1000×.

Identifikavimui pasirinkti trys organizmai, kurių vienas yra eukariotas ir du – prokariotai. Prokariotinės ląstelės pagal sienelės struktūrą yra skirstomos į dvi grupes. Gramteigiamos bakterijos turi storą ląstelės sienelę su daugybe peptidoglikanų sluoksnių ir teichoinės rūgšties. Jų citoplazmoje yra magnio druskų, kurios su kristalvioletu sudaro patvarų junginį ir dažant Gramo būdą išlaiko mėlynai violetinę spalvą. Priešingai, gramneigiamos turi ploną sienelę, kuri sudaryta iš kelių sluoksnių peptidoglikano, apsupto antruoju lipidų membranos sluoksniu, turinčiu lipopolisacharidų ir lipoproteinų. Pastarieji nesudaro patvaraus junginio su pirmuoju dažu ir plaunant etanolu išblunka. Jos įgauna raudoną spalvą dažant fuksinu. 6 paveiksle matyti šiuo metodu dažytos bakterijos. Dauguma bakterijų turi gramneigiamas ląstelių sienelės ir tik aktinobakterijoms būdingas kintamas gramteigiamas išsidėstymas [41]. Atlikus Gramo dažymą tolimesniems tyrimams pasirinktos abiejų tipų bakterijų ląstelės, norint atskleisti kuo įvairesnes kultūras, užaugintas iš tiriamų vaistažolių. Kadangi aptikta gramteigiamų bakterijų, galima daryti prielaidą, jog bus identifikuoti potencialiai aplinkos sąlygoms atsparesni organizmai. Dažnai būtent tokiomis savybėmis pasižymintys organizmai gali būti kenksmingi vartotojui, nes įprastos žaliavos ar produkto apdorojimo sąlygos nebus veiksmingos.



**6 pav.** Bakterijos, dažytos Gramo metodu.

### 3.2 Atrinktų organizmų identifikavimas

Iš išskirtų mikroorganizmų gausos atsitiktine tvarka atrinki 3 kuo skirtingesni savo vizualine išvaizda ir ląstelių tipu organizmai. Siekiama parinkti kuo geresnę imtį iš visų mėginių norint atskleisti mikrobiotos įvairovę. Išskirti pasirinktų organizmų specifiniai segmentai: bakterijoms 16S rDNR (ribosominė deoksiribonukleorūgštis), o mielėms 18S rDNR. Šių regionų amplifikavimas yra visuotinai patvirtintas standartas taksonomijoje priskiriant mikroorganizmus atskiroms gentims. Būtent šiuos konkrečius genus galima rasti beveik visų rūšių organizmuose nepakitusius per visą evoliuciją. Pagal šių sričių skirtumus galima nustatyti net mikroorganizmų rūšis [42]. Atlikus PGR reakciją išskirti tiksliniai genai padauginėti ir galutiniai mėginiai siųsti į Nanodiagnostikos centrą sekoskaitai.

#### 3.2.1 Genominės DNR išskyrimas

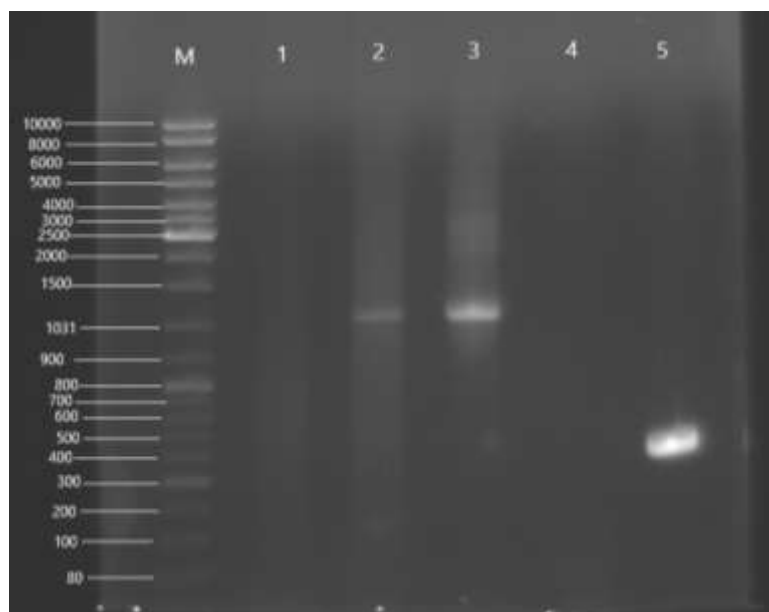
Naudotas komercinis rinkinys, kuriame nukleorūgščių išskyrimas atliekamas vientisos fazės (angl. *solid-phase*) metodu. Rinkinyje yra specialios silicio membranų kolonėlės inkorporuotos į centrifugavimui skirtus vienkartinis mėgintuvėlius. Ląstelių sienelės suardomos naudojant fermentus (proteinazė K). Taip pat naudojamos didelės koncentracijos chaotropinės druskos tirpalai, kurie destabilizuoja vandenilinius ryšius, van der Valso jėgas ir hidrofobines sąveikas – destabilizuojami baltymai, tarp jų ir nukleazės. Sudaromos optimalios sąlygos DNR absorbcijai. Naudojami detergentai (Tritonas X–100) padidina baltymų tirpumą ir palengvina ląstelių lizę. Silicio dalelės yra teigiamai įkrautos ir giminingos neigiamą krūvį turinčiai DNR grandinei, todėl pastaroji yra gerai sulaikoma kolonėlėje. Surinkta DNR yra plaunama, siekiant pašalinti baltymų ir druskų likučius ir galiausiai eliuojama šiek tiek bazinio buferio ir saugoma -20 °C temperatūroje.

#### 3.2.2 PGR

Norint padauginėti tikslinės DNR fragmentą, šiuo atveju 16S rDNR bakterijoms ir 18S rDNR mielėms, atlikta polimerazinė grandininė reakcija. Atitinkamai parinkti pradmenys – pagrindinei DNR grandinei komplementarūs blokai. Pirmasis atitinka dauginamos sekos pradžią, o antrasis kitos (papildančios) DNR grandinės pabaigą. Pagrindinis replikacijai reikalingas komponentas yra DNR



polimerazė. Fermento veiklai būtinos ir kitos cheminės medžiagos – buferis, kuris palaiko palankias sąlygas polimerazės aktyvumui, deoksinukleotidtrifosfatai (dNTP) yra amplifikuojamos DNR statybiniai blokai ir magnio jonai yra polimerazės kofaktorius. Po PGR reakcijų atliekama produktų analizė – DNR elektroforezė 1 % agarozės gelyje. DNR fragmentai, veikiami elektros srovės, juda gelyje link teigiamo poliaus ir išsiskirsto pagal dydį. Analizei naudojamas markeris, kurio sudėtyje esantys įvairių dydžių fragmentai išsiskirsto gelyje. 7 paveiksle matyti PGR reakcijos produktų apytiksliai dydžiai, lyginant su markeriu. PGR produktai laikytini švariais, nes nematoma jų išsiskirstymo į kelias zonas arba itin plačių zonų, kas reikštų gana didelį bazių porų spektrą – neišgrynintą produktą. Taip pat kokybės užtikrinimas pavykęs, nes kontrolės takeliuose nematyti didesnio intensyvumo zonų, kas indikuotų pašalinių produktų būvimą.



**7 pav.** Agarozės gelis po elektroforezės: M žymi DNR žymeklį; 1,2,3 PGR produktus – atitinkamai kokybės kontrolę, gramneigiamų ir gramteigiamų bakterijų genominės DNR fragmentai; 4,5 PGR produktus mielėms – atitinkamai kokybės kontrolę ir mielių genominės DNR fragmentai.

### 3.2.3 Sekoskaita

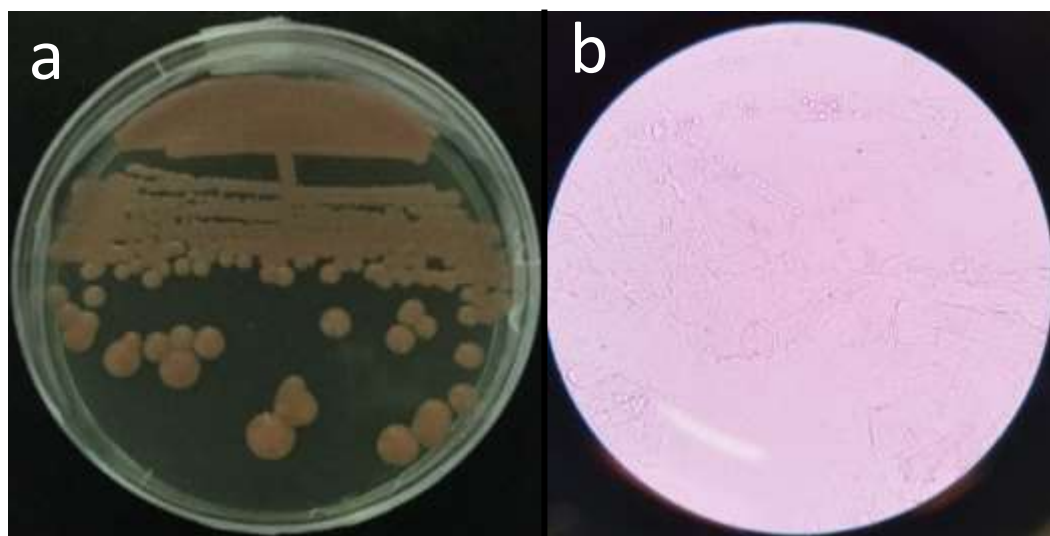
Sekoskaita atlikta užsakius tyrimus UAB „Nanodiagnostika“. Atlikta Quick Shot sequencing, paruošti mėginiai (lentelė 4), pagal paslaugą teikiančios įmonės rekomendacijas ir mėginiai išsiųsti tyrimui.

**4 lentelė.** Paruošti bandiniai sekoskaitai

Bandinys	Savybė	Koncentracija	Sekvenavimo sąlygos
-B PGR produktas	1100 bazių poros	20,0 ng/μl	Standartinė sekoskaita, Ilgas skaitymas.
+B PGR produktas	1100 bazių poros	20,0 ng/μl	
M PGR produktas	500 bazių poros	10,0 ng/μl	
1495R pradmuo	–	10,00 pmol/μl	
27F pradmuo	–	10,00 pmol/μl	
ITS–R pradmuo	TCCTCCGTCTATTGATATGC	10,00 pmol/μl	
ITS–F pradmuo	GTCGTAACAAGGTTAACCTGCGG	10,00 pmol/μl	

Gautos amino rūgščių sekos 96,8–99 % tikslumu. Atlikta sekų atitikčių paieška duomenų bazėje: NCBI (angl. *National Center for Biotechnology Information*) naudojant paieškos sistemą BLAST (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*). Suvedus sekas atliekama paieška sistemai prieinamose duomenų bazėse ir pateikiami galimi mikroorganizmų sekų atitikmenys paieškoje suvestiems duomenims. Paieškos rezultatai nėra 100 % patikimumo ir atitikimo, todėl negalima teigti, jog nustatyta tiksli organizmo rūšis, galime tvirtinti, jog nustatytos gentys.

Tarp visų tirtų vaistažolių ekstraktų ir auginimo terpių konfigūracijų plačiausiai pastebėtas organizmas *Rhodotorula spp.* Tai dažnai aptinkama, plačiai gamtoje pasklidusi mielių gentis. Sintetina pigmentus, kurių dėka jos yra oranžinės/raudonos spalvos (8 paveikslas A) ir blokuoja tam tikrus šviesos bangų ilgius. Tokiu būdu šios bakterijos apsaugo ląsteles nuo žalingo poveikio ir gali išgyventi itin ekstremaliomis ir nepalankiomis sąlygomis jūros dugne, itin druskingame vandenyje, esant labai aukštai temperatūrai ir t.t.. Literatūroje teigiama, jog 3 iš 8 šios genties rūšių yra patogeninės ir gali sukelti kraujotakos infekcijas, kurios dažniausiai pasireiškia silpnos imuninės sistemos žmonėms. Dažnai infekcija koreliuoja su kitu stipriu sveikatos sutrikimu, tačiau pastaraisiais dešimtmečiais pastebima vis daugiau atvejų, todėl bet kokie šio mikroorganizmo šaltiniai gali būti lemtingi [43].



**8 pav.** A – *Rhodotorula spp.*, B – bakterijos, esančios hifinių struktūrų viduje.

Kita nustatyta gentis *Pantotea spp.* Tai gramneigiamos geltonos spalvos bakterijos, priskiriamos enterobakterijų šeimai, kurias mokslininkų bendruomenė vertina prieštaringai. Žmonėms sukeltos infekcijos dažnai siejamos su *Pantotea agglomerans* rūšimi ant medicininių įrankių ar atvirų žaizdų užsikrėtimu nuo augalinės kilmės medžiagų [44]. Yra daug mokslinės literatūros, kur minimi *Pantotea spp.* klinikiniai izoliatai iš įvairių žaizdų, kūno skysčių ir išskyrų tarp įvairaus amžiaus ir imuninės sistemos būklės pacientų. Tačiau tokie tyrimai susilaukia skeptiškos nuomonės, nes nėra nuoseklaus pagrindimo, kaip šios bakterijos kolonizuoja gyvūnus. Tuo pat metu kai kurios *Pantotea spp.* rūšys kelia susidomėjimą dėl savo pritaikymo terapijoje, biokontrolėje ir bioremediacijoje [45].

Gramteigiamos bakterijos *Bacillus spp.* gentys plačiai paplitusios dirvožemyje ir gali išgyventi ekstremaliomis sąlygomis esant aukštam pH, aukštai temperatūrai, didelei druskų koncentracijai. Gentyje yra virš 70 rūšių, bet pavojingiausia laikoma *Bacillus anthracis* – juodligės sukėlėja. Ši liga yra zoonozė – liga bendra gyvūnams ir žmonėms, kuria galima užsikrėsti tiesioginiu arba

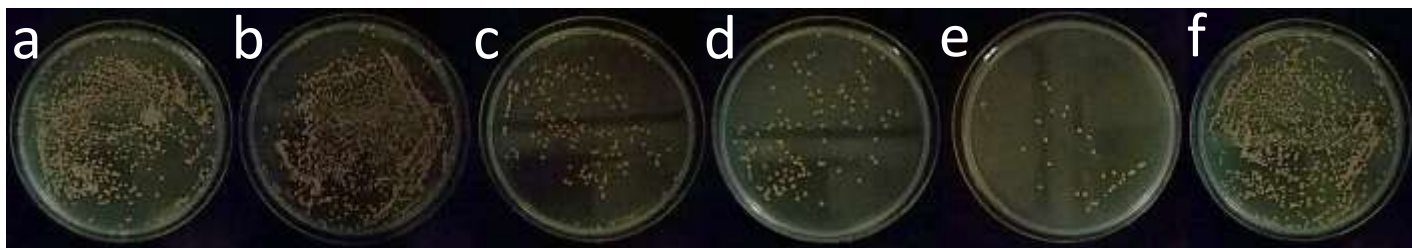
netiesioginiu būdu. Kadangi tai nėra invazinis mikroorganizmas, patekti į žmogaus kūną gali tik per pažeistą odą, gleivinę ar kvėpavimo takus. Virulentiškumas pasireiškia tik tada, kai apsauginė kapsulė yra pakankamai biosuderinama ir nesulaukia imuninio atsako bei tuo pat metu išskiriamas egzotoksinas turi visus būtinus baltymus ligos sukėlimui. Kelios kitos *Bacillus spp.* rūšys gali sukelti apsinuodijimą maistu – *Bacillus cereus* gamina toksinus, atsparius terminiam apdorojimui. Tuo tarpu *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* ir *Bacillus licheniformis* neišskiria toksinų, bet kai kurios gali augti virškinamajame trakte [46]. Priklausomai nuo rūšies, pasižymi įvairiomis savybėmis – *Bacillus thuringiensis* yra vabzdžių patogenas ir naudojamas kontroliuoti kenkėjams. *B. subtilis* gali sukelti morfologines deformacijas grybų hifuose. Panašus vaizdas aptiktas tyrimo metu (8 paveikslas B). Matyti, jog hifinėje struktūroje yra lazdelės formos bakterijų sankaupų. Ši savybė gali būti panaudota prevencijoje prieš grybų sukeltas augalų ligas [47].

### 3.3 Mikrobiologinės taršos naikinimas

Ekspertiškai nustatčius, jog vaistažolėse gausu mikroorganizmų iš kurių dalis galimai yra patogeniniai, vykdyti tolimesni tyrimai. Tai antroji šio darbo dalis – ištirti galimybes ir teoriškai nuspėti perspektyvas mikrobiologinei taršai mažinti.

#### 3.3.1 Elektroporacija

Veikiamos jau iš vaistažolių išskirtos kultūros mikrosekundiniu impulsiniu elektriniu lauku. Tirtos prokariotinės ir eukariotinės ląstelės. Veiksmingumas pastebėtas su visais mėginiais. Tyrimo metu naudotos dvi kontrolės, norint vizualizuoti elektroporacijos įtaką užaugusių kolonijų kiekiui, taip pat organizmų degradaciją laiko atžvilgiu. Didinant įtampą ir veikimo laiką užaugusių mikroorganizmų kiekis mažėja, tai matyti vizualiai (9 paveikslas). Paveikus 17 kV/cm įtampa eukariotų kolonijas formuojančių vienetų skaičius lėkštelėje sumažėja apytiksliai nuo 2000 iki 30 KfV. Laikas, per kurį atliktas tyrimas, nedarė įtakos organizmams.

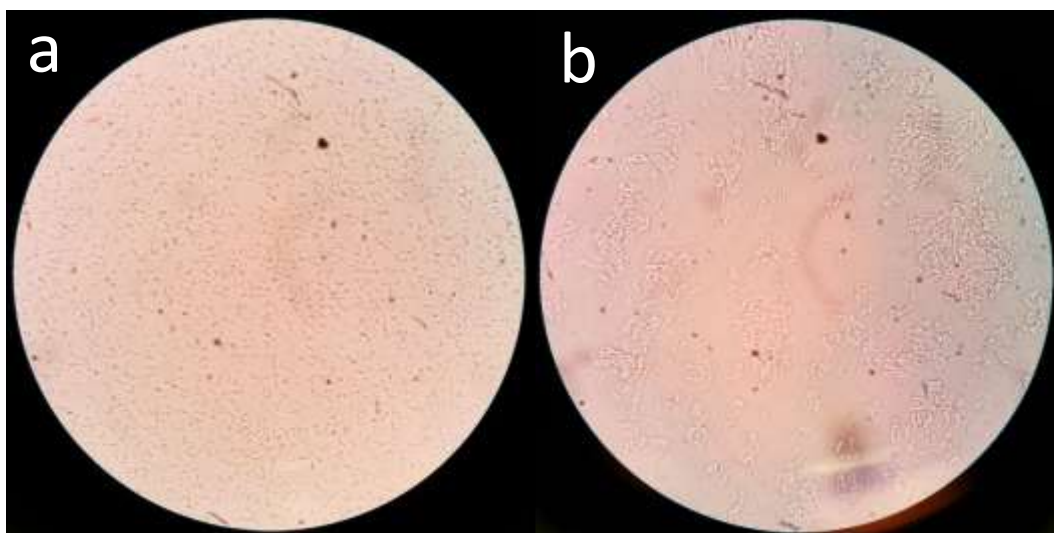


**9 pav.** a – *Rhodotorula spp.* neveiktas elektriniu lauku (1 kontrolė), b, c, d, e – ląstelės veiktos atitinkamai 2, 7, 12 ir 17 kV/cm elektrine įtampa 1 ms po 5 impulsus, f – 2 kontrolė.

Elektriniais mikroimpulsais paveiktos bakterijos taip pat rodė panašią vizualinę kolonijas formuojančių vienetų mažėjimo tendenciją didėjant veikimo įtampai. Paveikus didžiausia elektrine įtampa stebimas iki 98 % bakterijų inaktyvavimas. Literatūroje minimas elektrinio lauko poveikis bakterijų ląstelių sienelei ir struktūros morfologiniams pokyčiams. Pastebėta, jog ląstelių sienelės po poveikio pasidaro grublėtos ir netolygios, o sporų sienelės praranda apsauginį baltyminių sluoksnių, kuris susijęs ir su vidiniais ląstelės pakitimais [47]. Darbo metu po poveikio elektriniais impulsais bakterijos stebėtos po mikroskopu (10 paveikslas). Didelio skirtumo optiniu mikroskopu pamatyti



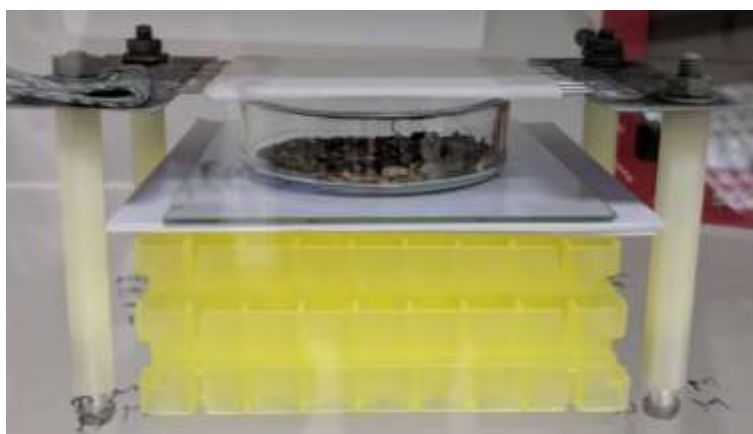
negalima, bet pastebėta daugiau bakterijų sankaupų vienoje vietoje lyginant su kontroliniais mėginiais. Tačiau norint daryti išvadas apie koreliaciją reiktų išsamesnio tyrimo.



**10 pav.** Bakterijos, po elektroporacijos – a, b atitinkamai kontrolė ir paveiktos 7 kV/cm įtampa.

### 3.3.2 Šalta plazma

Ši dezinfekavimo metodika yra labiau priimta tiriamiems mėginiams, atsižvelgiant į perspektyvas panaudoti pramoniniu būdu. Visų pirma išbandytas šaltos plazmos aparatas (11 paveikslas), naudojamas VDU Vidos Mildažienės grupėje, tiriant poveikį sėkloms [49]. Paveikti jonažolės ir gysločių luobelėlių bandiniai, taip pat ankstesnių tyrimų metu išskirtas organizmas (*Bacillus spp.*). Kaip ir minėta anksčiau, šis organizmas labai atsparus aplinkos poveikiui. Organizmas steriliai užteptas Petri lėkštelėje ir paveiktas 2 min šalta plazma. Vėliau kilpele imti paveiktos kultūros tepinėliai ir auginti terpėse. Nesimatė jokių pokyčių lyginant su kontrole. Pasikartojančios koreliacijos didinant poveikio laiką atitinkamai 2, 4, 8, 12 minučių jonažolės mėginiuose nesimatė, rezultatai buvo statistiškai nepatikimi. Pastebėta, jog daugumoje mėginių nepriklausomai nuo auginimo terpės ties 8 minučių poveikiu organizmų užaugo gausiau, o 12 min poveikio keliuose mėginiuose matomi kardinalūs sumažėjimai arba labai panašūs kiekiai kaip ir 8 min atveju. Todėl galimai veikimo plazma intervale 8–12 min vyksta kai kurių kultūrų augimo sužadinimas. Prietaisai prie išvados, jog reikia ieškoti optimesnių veikimo šalta plazma trukmių.



**10 pav.** Vaistažolės šaltos plazmos generavimo kameroje.

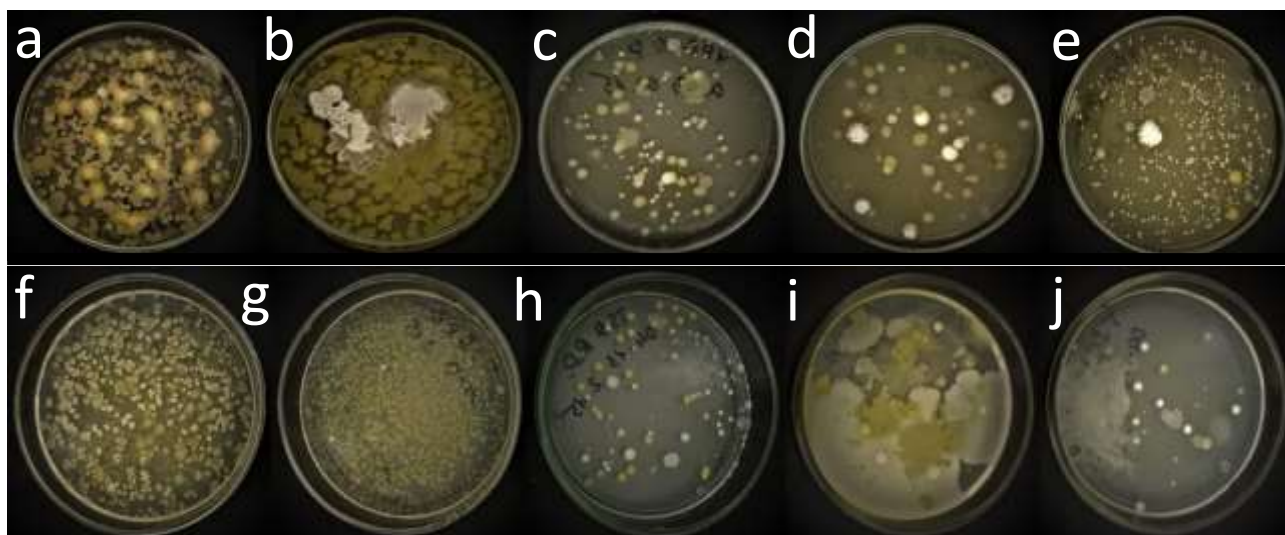
Tolimesniems tyrimams naudotas Harric Plasma gamintojų, pramoniniu mastu prieinamas aparatas. Plasma Cleaner PDC-002-CE yra vienas iš įmonės siūlomų produktų, kuris gali būti panaudojamas paviršių valymui ar modifikavimui. Prietaisas labai patogus atlikti tyrimams, į jį puikiai telpa mažos stiklinės Petri lėkštelės, kuriose paskleistos tiriamos vaistažolės. Taip pat aparato kamera labai sandari, lengvai pasiekiamas vakuumas. Per specialų langelį (11 paveikslas) galima matyti jonizuotų dujų emisiją ir ją remiantis reguliuoti radijo dažnių galingumą ir oro srautą. Matomas ryškus ir intensyvus dujų spalvos pokytis kameroje – tai indikuoja apie plazmos susidarymą. Kai elektronai rekombinuojasi su jonais (arba kai elektronai atsipalaiduoja į mažesnės energijos būseną) energijos pokytis yra išspinduliuojamas fotonais, kurie ir lemia spalvos pokytį.



**11 pav.** Vaistažolės šaltos plazmos generavimo kameroje.

Paveikus seriją mėginių iš jų izoliuojamos mikroorganizmų ląstelės ir jos užauginamos mitybinėse terpėse, stebimas kolonijas formuojančių vienetų skaičiaus pokytis priklausomai nuo poveikio ilgumo. Veikta vidutinio galingumo režimu didinant laiką nuo 10 minučių kas 5 minutes iki ilgiausio 25 minučių nepertraukiamo poveikio. Trumpesni intervalai neparodė jokių koreliavimo tendencijų, todėl manoma, jog jonizuojant orą reikia didesnių intervalų ir tuo pačiu galingesnio susidariusių reaktiviųjų dalelių poveikio, norint organizmus nužudyti.

Nustatytas optimaliausias šaltos plazmos poveikio laikas – 15 min, tuomet matomas didžiausias kultūrų kiekio sumažėjimas lyginant su kontroliniu mėginiu (12 paveikslas). Ties 20 min ar 25 min poveikis jau šiek tiek keičiasi – vizualiai sprendžiant matosi kiek kitokios morfologijos kultūros. Pavaizduotame mėginyje matomas skirtumas ir tarp naudotų mitybinių terpių. Ant TSA terpės augantys organizmai šiek tiek plokštesnės struktūros, kai tuo tarpu ant YPD organizmai užaugo daug sparčiau. Po 25 min poveikio TSA terpėje vėl matomas sumažėjimas, tačiau tai galėjo lemti mažesnis maistingų medžiagų kiekis. Ugniažolės ir ramunės mėginiuose matyti panašios tendencijos – aktyvavimas iki 10–12 minutės, didžiausias sumažėjimas ties 15 minute ir ilgiau veiktuose mėginiuose tendencijos nepasikartoja. Tai gali reikšti, jog paveikus mėginius 15 minučių šalta plazma ir pašalinus vienus organizmus, atsiranda palankesnės sąlygos augti organizmams, kurie yra atsparesni išorės veiksniams. Taip pat panaikinus dalį kultūrų konkurencija dėl mitybinių medžiagų sumažėja ir šiems atsparesniems organizmams lengviau daugintis. Teigiama, jog anaerobams reaktingos deguonies rūšys gali būti itin kenksmingos. Šio tyrimo metu jonizuojant orą vyrauja įvairios deguonies ir azoto dalelės. Tai galėtų paaiškinti augimo sumažėjimus paveikiant trumpais intervalais.



**12 pav.** A – mikroorganizmai užauginti iš jonažolės, neveikti šalta plazma, b, c, d, e – jonažolės paveiktos šalta plazma 10, 15, 20, 25 minutes atitinkamai ir užauginta YPD terpėje. F – mikroorganizmai užauginti iš jonažolės, neveikti šalta plazma, g, h, j, i – jonažolės buvo paveiktos šalta plazma 10, 15, 20, 25 minutes atitinkamai ir užauginta TSA terpėje.

Vaistažolės buvo tiriamos tokios, kokios yra, norint gauti rezultatus, kurie atitiktų realų potencialiai ateityje pramoniniu mastu taikytiną modelį. Toks tiriamo objekto nehomogeniškumas sumažina metodo efektyvumą. Plazmos indukuotos dalelės susiduria su fizinėmis kliūtimis ir poveikis galimas tik pačiame sluoksnio paviršiuje. Nors vaistažolės ir buvo džiovintos, jos turi tam tikrą drėgmės kiekį. Vanduo gali stabilizuoti plazmos generuotas reaktyvias rūšis arba energija gali būti nukreipta ne jonizavimui, o molekulių sukimosi ar virpesių sužadinimui. Dažniausiai dezinfekcinis plazmos poveikis tiriamas individualiems izoliuotiems organizmams ir yra įrodytas kaip efektyvus. Šiuo atveju yra didelė mikroorganizmų gausa ir pats substratas yra kompleksinis.

Nustačius, kuris šaltos plazmos laikas yra pats optimaliausias, tirtas ilgalaikis poveikis mikroorganizmams. Vienodomis sąlygomis paveiktas didesnis kiekis kiekvieno mėginio. Laikoma sandariai aptraukus parafilmo juostele, tamsoje, kambario temperatūroje. Kas dvi savaites užaugintos ekstrahuotos ląstelės, mėginiai praskiesti iki  $0,0004$  optinio tankio esant  $600$  nm bangos ilgiui ir skaičiuojami kolonijas formuojantys vienetai vienam gramui vaistažolių. Mėginiai tirti beveik 5 mėnesius ir KfV skaičius gramui vaistažolių išlieka labai panašus visą tyrimo laikotarpį (5 lentelėje).

**5 lentelė.** Kolonijas formuojančių vienetų diapazonas mėginiuose, veiktuose šalta plazma.

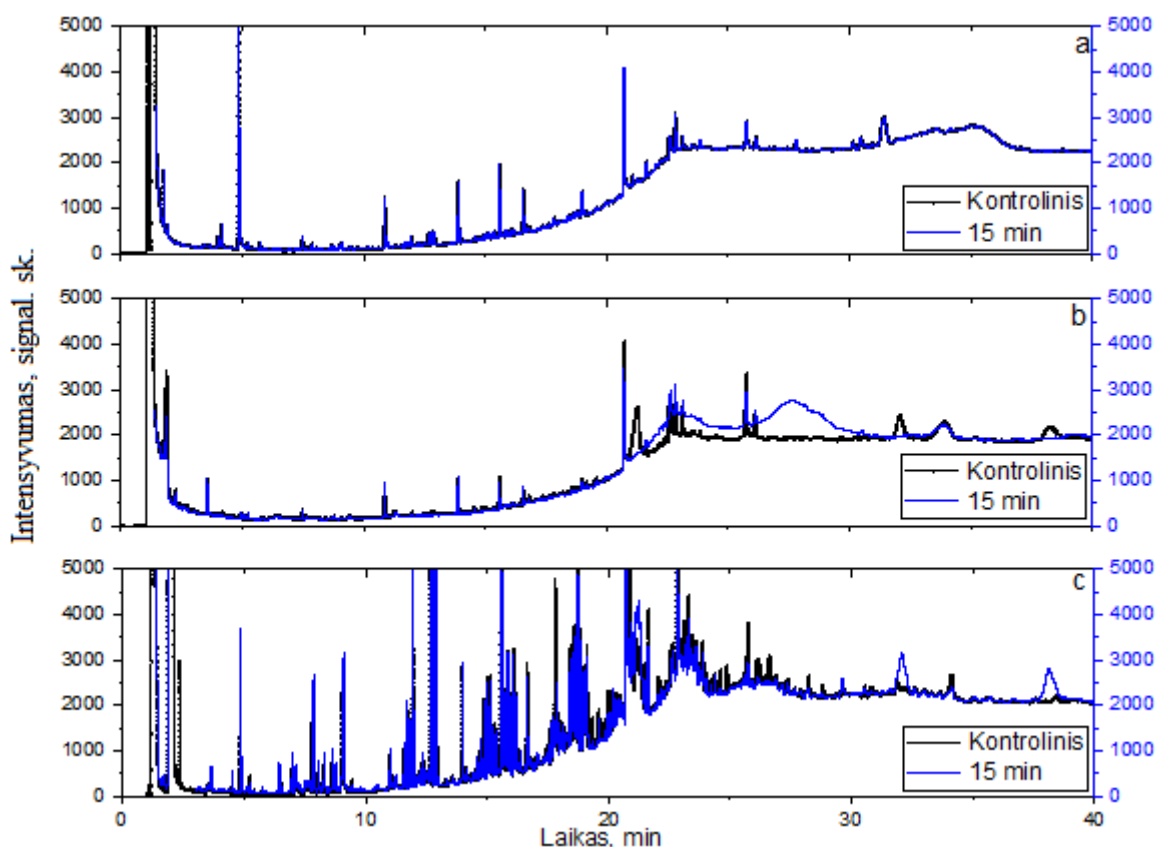
Tirta vaistažolė	KfV/g
Jonažolė	$4,64 \cdot 10^5 - 8,77 \cdot 10^5$
Ramunė	$2,79 \cdot 10^3 - 4,88 \cdot 10^3$
Ugniažolė	$1,78 \cdot 10^5 - 5,14 \cdot 10^5$

Apskaičiuotas bendras visų užaugusių kultūrų kolonijų skaičius neviršija Europos farmakopėjos reikalavimų vaistažolėms. Rezultatų išsibarstymas yra labai nedidelis ir galima teigti, jog poveikis mikrobiologinei taršai išlieka bent 5 mėnesius. Literatūroje nerasta panašaus pobūdžio tyrimų po sterilinimo šalta plazma. Dažniausiai tiriamas poveikis vienam ar keliems tiksliniams mikroorganizmams ir stebimas momentinis poveikis jiems. Laiko atžvilgiu tirama tik šaltos plazmos indukuotų reaktyviųjų dalelių poveikis ar prekinės išvaizdos pokyčiai. Nagrinėtoje literatūroje

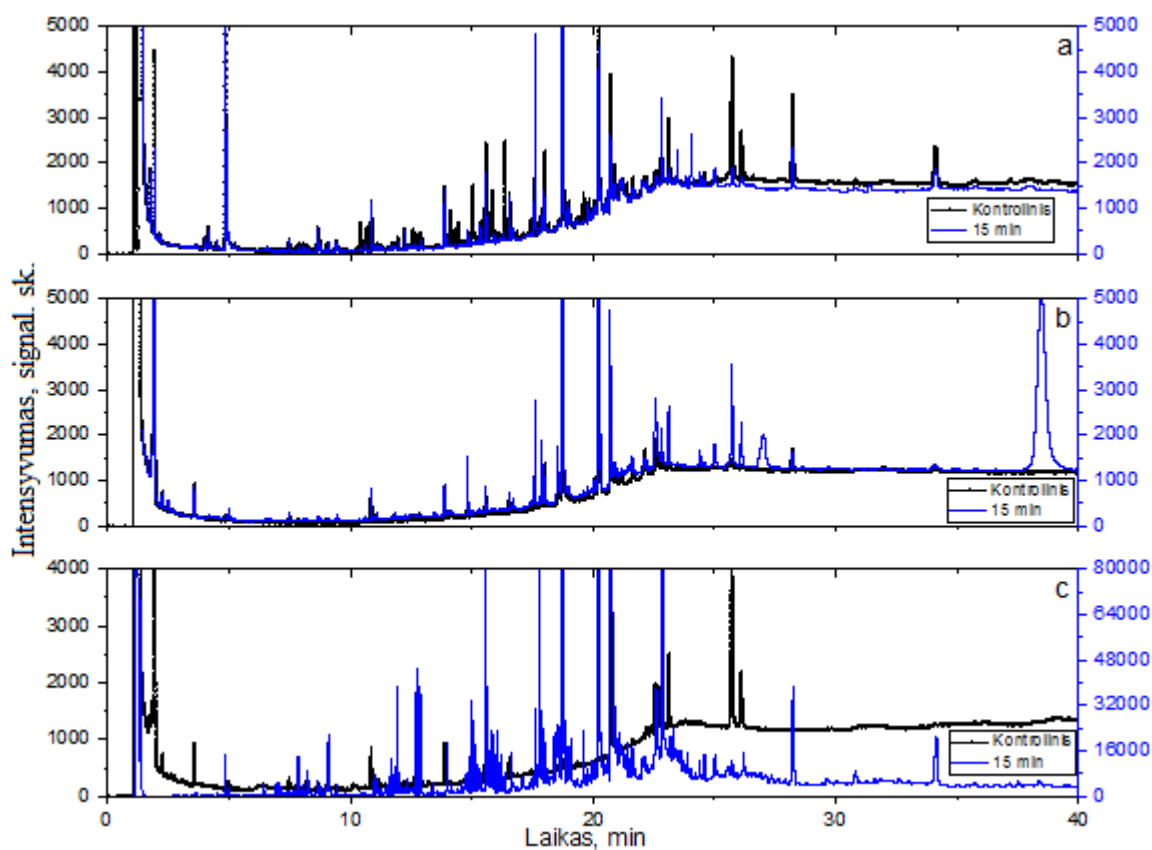
nepastebėta tokio pobūdžio tyrimo mikrobiologinės taršos ant substrato pastovumo laiko atžvilgiu. Šio darbo atveju tai yra itin aktualu, nes dirbame su intencija surasti optimalias sąlygas mikrobiologinės taršos mažinimui realiems vaistažolių mėginiams su potencialu pritaikyti tokią technologiją pramoniniu mastu. Atliktas ir nustatytas ilgalaikis šaltos plazmos poveikis mikrobiologinei taršai vaistažolėse yra daug žadantis, nes tokios džiovintos augalinės žaliavos ir produktai nėra greitai gendantys ir gana ilgą laiką iki vartojimo gali būti sandėliuojami ir neprarasti prekinės išvaizdos.

### 3.3.3 Šaltos plazmos poveikis vaistažolėms

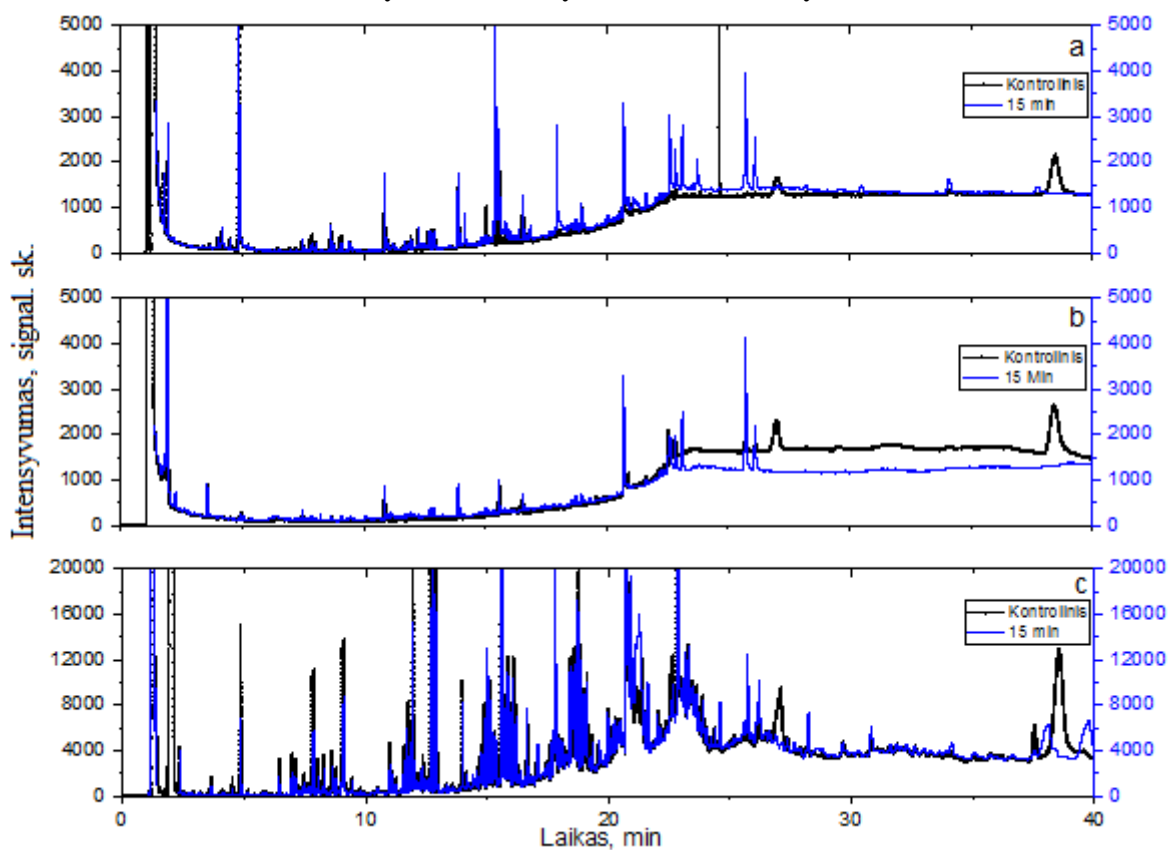
Paskutinis tyrimo aspektas – įvertinti šaltos plazmos poveikį pačioms vaistažolėms. Preliminariam tokių kompleksinių junginių įvertinimui dažnai naudojama kuri nors chromatografijos rūšis. Tyrimui buvo pasitelkta dujų chromatografija, kuri dažniausiai naudojama tirti lakiems organiniams junginiams. Paprastai, norint išgauti augalinės kilmės žaliavų veikliusius komponentus, atliekamos klasikinės ekstrakcijos procedūros. Šio darbo metu tirtos medžiagos, kurios be papildomų veiksmų pereina iš vaistažolių į organinius tirpiklius – metanolį, acetoną ir chloroformą. Trijų skirtingų paveiktų ir nepaveiktų vaistažolių chromatogramos pateikiamos 13-15 paveiksluose.



**13 pav.** Jonažolės chromatogramos prieš ir po poveikio šalta plazma naudojant skirtingą tirpiklį: a – acetoną, b – metanolį ir c – chloroformą.



**14 pav.** Ramunės chromatogramos prieš ir po poveikio šalta plazma naudojant skirtingą tirpiklį: a – acetoną, b – metanolį ir c – chloroformą.



**15 pav.** Ugniažolės chromatogramos prieš ir po poveikio šalta plazma naudojant skirtingą tirpiklį: a – acetoną, b – metanolį ir c – chloroformą.

Palyginus gautas chromatogramas matoma, kad naudojant chloroformą kaip tirpiklį, stebima daugiausiai ir didesnio intensyvumo smailių, kadangi jame gali ekstrahuotis nepoliniai ir vidutiniškai poliniai junginiai. Tai rodo, jog būtent šis tirpiklis ištirpina daugiausiai junginių, esančių vaistažolėse. Tiesa, teigti, kad tai geriausias tirpiklis nebūtų teisinga, nes kiti naudoti tirpikliai galimai išekstrahuoja kitus specifinius junginius, tad tik identifikavus pačius junginius būtų galima daryti konkretesnes išvadas. Kai kuriuose mėginiuose po 30 minutės stebimas naujų smailių atsiradimas vaistažolių, paveiktų šalta plazma, chromatogramose, tačiau tai gali būti pačio taikomo metodo triukšmai. Ugniažolės mėginiuos stebėtas atvirkščias poveikis – šalta plazma neveiktose vaistažolėse matyti aiški smailė kažkur ties 38 minute, o po 15 minučių poveikio smailių jau nematyti. Ramunės acetone, metanolyje ir chloroforme chromatogramose dalies smailių intensyvumas reikšmingai skiriasi visame ruože, tačiau norint nustatyti ar pokytis lemtas mėginių nehomogeniškumo, ar pakito junginių koncentracija dėl poveikio šalta plazma, reikalingi papildomi tyrimai. Literatūroje gausu pavyzdžių, kai pasitelkus aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją atliekama išsami tokio pobūdžio junginių analizė.



## IŠVADOS

1. Tirtose vaistažolėse nustatytas didelis užterštumas eukariotiniais ir prokariotiniais mikroorganizmais.
2. Nustatyta vaistažolių mikrobiotos kompozicija: 10% eukariotų ir 90% prokariotų.
3. Atlikus sekoskaitą identifikuotos trijų potencialiai patogeniškų organizmų gentys: *Bacillus spp.*, *Pantotea spp.*, *Rhodotorula spp.*
4. Optimalūs elektrinio lauko parametrai mikroorganizmų inaktyvacijai yra: 17 kV/cm įtampos, 1 ms trukmės 5 impulsai. Tačiau metodas tinkamas tik izoliuotų mikroorganizmų inaktyvavimui.
5. Šaltos plazmos didžiausias poveikis nustatytas paveikus vaistažoles 15 min, KfV skaičius sumažėjo 99%.
6. Šaltos plazmos poveikis išlieka 5 mėnesius.
7. Stebimi tam tikri pokyčiai, lyginant nepaveiktų ir paveiktų šalta plazma vaistažolių chromatogramas, tačiau reikalingi papildomi tyrimai, norint nustatyti to priežastis.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Posadzki, Paul, et al. "Contamination and Adulteration of Herbal Medicinal Products (HMPs): an Overview of Systematic Reviews." *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 69, no. 3, 2012, pp. 295–307.
2. Kosalec, Ivan, et al. "Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products." *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 60, no. 4, Jan. 2009.
3. Vidović, Senka, et al. "Screening of Changes in Content of Health Benefit Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Status of Medicinal Plants during the Production of Herbal Filter Tea." *Industrial Crops and Products*, vol. 50, 2013, pp. 338–345.
4. Sanzini, Elisabetta, et al. "Quality Control of Plant Food Supplements." *Food & Function*, vol. 2, no. 12, 2011, p. 740.
5. Rizzo, Inés, et al. "Assessment of Toxigenic Fungi on Argentinean Medicinal Herbs." *Microbiological Research*, vol. 159, no. 2, 2004, pp. 113–120.
6. Kim, Mi-Jung, et al. "Effects of Gamma Irradiation on Microbial Contamination and Extraction Yields of Korean Medicinal Herbs." *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 57, no. 1, 2000, pp. 55–58.
7. Kumar, Sanjeev, et al. "Microbial Decontamination of Medicinally Important Herbals Using Gamma Radiation and Their Biochemical Characterisation." *Food Chemistry*, vol. 119, no. 1, 2010, pp. 328–335.
8. Mitra, A. et al., 2013. Inactivation of Surface-Borne Microorganisms and Increased Germination of Seed Specimen by Cold Atmospheric Plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), pp.645–653.
9. Abbot, N.C., White, A.R., Ernst, E., 1996. Complementary medicine. *Nature* 381, 361.
10. World Health Organization (WHO). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residue. Geneva: WHO; 2007.
11. Kneifel, W., Czech, E., & Kopp, B. (2002). Microbial Contamination of Medicinal Plants - A Review\*. *Planta Medica*, 68(1), 5–15.
12. Czech, E., Kneifel, W., & Kopp, B. (2001). Microbiological Status of Commercially Available Medicinal Herbal Drugs - A Screening Study. *Planta Medica*, 67 (3), 263–269.
13. Koch, J., Schrauder, A., Alpers, K., Werber, D., Frank, C., Prager, R., ... Stark, K. (2005). Salmonella Agona Outbreak from Contaminated Aniseed, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 11(7), 1124–1127.
14. Busse, W. (2000). The Significance of Quality for Efficacy and Safety of Herbal Medicinal Products. *Drug Information Journal*, 34(1), 15–23.
15. Singh, P., Srivastava, B., Kumar, A. and Dubey, N. K., *Microb. Ecol.*, 2008, 56, 555–560.
16. Bunn, E., & Tan, B. (n.d.). Microbial Contaminants in Plant Tissue Culture Propagation. *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*, 307–335.
17. Dubey, N. & Kumar, Ashok & Singh, Priyanka & Shukla, Ravindra. (2008). Microbial contamination of raw materials: A major reason for the decline of India's share in the global herbal market. *Current Science*. 95. 717-718.
18. Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 427–451.
19. Holvoet, K., Sampers, I., Seynaeve, M., Jacxsens, L., & Uyttendaele, M. (2014). Agricultural and Management Practices and Bacterial Contamination in Greenhouse versus Open



Field Lettuce Production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(1), 32–63.

20. Maffei, D. F., Batalha, E. Y., Landgraf, M., Schaffner, D. W., & Franco, B. D. G. M. (2016). Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 99–105.

21. Tripathy, V., Basak, B. B., Varghese, T. S., & Saha, A. (2015). Residues and contaminants in medicinal herbs—A review. *Phytochemistry Letters*, 14, 67–78.

22. Kolb N. 1999. Microbiological status of untreated herbal materials. *Deutsch Lebensm-Rundsch* 95: 263–269.

23. Sagoo, S., Little, C., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., Mclauchlin, J., ... Therellfall, E. (2009). Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 26(1), 39–43.

24. Lisboa, C. F. (2018). Influence of Storage Conditions on Quality Attributes of Medicinal Plants. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(4).

25. Gonda, S., Tóth, L., Gyémánt, G., Braun, M., Emri, T., & Vasas, G. (2011). Effect of High Relative Humidity on Dried *Plantago lanceolata* L. Leaves during Long-term Storage: Effects on Chemical Composition, Colour and Microbiological Quality. *Phytochemical Analysis*, 23(1), 88–93.

26. Stevic, T., Pavlovic, S., Stankovic, S., & Savikin, K. (2012). Pathogenic microorganisms of medicinal herbal drugs. *Arhiv Za Bioloske Nauke*, 64(1), 49–58.

27. Halt, M. (1998). *European Journal of Epidemiology*, 14(3), 269–274.

28. Wilson, C., Dettenkofer, M., Jonas, D., & Daschner, F. D. (2004). Pathogen growth in herbal teas used in clinical settings: a possible source of nosocomial infection? *American Journal of Infection Control*, 32(2), 117–119.

29. Brown, J. C., & Jiang, X. (2008). Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria in Herbal Products. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1486–1490.

30. Wesley, F., Rourke, B., & Darbishire, O. (1965). The Formation of Persistent Toxic Chlorohydrins in Foodstuffs by Fumigation with Ethylene Oxide and with Propylene Oxide. *Journal of Food Science*, 30(6), 1037–1042.

31. Moerman, F., & Mager, K. (2016). Cleaning and Disinfection in Dry Food Processing Facilities. *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*, 521–554.

32. N Kaliyan, R V Morey, W F Wilcke, Alagusundaram K., & Gayathri P. (2007). Applications of Carbon Dioxide in Food and Processing Industries: Current Status and Future Thrusts. 2007 Minneapolis, Minnesota, June 17-20, 2007.

33. Goodburn, C., & Wallace, C. A. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, 32(2), 418–427.

34. Klämpfl, T. G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y.-F., Zimmermann, J. L., Stolz, W., ... Schmidt, H.-U. (2012). Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5077–5082.

35. Azharonok, V. V., Krat'ko, L. E., Nekrashevich, Y. I., Filatova, I. I., Mel'nikova, L. A., Dudchik, N. V., ... Bologa, M. K. (2009). Bactericidal action of the plasma of high-frequency capacitive and barrier discharges on microorganisms. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 82(3), 419–426.

36. Jiang, J., Lu, Y., Li, J., Li, L., He, X., Shao, H., & Dong, Y. (2014). Effect of Seed Treatment by Cold Plasma on the Resistance of Tomato to *Ralstonia solanacearum* (Bacterial Wilt). *PLoS ONE*, 9(5), e97753.

37. Golberg, A., Belkin, M., & Rubinsky, B. (2009). Irreversible Electroporation for Microbial Control of Drugs in Solution. *AAPS PharmSciTech*, 10(3), 881–886.
38. Lelieveld, H. L. M., Notermans Servé, & H., D. H. S. W. (2007). *Food preservation by pulsed electric fields from research to application*. Cambridge, England: Woodhead Publishing.
39. Grainys, A., Novickij, V., & Novickij, J. (2015). High-power bipolar multilevel pulsed electroporator. *Instrumentation Science & Technology*, 44(1), 65–72.
40. Barbosa-Cánovas, G.V. & Pierson, M.D. & Zhang, Q.H. & Schaffner, Donald. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *Journal of Food Science*.
41. Putramentienė, Angelika, & Maželienė, Žaneta. (2018). *Mikrobiologijos praktikos darbai*. Kaunas: Kauno kolegijos Reklamos ir medijų centras.
42. Hugenholtz, P. (2002). *Genome Biology*, 3(2), reviews0003.1.
43. Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1–7.
44. Siwakoti, S., Sah, R., Rajbhandari, R. S., & Khanal, B. (2018). *Pantoea agglomerans* Infections in Children: Report of Two Cases. *Case Reports in Pediatrics*, 2018, 1–3.
45. Walterson, A. M., & Stavriniades, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968–984.
46. Thwaite, J. E., & Atkins, H. S. (2012). *Bacillus*. *Medical Microbiology*, 237–244.
47. Ben Khedher, S., Kilani-Feki, O., Dammak, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., & Tounsi, S. (2015). Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies*, 338(12), 784–792.
48. Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H. et al. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci Rep* 6, 19778 (2016).
49. Koga, K., Thapanut, S., Amano, T., Seo, H., Itagaki, N., Hayashi, N., & Shiratani, M. (2015). Simple method of improving harvest by nonthermal air plasma irradiation of seeds of *Arabidopsis thaliana*(L.). *Applied Physics Express*, 9(1), 016201.

## SANTRAUKA

### VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

ROBERTA POVILAVIČIŪTĖ

#### **Vaistažolių mikrobiologinės taršos identifikavimas ir mažinimas**

Vaistažolės yra neatsiejama kultūros ir tradicijų dalis. Fitoterapinius tikslais augalinės kilmės žaliavos ir šiomis dienomis yra naudojamos prevenciniais ar gydomaisiais tikslais, todėl labai svarbu užtikrinti jų kokybę.

Atliktas tyrimas orientuojasi į biologinę komerciškai prieinamų vaistažolių kokybę. Tokio pobūdžio žaliavos ir produktai neišvengiamai turi tam tikrą mikrobiologinę užterštumą ir jis yra reglamentuojamas Europos Sąjungoje. Tačiau turint omenyje naudojimo pobūdį reikia atsižvelgti į tikslingą auditoriją. Dažniausiai tai būna žmonės, kurių imuninė sistema patiria didelį krūvį ir bet koks perteklinis mikroorganizmų kiekis gali sukelti infekciją, kuri gali lemti stiprius sveikatos sutrikimus.

Vaistažolėse aptikta įvairių organizmų – bakterijų, mielių ir grybų. Tyrimo sąlygomis tarp išskirtų organizmų vyravo bakterijos – 90 %, tačiau aptikta ir grybinių kultūrų. Identifikavus keletą atsitiktinai pasirinktų kultūrų nustatyta, kad jos priklauso gentims, kuriose yra potencialiai yra patogeniškų rūšių.

Darbo metu arbatžolių dezinfekcija atlikta fizikiniais metodais. Iš vaistažolių išskirti organizmai sėkmingai inaktyvuojami veikiant labai trumpais (mikrosekundžių trukmės) stipraus elektrinio lauko impulsais. Išbandytas alternatyvus metodas – sterilinimas šalta plazma. Šis būdas yra labai patogus naudoti vaistažolėms. Nustatytos optimalios veikimo sąlygos – 15 min vidutiniu režimu, kurios sumažina taršą net iki 99 % išlieka efektyvios bent 5 mėnesius.

## SUMMARY

### VILNIUS UNIVERSITY FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

ROBERTA POVILAVIČIŪTĖ

#### **Identification and Reduction of Microbiological Contaminants in Herbs**

In some cultures and their traditions, herbs play an important role. Until today it is used for therapeutic or medicine purpose, thus it is very important to ensure quality.

The focus of the study is biological quality of some commercially available herbs. This type of raw material and the final product has microbiological contamination which is regulated in the European Union. However, given the nature of the use, the target audience needs to be considered. Usually it is people with weak immune system. Any kind of microorganism excess might lead to infection or severe health problems.

Various organisms – bacteria, yeasts and fungi – have been found in tested herbs. Under the conditions of the study, bacteria predominated among the isolated organisms – 90 %, although fungal cultures were also detected. The identification of several randomly selected cultures revealed that they belong to the genus which has potentially pathogenic species.

During the work disinfection of the herbs was performed by physical methods. Isolated organisms are successfully inactivated by very short (microsecond) pulses of a strong electric field. An alternative method – cold plasma – was used. This technique is very convenient to use for herbs. Pollution was reduced by up to 99% with optimal operating conditions – 15 minutes of treatment with plasma cleaner medium power regime. The result seems to remain for at least 5 months.