

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

GUSTĖ KUNIGĖLYTĖ

(Mikrobiologijos studijų programa)

Magistro baigiamasis darbas

**ANTIMIKROBINĖS FOTODINAMINĖS TERAPIJOS TAIKYMAS  
TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ *PARAGEOBACILLUS TOEBII* INAKTYVACIJAI**

Studentas \_\_\_\_\_

(parašas)

Darbo vadovas: dr. Arnoldas Kaunietis

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Vilnius, 2024

# TURINYS

TURINYS.....	2
SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS.....	5
1. Literatūros apžvalga.....	7
1.1. Fotodinaminė terapija.....	7
1.1.1. Fotosensibilizatoriai .....	9
1.1.2. Chlorofilas ir chlorofilinas .....	11
1.1.3. Riboflavinai .....	12
1.1.4. Kurkuminas .....	13
1.2. Bakteriocinai .....	15
1.3. Termofilinės bakterijos .....	18
1.3.1. (Para)geobacillus.....	18
2. Medžiagos ir metodai.....	20
2.1. Darbe naudotos medžiagos ir prietaisai .....	20
2.1.1. Darbe naudotos bakterijų kultūros .....	20
2.1.2. Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės ir medžiagos .....	20
2.1.3. Darbe naudoti prietaisai .....	20
2.2. Metodai.....	21
2.2.1. Bakterijų kultivavimas .....	21
2.2.2. Nizino minimalios inhibicinės koncentracijos (MIK) nustatymas.....	21
2.2.3. Ląstelių paruošimas antimikrobinės fotodinaminės terapijos eksperimentui .....	22
2.2.4. Fotodinaminė terapija.....	23
3. Rezultatai ir jų aptarimas .....	25
3.1. aFDT poveikis <i>P. toebii</i> ląstelėms.....	25

3.1.1. Chlorofilino poveikis <i>P. toebii</i> ląstelėms .....	26
3.1.2. Riboflavino poveikis <i>P. toebii</i> ląstelėms.....	28
3.1.3. Kurkumino poveikis <i>P. toebii</i> ląstelėms .....	30
3.1.4. Sinergistinis nizino ir aFDT poveikis <i>P. toebii</i> ląstelėms .....	31
IŠVADOS.....	36
Santrauka.....	37
Summary .....	38
LITERATŪROS SARAŠAS.....	39
PADĖKA.....	44

## SANTRUMPOS

aFDT – antimikrobinė fotodinaminė terapija

FS – fotosensibilizatorius

CHL – chlorofilinas

RF – ribiflavinai

$h\nu$  – šviesos energija

ROS – reaktyvios deguonies formos

# IVADAS

Maisto sauga yra tapusi svarbia pasauline problema. Be tiesioginio pavojaus žmonių sveikatai, kyla sunkiai išsprendžiamų problemų, kurios liečia maisto perdirbimo įmonių infrastruktūrą ir veiklos vientisumą. Ilgalaikės pasekmės apima visus maisto produktų tiekimo grandinės aspektus – nuo gamybos iki vartojimo.

Termofilinės sporas formuojančios bakterijos yra daugiausiai sutinkamos maisto perdirbimo įmonėse. Šias bakterijas sunku pašalinti dėl jų plataus diapazono augimo temperatūros ir formuojamų sporų, kurios gali išgyventi terminę sterilizaciją, sukelia ekonominių nuostolių ir gali kelti pavojų maisto kokybei. Termofilinių bakterijų formuojamos bioplėvelės kelia dar didesnių problemų, nes gali susidaryti ant nerūdijančio plieno paviršių, kurie yra aktualūs pieno perdirbimo linijose, o tai kelia pavojų produktams ir įrangai, gamybos pajėgumui bei padidina infekcijų riziką. (KILIC, 2020; Wang *et al.*, 2021)

Terminis apdorojimas yra daugiausia naudojama procedūra maistą užtešiančių bakterijų šalinimui pramonėje, tačiau per tokios procedūros sukelia nepageidautiną produktų maistinę, organoleptinę ir funkcinę kokybę, todėl pastoviai ieškoma efektyvių alternatyvų. (Liu *et al.*, 2023) Vienas iš potencialių būdų mikrobų inaktyvacijai – tai antimikrobinė fotodinaminė terapija (aFDT). Tai yra šviesa ir medžiagomis fotosensibilizatoriais paremta intervencija, kurios metu susidariusios reaktyvios deguonies formos inaktyvuoja gyvas ląsteles. Toks mikroorganizmų naikinimo būdas yra žinomas kaip saugus, nes naudojamos medžiagos nekenkia žmonėms ir gyvūnams. (do Prado-Silva *et al.*, 2022)

Atlikus literatūros analizę nebuvo rasta informacijos apie antimikrobinės fotodinaminės terapijos taikymą termofilinėms bakterijoms, todėl tai bus pirmasis darbas, kur vertinamas aFDT poveikis *Parageobacillus toebii* ląstelėms.

## **Darbo tikslas:**

Ištirti termofilinių bakterijų *Parageobacillus toebii* jautrumą fotodinaminei terapijai pasitelkiant fotosensibilizatorius chlorofiliną, riboflaviną ir kurkuminą bei įvertinti jų sinergistinį poveikį kartu su bakteriocinu nizinu.

**Uždaviniai:**

1. Ivertinti 440 nm ir 402 nm bangos ilgių šviesos bei fotosensibilizatorių poveikį *P. toebii* planktoninių ląstelių gyvybingumui;
2. Nustatyti fotodinaminės terapijos efektyvumą naudojant chlorofiliną, riboflaviną ir kurkuminą ir įvertinti jų optimalias veikimo koncentracijas prieš *P. toebii* planktonines ląsteles;
3. Taikant fotodinaminę terapiją įvertinti sinergistinį fotosensibilizatorių: chlorofilino, riboflavino ir kurkumino, bei bakteriocino nizino antimikrobinį poveikį *P. toebii* planktoninėms ląstelėms.

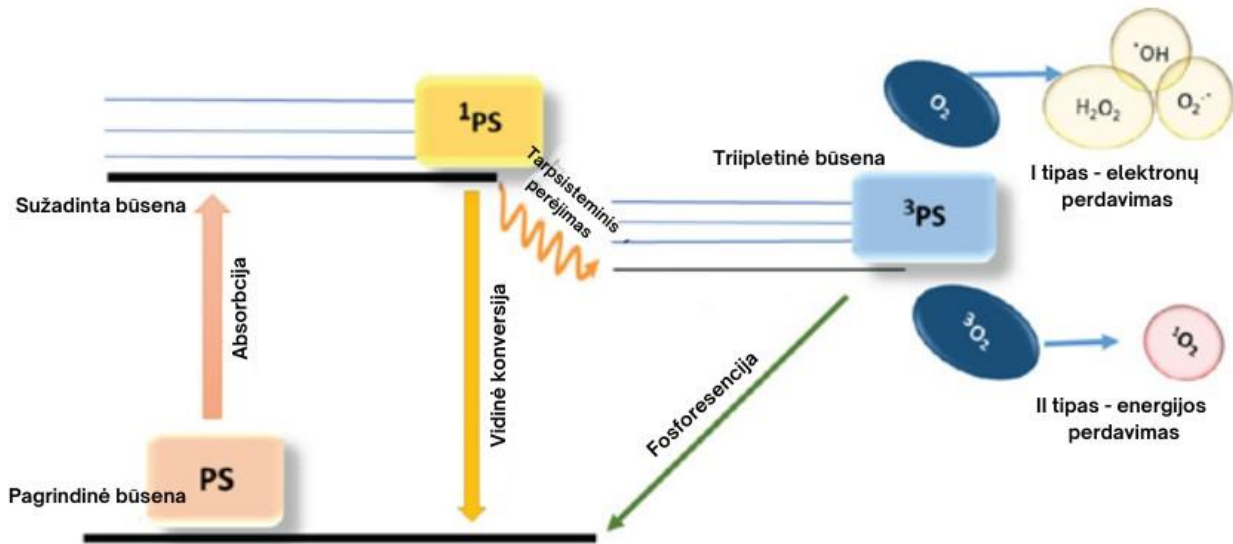
# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1. Fotodinaminė terapija

Fotodinaminė terapija (FDT) – tai šviesai jautraus junginio – fotosensibilizatoriaus (FS) bei šviesos sąveika. FS sugeria atitinkamo bangos ilgio šviesos energiją, perduoda šią energiją substratui, kad susidarytų stipriai oksiduojančios reaktyvios deguonies formos (ROS), kurios inaktyvuoja kenksmingas ląsteles. (Sun *et al.*, 2018) FDT yra plačiai taikoma vėžinių bei kitų susirgimų, sukeltų anormalių ląstelių, gydymui, tačiau kuo toliau tuo labiau yra naudojama prieš mikroorganizmus, įskaitant pirmuonis, bakterijas, virusus ir grybus. Tokia FDT dar vadinama antimikrobine fotodinamine terapija (aFDT). (Zhu *et al.*, 2021) aFDT susilaukė didelio dėmesio medicinos srityje, kadangi fotosensibilizatoriai gali būti naudojami vietiškai, dėl to nepažeidžia viso organizmo, kaip antibiotikai. Dėl šios priežasties aFDT gali būti kartojama procedūra, gaunamas didesnis bakteriocidinis veikimas ir sumažinama šalutinių poveikių tikimybė. Šie privalumai labai pasiteisino gydant dantų infekcijas. (Hou *et al.*, 2022) Taip pat dėl mažo mikroorganizmų atsparumo šiai terapijai, ji plačiai naudojama ir aplinkosaugos srityse, tačiau paskutiniu metu mokslo srityje plačiai tyrinėjama galimybė naudoti aFDT maisto produktų nukenksminimui. (Zhu *et al.*, 2021)

Fotodinaminės terapijos veikimo mechanizmas gali būti trumpai apibūdinamas kaip atitinkamo bangos ilgio regimosios šviesos fotonų sąveika su viduląstelinėmis fotosensibilizatoriaus molekulėmis. Ši sąveika sukelia oksidacinį stresą ląstelėms. FDT metu, FS molekulei sugėrus šviesą, susidaro singletinė sužadintoji būseną ( $^1PS$ ), kuri toliau gali patirti kelias skirtingas permainas – grįžti į pagrindinę būseną arba pereiti į tripletinę būseną ( $^3PS$ ) – šis procesas dar vadinamas tarpsisteminiu perėjimu. Grįždama į savo pagrindinę būseną, molekulė išlaisvina energiją šviesos pavidalu ir sudaro fluorescencijos reiškinių, arba sąveikauja su kaimyninėmis molekulėmis ir energiją praranda šilumos pavidalu. Pereidama į tripletinę būseną, molekulė gali grįžti į pagrindinę būseną per fosforescenciją arba perduoti energiją atitinkamai akceptorius molekulei. Yra išskiriami du ROS tipai, kurių kiekvienas atitinka savitą FDT mechanizmą: I tipo mechanizmu laikomas procesas, kurio metu yra perduodami elektronai ir susidaro reaktyvūs radikalai ar jonai, pavyzdžiui, vandenilio peroksidas, superoksido anijonas, hidroksido radikalai ar singletinis deguonis. II tipo mechanizmo metu tripletinio FS energija yra perduodama deguonies molekulei ir susidaro reaktyvus singletinio deguonies ( $^1O_2$ ) radikalas, kuris atlieka pagrindinį vaidmenį fotodinaminiuose procesuose. Šios reakcijos metu FS molekulė yra nesunaikinama, o

grąžinama į pagrindinę būseną ir dalyvauja kitame reakcijos cikle. (Lyon *et al.*, 2011; Luksiene and Brovko, 2013; Niculescu and Grumezescu, 2021) Vienos FS molekulės gyvavimo trukmės užtenka pagaminti dar tūkstančiui  $^1\text{O}_2$  molekulių. (Cieplik *et al.*, 2018)

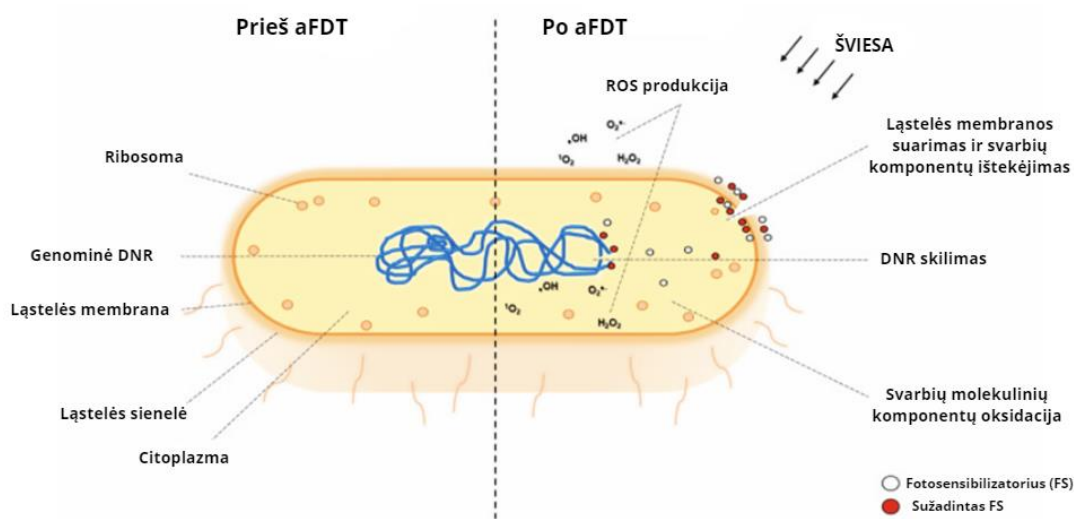


**1 pav.** aFDT I ir II tipo mechanizmų procesų iliustracija. PS – pagrindinės būsenos fotosensibilizatorius;  $^1\text{PS}$  – FS sužadintoje būsenoje;  $^3\text{PS}$  – FS tripletinėje būsenoje; Reaktyviosios deguonies formos  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}_2$ ;  $^1\text{O}_2$  – singletinis deguonis. (Ghorbani *et al.*, 2018) Susidarę aFDT produktai veikia ląsteles ir jas inaktyvuoja.

Iš vienos pusės yra žinoma, jog reaktyvios deguonies formos yra reikalingos fiziologinėms ląstelių funkcijos palaikyti, dalyvauja signalų perdavime, tačiau taip pat yra siejamos ir su oksidaciniu stresu. (Martins Antunes de Melo *et al.*, 2021) Fotodinaminis poveikis ląstelėms gali sukelti apoptozę, nekrozę ir autofagiją, o tai baigiasi ląstelių sunaikinimu ir mirtimi. (Sun *et al.*, 2018) Dėl didelio cheminio aktyvumo, aFDT reakcijų metų susidarantys ROS sąveikauja su ląstelių baltymais, lipidais ir nekleorūgštimis. (Zhu *et al.*, 2021) FS molekulės, taikydamos į ląstelę gali pažeisti DNR ir RNR, sukeldamos plazmidžių skilimą. Tačiau daugiausia yra pripažinta, jog aFDT metu yra pažeidžiamas membranos pralaidumas, sukeliama baltymų pokyčiai, sutrinka ląstelės sienelės sintezė ir prarandami kalio jonai, o tai daro didžiausią įtaką ląstelių apoptozei. (Lin *et al.*, 2019; Polat and Kang, 2021) Nors dažniausiai pažeidžiami membranų lipidai, baltymai taip pat yra vieni iš pagrindinių pažeidžiamų taikinių



sąveikoje su  $^1\text{O}_2$ , todėl galima teigti, kad baltymų modifikacijos aFDT metu atlieka svarbų vaidmenį mikrobo nukenksminime. (do Prado-Silva *et al.*, 2022)



**2 pav.** Bakterijos iliustracija prieš ir po aFDT taikymo. (do Prado-Silva *et al.*, 2022)

aFDT yra žymiai veiksmingesnė prieš gramteigiamas bakterijas, nei prieš gramneigiamas. Tai lemia gramteigiamas bakterijas supanti pralaidi sienelė, kuri sudaryta iš porėto peptidoglikano ir lipoteichoinių rūgščių sluoksnio pro kurį lengviau gali prasiskverbti FS todėl į ląstelę patenka  $\text{O}_2$  bei ROS. Priešingai, gramneigiamos bakterijos turi tvirtą barjerą dėl savo stiprios struktūrinės organizacijos – šių bakterijų sienelę sudaro ir peptidoglikano sluoksnis, ir išorinis fosfolipidų dvisluoksnis. Dėl šių savybių, gramneigiamos bakterijos pasižymi žymiai mažesniu jautrumu aFDT. (de Melo *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2022)

### 1.1.1. Fotosensibilizatoriai

Fotosensibilizatorius – tai cheminė medžiaga, kuri gali reaguoti su šviesa per fotochemines reakcijas ir perduoda energiją tam tikroms molekulėms, kurios sukelia antimikrobines sąveikas. Jų įvairovė yra labai didelė, todėl labai svarbu atsižvelgti į fotofizikines savybes prieš pasirenkant tinkamą FS savo tyrimui. (Luksiene and Brovko, 2013) Jau kelis dešimtmečius mokslininkai bando didinti FS įvairovę keisdami chemines jų struktūras, ir taip kurdami naujas medžiagas aFDT tobulinimui. (Cieplik

*et al.*, 2018) Šiuo metu pagal savo struktūrą ir fizikines savybes yra suskirstytos keturios pagrindinės FS klasės (Ghorbani *et al.*, 2018) – fenotiazinai, nano struktūros, tetra-pirola struktūros ir natūralūs FS.

Fenotiazinai buvo patys pirmieji FS. Jiems būdingas anijoninis krūvis, taip pat yra potencialūs efliuksų pompų substratai (Martins Antunes de Melo *et al.*, 2021), dėl to jie veiksmingai veikia daugelį bakterijų. (Ghorbani *et al.*, 2018) Populiarus fenotiazinų klasei priklausantis FS metileno mėlynasis (MB) yra efektyviausias ties 660 nm ilgio bangomis. Šis FS yra patvirtintas intraveniniam naudojimui maisto ir vaistų administracijos ir yra perspektyvi medžiaga vėžio ląstelių fotodinaminei terapijai. MB pasižymi stipria singletinio deguonies gamyba (Ziental *et al.*, 2021) ir taip pat yra patvirtinta, jog gerai baktericidiškai veikia gramteigiamas bei gramneigiamas bakterijas. (Fontana *et al.*, 2009)

Tetrapiolai yra viena iš didžiausių FS klasių. Daugiausia FDT naudojami yra porforinai, kurie sulaukė daug dėmesio dėl savo gebėjimo greitai sugeneruoti ROS. Porforinas šviesą sugeria ties 402-550 nm ilgio bangomis. (Ghorbani *et al.*, 2018) Yra žinoma, jog daugelis bakterijų pasižymi gebėjimu pačios kaupti daug endogeninių porforinų, dėl to žūsta tik paveikus šviesa *in vitro*. (Cieplik *et al.*, 2018) Taip pat tetrapiolams priskiriamas plačiai naudojami chlorinai, kurių struktūra apibūdinama kaip porfirino dariniai su papildomais vandenilio atomais pirola žiede. (Polat and Kang, 2021) Šie FS turi didelę absorbciją – tarp 650 nm ir 700 nm ir generuoja daug singletinio deguonies, tačiau pasižymi labai silpnu tirpumu vandenyje ir nestabilumu. Populiariausias iš chlorinų yra chlorinas e6, kuris gali būti sužadinamas veikiant 660 – 670 nm ilgio bangomis. (Ziental *et al.*, 2021)

Nanodalelės buvo sukurtos patobulinti FS molekulių įsiskverbimo procesui. Tokių nanodalelių kūrimui dažniausiai yra naudojamos liposomos, micelės ar nanoemulsijos, kurios padeda hidrofobiniams FS patekti į ląstelę ir agreguotis vandeninėje aplinkoje. (Niculescu and Grumezescu, 2021) Tai yra mažos, specifinės dalelės, nuo 1 iki 100 nm dydžio. Tokias daleles galima lengvai modifikuoti pagal norimas savybes. (Ziental *et al.*, 2021) Fulerenai – tai daugiausia naudojamas nanodalelėms priskiriamas FS. Tai tuščiavidurės sferinės, elipsoidinės, cilindrinės arba vamzdinės formos molekulės, sudarytos iš anglies atomų. Pastaruoju metu pradėti plačiai naudoti fulerenai pasižymi universaliu funkcionalumu, fotostabilumu ir didelio kiekio ROS bei  $^1\text{O}_2$  kiekio gamyba. Taip pat žinoma, jog fulerenų produkuojami laisvieji radikalai yra didesnio toksinio poveikio, nei kiti FS, dėl to pasižymi didesniu aktyvumą prieš gramneigiamas bakterijas. (Hou *et al.*, 2022)

Natūralūs FS yra išgaunami iš augalų, grybų ir bakterijų, tai gali būti tiek natūralūs junginiai, tiek ekstraktai. (Polat and Kang, 2021) Pirmieji žinomi ir terapijoje pradėti naudoti natūralūs FS žinomi kaip raudonojo antrachinono dariniai, hipericinas ir pseudohypericinas. (Seidi Damyeh *et al.*, 2020)

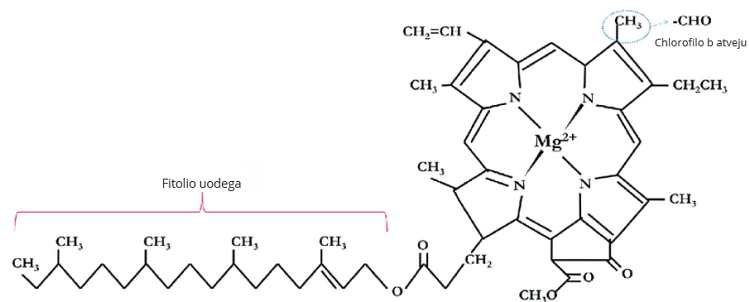
Hipericinas yra gaunamas iš augalo *Hypericum perforatum*, dar kitaip žinomo kaip Jonažolė. Yra daug žinoma apie šio augalo išsiskiriančias gydomąsias savybes, taip pat turi antivirusinį, antidepresinį, antibakterinį ir priešvėžinį poveikį. Dėl šių savybių pradėta tyrinėti jo, kaip fotosensibilizatoriaus, potencialas ir išskirtas gebėjimas inaktyvuoti gram-teigiamas bakterijas, tačiau efektyvumas prieš gram-neigiamas bakterijas yra mažas. (Ghorbani *et al.*, 2018) Problemų kelia tai, jog hipericinas pasižymi dideliu lipopoliškumu ir prastu tirpumu vandenyje, todėl yra aktyviai bandoma šiuos FS įterpti į liposomas, taip padidinant jų fotodinaminį efektyvumą prieš bakterijas. (Plenagl *et al.*, 2018)

### 1.1.2. Chlorofilas ir chlorofilinas

Chlorofilas, daugiausia žinomas kaip aukštesniųjų augalų, dumblių ir bakterijų fitocheminis pigmentas. Chlorofilas a ir b yra du plačiausiai ištirti chlorofilo tipai, kurie skiriasi savo šoninių grupių padėtimi (3 pav.). (Chaturvedi, Singh and Singh, 2019) Chlorofilo dariniai yra labai plačiai naudojami kaip maistiniai dažnai, taip pat yra pradėti naudoti ir kaip fotosensibilizatoriai. (Buchovec *et al.*, 2020)

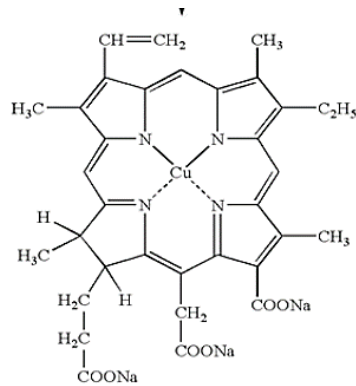
Chlorofilinas (CHL) – tai vandenyje tirpus, pusiau sintetinis pigmento chlorofilo darinys. CHL sulaukė didelio dėmesio kaip potenciali priešvėžinė medžiaga, taip pat daug kur naudojamas kaip sveikas maisto dažiklis, vario kompleksinis chlorofilinas dar kitaip žinomas kodu E141. Keletas tyrimų atskleidė ir CHL antikancerogeninį ir antimutageninį poveikį.

Pagrindinis skirtumas tarp chlorofilo ir CHL yra jų struktūra: Chlorofilą sudaro 4 pirolo azoto žiedai sujungti centriniu magnio atomu ir penktas žiedas, kuriame yra anglies atomų bei ilga fitolio uodega. (3 pav.) (Nagini, Palitti and Natarajan, 2015; Chaturvedi, Singh and Singh, 2019)



**3 pav.** Chlorofilo struktūra (Mandal and Dutta, 2020)

CHL gamybos metu magnio jonas yra pakeičiamas kitu metalu, fitolio esteriai pakeičiami natriu, todėl jis tampa tirpiu vandenyje, taip pat pašalinama fitolio uodega. (pav. 3) Dėl šių pakitimų, CHL tampa stabilesnis nei chlorofilas. (Chaturvedi, Singh and Singh, 2019)



**4 pav.** Chlorofilino natrio vario druskos struktūra (Chaturvedi, Singh and Singh, 2019)

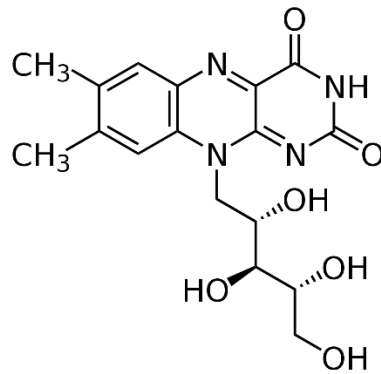
CHL, paveikus šviesa, yra greitai suyraanti medžiaga, dėl to neformuoja jokių toksiškų šalutinių produktų, o tai užtikrina šios medžiagos ekologiškumą ir saugumą.

### 1.1.3. Riboflavinai

Junginiai flavinai yra dažnai sutinkami įvairiausiuose biologiniuose procesuose. Žymiausi šios grupės nariai – tai riboflavinai (B2), flavino mononukleotidas (FMN) ir flavino adenino dinukleotidas (FAD). Pastarieji du yra gerai žinomi kaip ląstelėse vykstančių medžiagų apykaitos procesų dalyviai. (Insińska-Rak and Sikorski, 2014) Riboflavinai, dar kitaip vadinami vitaminu B2, yra natūraliai randami įvairiuose maisto produktuose, taip pat jo gausu fermentuotuose gėrimuose. Didelis riboflavino kiekis piene, sūriuose ir aluje yra siejamas su kokybės pablogėjimu šiuos produktus veikiant šviesai, nes tai gali būti fotosensibilizacijos rezultatas. (Cardoso, Libardi and Skibsted, 2012) Šis vitaminas yra naudojamas kaip maisto papildas, o taip pat pasižymi fotodinaminėmis savybėmis. (Etemadi *et al.*, 2021)

Riboflavinai ir jo dariniai kaip fotosensibilizatoriai yra naudojami jau senai, daug tyrimų yra taikomas antivirusinei ir antibakterinei dezinfekcijai (Pogorelaya, Martynov and Romanova, 2020) Natūraliai audiniuose esančio riboflavino yra per mažai, kad jis sukeltų fotocheminius procesus ir kenktų ląstelėms, tačiau atliekant tyrimus *in vivo* ir *in vitro* ir didinant koncentracijas pastebėta riboflavino

gebėjimas gaminti didelius deguonies radikalų kiekius, o tai sukelia įvairių ląstelei reikalingų medžiagų oksidaciją. Tai labai pasiteisino naudojant riboflaviną kaip potencialų priešvėžinį preparatą. (Insińska-Rak and Sikorski, 2014)



**5 pav.** Riboflavino struktūra (Pogorelaya, Martynov and Romanova, 2020)

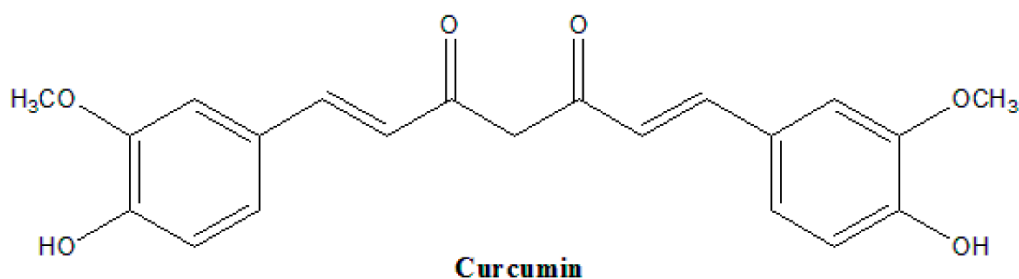
Riboflaviną ir jo darinius pasižymi efektyviu fluorescencijos produktyvumu ir to pasekoje produkuoja daug singletinio deguonies, kai sugeria tarp 365 nm ir 445 nm ilgio bangų šviesas. Tripletinės molekulės susidarymą lemia izoaloksazino branduolys, esantis riboflavino struktūroje (5 pav.). Fotochemines reakcijas daugiausia inicijuoja izoaloksazino chromoforas. (Insińska-Rak and Sikorski, 2014)

#### 1.1.4. Kurkuminas

Kurkuminas yra riebaluose tirpstanti medžiaga, išskiriama iš *Curcuma longa* (dar žinoma kaip daržinė ciberžolė) augalo, labai paplitusi ir ilgai naudota kaip vaistinis preparatas nuo kosulio, sinusito, virškinamojo trakto uždegimo. Taip pat gerai žinomas antibakterinių, priešuždegiminių ir priešgrybelinių vaistų srityje. (Xie *et al.*, 2022)

Kurkuminas yra plačiai naudojamas fotosensibilizatoriumi, nes yra pakankamai pigus ir netoksiškas, sugeria šviesą tarp 400 nm ir 500 nm ilgio bangų. Atliekant daug tyrimų mokslininkai nustatė kurkumino kaip fotosensibilizatoriaus savybes veikiant prieš navikines ląsteles, taip pat prieš daugelį mikroorganizmų. (Zhu *et al.*, 2021) Tyrimai rodo, jog kurkuminas lengvai kaupiasi ląstelių plazminėje

ir mitochondrijų membranose ir sukelia jų skilimą. Šviečiamas mėlynąją šviesa jis geba generuoti  $^1\text{O}_2$ , veikia kaip oksidantas ir pažeidžia lipidus bei membranų baltymus, taip pat, priklausomai nuo koncentracijos, gali sukelti nekrozę ar apoptozę. (Wolnicka-Glubisz and Wisniewska-Becker, 2023) Kai kurie tyrimai nurodo kurkumino gebėjimą slopinti bakterijų kvorumo jutimo (*angl.* Quorum sensing) sistemas, dėl to užkertamas kelias bioplėvelių formavimesi. Taip pat blokuojamas citokinetinio Z žiedo susidarymas, o tai slopina bakterijų gebėjimą dalintis. (Dai *et al.*, 2022)



**6 pav.** Kurkumino struktūra (Paulraj *et al.*, 2019)

Kurkuminas chemijoje dar vadinamas diferuloimetanu. Savo struktūroje jis turi du aromatinis žiedus, kurie sujungti septynių anglies atomų jungtimi, (6 pav.) dėl kurios kurkuminas yra hidrofobiškas ir beveik visai netirpsta vandenyje, tačiau yra tirpus daugelyje organinių tirpiklių – etanolyje, dimetilsulfoksido (DMSO), metanolyje, acetone. (Paulraj *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2022). Fenolio, ketono ir metoksi grupės yra pagrindinės biologinio aktyvumo sudedamosios dalys kurkumino sudėtyje, kurios sukelia apoptozę. (Xie *et al.*, 2022)

Bendrai, antimikrobinė fotodinaminė terapija šiomis dienomis yra perspektyvus būdas kovoti su mikrobėmis infekcijomis ir išspręsti daugelį pasaulio problemų. Fotosensibilizatorių įvairovė ir universalumas pastoviai didėja ir suteikia galimybę pritaikyti vis naujas strategijas. Tolesni šios srities tobulinimai gali suteikti vilties, jog ateityje atsparumas antimikrobinėms medžiagoms bus veiksmingai valdomas.

## 1.2. Bakteriocinai

Bakteriocinai – tai bakterijų ar archėjų išskiami peptidai, kurios turi gebėjimą inaktyvuoti artimai giminingas arba tolimas rūšis. (Lahiri *et al.*, 2022) Toks antibakterinis aktyvumas prieš artimas rūšis daugiausia siejamas su bakteriocino operone koduojamu specifiniu baltymu. Bakteriocinus gali išskirti tiek gram-teigiamos, tiek gram-neigiamos bakterijos. Dauguma bakteriocinų iki šių dienų nėra nustatyti, kadangi bent po vieną išskiria beveik kiekviena bakterija. Šie baltymai yra puikus antimikrobinių junginių pasirinkimas kovojant su bakterinėmis infekcijomis - bakterijos bakteriocinams labai rėtai išsivysto atsparumą. Taip pat bakteriocinai yra labai termostabilūs, yra patvarūs įvairiose fizikinėse ir cheminėse sąlygose. Taip pat svarbu tai, jog dėl to, kaip yra gaminami bakteriocinai, jie gali būti taikomi bioinžinerijoje, siekiant padidinti jų aktyvumą prieš kenksmingas bakterijas. Bakteriocinai padeda organizmo apsaugai ir nedaro didelės žalos eukariotinėms ląstelėms. (Darbandi *et al.*, 2021) Tokios savybės labai svarbios ieškant naujų būdų spręsti su mikrobais susijusių infekcijų ir užterštumo klausimus.

Bakteriocinai yra skirstomi į tris pagrindines klases atsižvelgiant į jų biochemines savybes: I klasės bakteriocinai yra sudaryti iš maždaug 19-50 aminorūgščių, priklausomai nuo potransliacinių modifikacijų gali būti skirstomi į poklasius, kaip lantibiotikai, labirintopeptinai ir sanktibiotikai. Šiai klasei priklauso ir vienas žinomiausių bakteriocinų – nizinas. II klasę sudaro taip pat nedideli, termiškai stabilūs bakteriocinai, kurie neturi potransliacinių modifikacijų peptidinėje grandinėje. Jie taip pat gali būti skirstomi įvairius poklasius. III klasę sudaro dideli (didesni nei 30 kDa) ir termiškai nestabilūs bakteriocinai. Labiausiai išsiskiria savo gebėjimu lizuoti ląstelės sienelę. Tačiau apie šią klasę informacijos yra mažiausia, ji yra labai nedaug tiriama. Vienas iš šios klasės žinomiausių bakteriocinų yra *Eschericia coli* gaminamas kolicinas. (Kumariya *et al.*, 2019; Lahiri *et al.*, 2022)

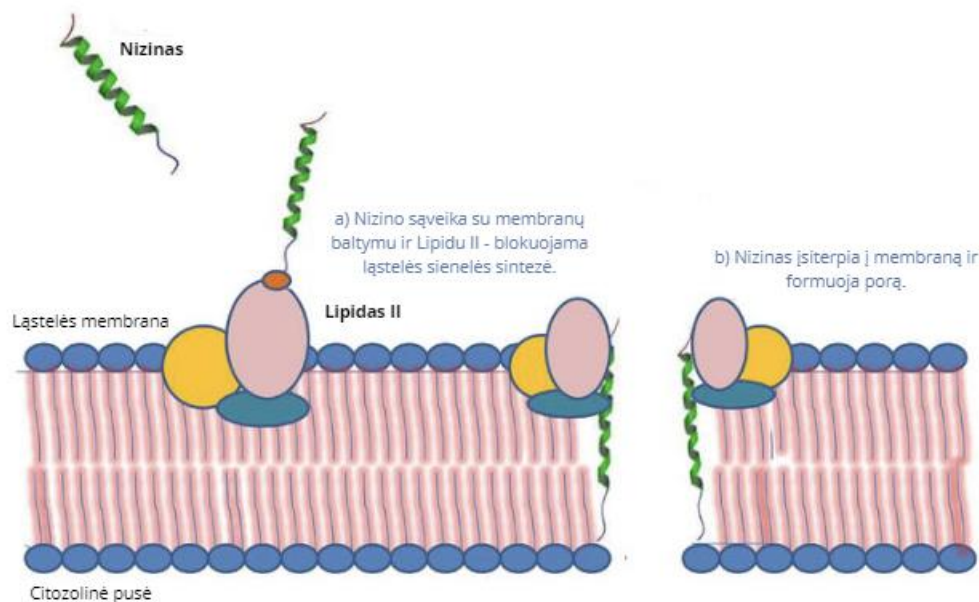
Bakteriocinus daugiausia gamina pieno rūgšties bakterijos (LAB). LAB bakteriocinai žinomi kaip endogeniniai antibiotikai ir yra nustatyta, jog slopina daugelio mikroorganizmų (pvz. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ir *Clostridium botulinum*) aktyvumą. (Santos *et al.*, 2018) LAB yra laikomos saugiausių bakteriocinų šaltiniu, nes nesukelia jokios rizikos žmonėms ir pasižymi dideliu termostabilumu. (Lahiri *et al.*, 2022) Didėjant maisto produktų gedimo dėl įvairių mikroorganizmų problemai, LAB bakteriocinai tapo potencialūs necheminiai konservantai, pvz., nizinas yra pirmasis patvirtintas bakteriocinas, naudotas lydytam sūriui konservuoti ir jau daugiau nei 50 metų yra naudojamas kaip natūralus maisto konservantas (Zimina *et al.*, 2020). Svarbu ir tai, jog nizinas yra

labai stabilus aukštoje temperatūroje, dėl to gali ilgai išsilaikyti ir neprarasti savo antimikrobinio veiksmingumo po pasterizacijos, sterilizacijos ir pan. (Santos *et al.*, 2018)

Bakteriocinų veikimo strategijų yra skirtingų, pvz. vieni inicijuoja fermentinio aktyvumo pokytį ląstelėje, slopina sporų formavimą, tačiau daugiausia paplitęs mechanizmas yra porų formavimas ląstelių membranoje. Dėl šios priežasties bakteriocinai daugiau veikia prieš gram-teigiamas bakterijas, kadangi jų ląstelę gaubia tik viena membrana. Pradinei sąsajai su ląstele bakteriocinai naudoja kelis skirtingus mechanizmus: 1) bakteriocinas prisijungia prie membranos receptoriaus molekulės arba 2) teigiamai įkrautos bakteriocino aminorūgštys susijungia su neigiamai įkrautomis ląstelės membranos fosfolipidų molekulėmis. Antruoju būdu ląstelės membranoje susidaro pora, dėl kurios iš ląstelės išteka didelės molekulės, neorganiniai fosfatai, sutrinka jonų pusiausvyra. Tokiai sąveikai nėra reikalingi jokie papildomi receptoriai ląstelės paviršiuje. (Sidhu *et al.*, 2021)

I klasei priklausantys bakteriocinai, tokie kaip nizinas, veikia dviem pagrindiniais mechanizmais, sąveikaudamas su lipidu II, ląstelių sienelės sudarančio peptidoglikano sintezės pirmtaku. Elektrostatinės sąveikos metu lipidas II padidina nizino veikimą, padeda nizino hidrofobinei daliai įsiskverbti į ląstelės membraną, taip sudarydamas poras, dėl ko stabdomi daugelis biosintezės kelių ir ląstelė miršta. Esant mažoms nizino koncentracijoms, jis prisijungia prie lipido II ir sutrikdo ląstelės sienelės formavimąsi dėl fermentų veiklos (7a pav.) Dėl to nizinas yra taip plačiai naudojamas – jis veikia ir esant labai mažom, nanomolinėm, koncentracijom. Tačiau esant didelėms koncentracijoms, nizino ir lipido II kompleksas sudaro staigiai atsirandančias poras ląstelės membranoje. (7b pav.) (Gharsallaoui *et al.*, 2016; Sidhu *et al.*, 2021)





**7 pav.** Bakteriocino nizino veikimo mechanizmai. (Sidhu et al., 2021)

Dėl savo gerų antimikrobinių savybių maisto industrijoje, nizinas yra gavęs Europos maistinio priedo numerį – E234. Šis bakteriocinas jau senai naudojamas kovoti su gram-teigiamomis, sporas formuojančiomis bakterijomis maisto pramonėje, pavyzdžiui, mėsos perdirbime, pieno produktų gamyboje ir perdirbime, jūros gėrybių produktuose, augaliniuose produktuose. Nizinas dedamas į maistą kaip vandeninis tirpalas ir maišomas su maistu jo gamybos metu. Be to, yra daug duomenų apie nizino derinimą su kitais antimikrobinės terapijos būdais. Pavyzdžiui, nizino ir antimikrobinių molekulių (lizocimas, laktatai, eteriniai aliejai) kombinacijos, taip pat nizino derinimas su kitais bakteriociniais parodė gerų rezultatų kovoje prieš mikrobus. Nizinas gali būti derinamas ir su terminiu apdorojimu, taip siekiant prailginti produktų galiojimo laiką ir naudoti mažiau karščio, taip apsaugant gerąsias maistines savybes. (Gharsallaoui *et al.*, 2016)

Pourhajibagher ir kt., 2022 atliktame tyrime, kurkumino ir nizino poli nanodalelė buvo taikoma kartu su antimikrobine fotosonodinamine terapija ir vertinamas antibioplėvelės veiksmingumas bei žaizdų gijimas pelėms prieš *Acinetobacter baumannii* infekciją. Rezultatai parodė *A.baumannii* ląstelių gyvybingumo sumažėjimą, bioplėvelių susidarymo slopinimą ir žaizdų gijimo skatinimą. (Pourhajibagher, Pourakbari and Bahador, 2022)

### 1.3. Termofilinės bakterijos

Žemėje yra įvairių unikalių ekstremalių aplinkos nišų, kuriose išgyvena tik tokias sąlygas galintys toleruoti organizmai. Tokie organizmai gali būti prokariotai, kurie savo išskirtinomis fiziologinėmis savybėmis prisitaikę toleruoti neįprastas aplinkos sąlygas. (Najar and Thakur, 2020) Vienas iš tokių prisitaikymo pavyzdžių – termofilinės bakterijos.

Termofilinės bakterijos yra vienas iš pagrindinių užkratų įvairiose pramonės šakose, kuriose naudojama didelė temperatūra (40-65 °C). Tokios pramonės šakos gali apimti konservų fabrikus, sulčių, pieno pasterizavimo pramonę, želatinos ir dehidratuotų daržovių gamybą. (Burgess, Lindsay and Flint, 2010) Dėl savo unikalių savybių, tokių kaip ypač karščiui atsparių endosporų ir bioplėvelių formavimo, šios bakterijos gali išgyventi didelę aplinkos temperatūrą ir yra atsparios dezinfekcijai. (Jha, Singh and Anand, 2023) Pagrindinė termofilinių bakterijų plitimo priežastis yra bioplėvelių formavimas ant nerūdijančio plieno paviršių, kurie yra dažna perdirbimo linijų, pavyzdžiui, vamzdynų, rezervuarų ir kitos įrangos, medžiaga. (Wang *et al.*, 2021) Taip pat endosporų populiacijos yra gerai žinomos pieno gamybos pramonėje. Termofilinių bakterijų sporos gali užteršti produktus, kai pilstymi metu pakuotės medžiaga sterilizuojama nepakankamai. Tokių sporų būvimas piene ar pieno milteliuose prieštarauja higienos praktikai, nesvarbu ar jos kenksmingos, ar ne. (Sadiq, Flint and He, 2018) Sadiq *et al.* atliktų tyrimų metu nustatyta, jog *Geobacillus* genčiai priklausančios rūšies – *Geobacillus thermoleovorans* – sporos gali išgyventi ir 125 °C temperatūros terminį apdorojimą. (Sadiq *et al.*, 2016)

Termofilines bakterijas galima suskirstyti į dvi grupes – obligatinius termofilus ir fakultatyvinius termofilus. Obligatiniai termofilai gali augti tik padidintoje temperatūroje – apie 40-80 °C. Šiai grupei priklauso tokie mikroorganizmai kaip *Anoxybacillus flavithermus* ir *Geobacillus spp.* Fakultatyviniai termofilai priklauso *Bacillus* genčiai. Šie mikroorganizmai gali augti tiek mezofilinėje, tiek termofilinėje aplinkoje. (Wang *et al.*, 2021)

#### 1.3.1. (Para)geobacillus

*Geobacillus* genčiai priklauso granteigiami, aerobiniai ir sporas formuojantys termofilai. Šios bakterijos dažniausiai randamos didele temperatūra pasižyminčiose aplinkose, įskaitant karštas versmes, naftos gręžinius, kompostą ir dykumų dirvožemį. (Aliyu *et al.*, 2016) Daugumai šiai genčiai priklausančių bakterijų rūšių dauginimuisi reikalinga temperatūra yra nuo 35 °C iki 80 °C, taip pat geriausiai auga

neutraliame, 6.2-7.5 pH (Najar and Thakur, 2020). Geobacilos yra naudingos dėl savo termostabilumų savybių, todėl yra naudojamos biotechnologijų pramonėje kaip fermentų šaltinius, biokuro gamybos platformas ir bioremediacijos strategijų komponentus. (Zeigler, 2014) Tobulėjant technologijoms, 2012 m. buvo išskirta nauja *Parageobacillus* gentis, sudaryta iš keturių naujų rūšių, kurios anksčiau buvo žinomos kaip *Geobacillus* gentis – tai *Parageobacillus caldxylosilyticus*, *Parageobacillus thermoglucosidans*, *Parageobacillus thermantarcticus* ir *Parageobacillus toebii*. (Lin et al., 2019) *Geobacillus* bakterijos yra vienos iš dažniausių pieno produktų užkratų. Jos išgyvena pieno pasterizavimą, o jų sporos prilimpa prie paviršių ir sąlygoja bioplėvelių formavimąsi, taip yra kenkiama pieno produktų kokybei. (KILIC, 2020)

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Darbe naudotos medžiagos ir prietaisai

#### 2.1.1. Darbe naudotos bakterijų kultūros

*Parageobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup>

#### 2.1.2. Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės ir medžiagos

- CASO agaras (Carl Roth);
- CASO buljonas (Carl Roth);
- Nizinas (Sigma-Aldrich);
- Riboflavinai (Carl Roth);
- Chlorofilino natrio druska (Carl Roth);
- Kurkuminas (Carl Roth);
- DMSO (REACHEM s.r.o)

#### 2.1.3. Darbe naudoti prietaisai

- Termostatas (Binder)
- Optinio tankio matuoklis (Biochrom)
- Analitinės svarstyklės (Kern)
- pH-metras (Mettler Toledo)
- Šviesos diodų apšvitos prototipas (VU Fizikos fakulteto Fotonikos ir nanotechnologijų institutas)
- Terminė purtyklė (Fisherbrand)
- Sūkurinė maišyklė (Fisherbrand)

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Bakterijų kultivavimas

Bakterijų kultūra *P. toebii* visą laiką buvo auginama 12-16 val. ant agarizuotos CASO terpės termostate arba skystoje CASO terpėje terminėje purtyklėje su aeracija (350 aps./min) 55 °C temperatūroje.

Šviežia *P. toebii* kultūra nuo lėkštelės buvo nuplaunama ir nugramdoma špateliu naudojant skystą CASO terpę ir paruošiama ląstelių suspensija 20 ml CASO terpės. Tuomet ląstelės yra toliau skiedžiamos su CASO terpe kol jos optinis tankis (OT) pasiekia 1. Tuomet buvo atliekami dešimtkartiniai skiedimai ir ląstelės sėjamos ant agarizuotos CASO terpės. Po 16-18 val. buvo skaičiuojamos kolonijos ir išvedamas jų vidurkis, tuomet skaičiuojama, kiek kolonijas formuojančių vienetų yra 1 ml suspensijos (KFV/ml), kurios OT yra lygus 1. Tokiu būdu pasiruošta ląstelių suspensija buvo visą laiką naudojama tolimesniuose eksperimentuose.

### 2.2.2. Nizino minimalios inhibicinės koncentracijos (MIK) nustatymas

Pirmiausia nizinas buvo tirpinamas su 25 mM Na fosfatiniame buferyje (pH 7,4) ir paruošiamas jo koncentruotas tirpalas (3,3 mg/ml). Tuomet pasiruošiama ląstelių suspensija, CASO skystoje terpėje ląstelės praskiedžiamos iki  $1 \times 10^6$  KFV/ml. Pirmiausiai paruoštas nizino tirpalas skiedžiamas su CASO skysta terpe santykiu 1:9 ir tuomet toliau su CASO terpe atliekami dukartiniai nizino tirpalo skiedimai. Kiekvienas gautas praskiesto nizino tirpalas išpilstomas po 100  $\mu$ l į 96-šulinėlių plokštelę. Į šulinėlius su išpilstytu nizinu pilama po 100  $\mu$ l paruoštos ląstelių suspensijos. Taip pat paruošiamos dvi kontrolės – į vieną pilama 180  $\mu$ l terpės ir 20  $\mu$ l nizino tirpalo ( $K^-$ ), o į kitą – 200  $\mu$ l ląstelių suspensijos, be nizino ( $K^+$ ). Plokštelė buvo dedama į terminę purtyklę ir inkubuojama 55 °C laipsnių temperatūroje, 350 aps./min., ir laikoma apie 18 val. Po inkubacijos vizualiai vertinami rezultatai, stebint ties kuriuo šulinėliu matomas bakterijų kultūros augimo slopinimas.

### 2.2.3. Ląstelių paruošimas antimikrobinės fotodinaminės terapijos eksperimentui

*P. toebii* ląstelės buvo užauginamos ant anagrizuotų CASO terpių ir paruošiama suspensija (OT - 1,  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  KfV/ml), kaip aprašyta praeitame skyriuje 2.2.1.

Eksperimentams su riboflavinu arba chlorofilinu tamsintuose mėgintuvėliuose paruošiami fotosensibilizatorių tirpalai, atitinkamai 0,106 mM ir 0,11 mM koncentracijos. Abiejų fotosensibilizatorių tirpalai ruošiami naudojant dejonizuotą vandenį ir filtruojant su PVDF 0,2  $\mu$ m porų dydžio švirkštiniu filtru. Mėgintuvėliai su fotosensibilizatorių tirpalais turi būti apsaugoti nuo tiesioginės šviesos naudojant tamsintus mėgintuvėlius arba įvyniojant juos į foliją. Riboflavino tirpalas buvo paruošiamas 6 val. prieš eksperimentus ir lėtai tirpinamas. Chlorofilino tirpalas turi būti sunaudojamas per 24 val. nuo paruošimo. Esant poreikiui naudojami ir dešimt kartų skiesti fotosensibilizatorių tirpalai. Toliau, į tamsintą 15 ml mėgintuvėlį yra pilama 4,45 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) buferio, 50  $\mu$ l paruoštų ląstelių ir 0,5 ml paruošto sterilaus riboflavino arba chlorofilino tirpalo. Ląstelių koncentracija galutiniame mišinyje –  $1 \times 10^5$  KfV/ml.

Jei eksperimentas atliekamas su kurkuminu, 25 mg fotosensibilizatoriaus miltelių ištirpinama 5 ml DMSO, tuomet filtruojama PVDF 0,2  $\mu$ m porų dydžio švirkštiniu filtru. Taip gaunamas 13,57 mM koncentracijos kurkumino tirpalas. Toliau, į užtamsintą 15 ml mėgintuvėlį pilama 4,91 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) buferio, 50  $\mu$ l paruoštų ląstelių ir 40  $\mu$ l paruošto sterilaus kurkumino tirpalo.

Tokie paruošti galutiniai ląstelių ir fotosensibilizatorių mišiniai yra gerai išmaišomi sūkurinėje maišyklėje ir išpilstomi po 200  $\mu$ l į 96-šulinėlių mikroplokštelę. Tiriant fotosensibilizatorių ir nizino sinergistinį poveikį į šulinėlį su ląstelių ir fotosensibilizatoriaus mišiniu papildomai įpilama nizino tirpalo (3,3 mg/ml). Siekiant išvengti išdžiūvimo ir siekiant vienodo šviesos pasiskirstymo, buvo pildomi tik viduryje esantys šulinėliai paliekant bent po 2 šulinėlius tuščius nuo kiekvieno krašto.

Visi eksperimentai ir suspensijų paruošimas atliekami kaip įmanoma labiau ribojant šviesos poveikį, o visi mėgintuvėliai viso eksperimento metu buvo laikomi apvynioti foliją.

#### 2.2.4. Fotodinaminė terapija

Siekiant užtikrinti tinkamą FS efektą, buvo naudotas specialiai eksperimentams sukonstruotas prietaisas (Gricajeva *et al.*, 2022), su šviesą spinduliuojančiais diodais (*angl.* LED – light emitting diode). Šis prietaisas buvo sukurtas Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Fotonikos ir nanotechnologijų institute. Dviejų skirtingų tipų šviesos diodai yra pritaikyti fotodinaminės terapijos eksperimentams ir skleidžia šviesa, kuri pasiskirsto per visą mikroplokštelės plotą, su galimybe reguliuoti spinduliuotės intensyvumą ( $\text{W/m}^2$ ).

Fotodinaminės terapijos eksperimentams buvo naudoti du šviesos bangų ilgiai – 440 nm ir 402 nm, tai mėlynoji ir artimoji ultravioletinė spinduliuotė, atitinkamai. Taip pat viso eksperimento metu buvo naudotas  $350 \text{ W/m}^2$  šviesos intensyvumas. Pagal laiką, kiek buvo švitinami mėginiai, suskaičiuota spinduliuotės dozė ( $D, \text{J/cm}^2$ ) pagal formulę:  $D = \frac{l \times t}{10\,000}$ , kur  $l$  – šviesos intensyvumas ( $\text{W/m}^2$ ),  $t$  – švitinimo trukmė (s). Riboflavinui ir chlorofilinui sužadinti buvo naudojamos abi – ir 440 nm ir 402 nm bangų ilgių spinduliuotės. Kurkuminui – tik 440 nm bangų ilgių spinduliuotė.

**lentelė 1** Tyrime naudoti spinduliuotės intensyvumai, taikant juos visiems fotosensibilizatoriams

Laikas (min)	Spinduliuotės dozė ( $\text{J/cm}^2$ )
0	0
30	63
60	126
120	252
180	378

Išpilsčius ląstelių ir fotosensibilizatoriaus mišinį į 96-šulinėlių mikroplokštelę, švitinimo eigoje paimami mėginiai iš šulinėlių ir atlikus dešimtkartinius skiedimus skystoje CASO terpėje (santykis 1:9) išsėjama po 100  $\mu\text{l}$  mėginio ant agarizuotos CASO terpės. Kaip kontrolė prieš švitinimą iš šulinėlių paimami ir nešvitinti mėginiai, kurie taip pat išsėjami ant lėkštelių. Lėkštelės su išsėtomis bakterijomis laikomos  $55^\circ\text{C}$  temperatūroje 16-18 val. ir tuomet vertinamas užaugusių kolonijų skaičius. Kiekvienas eksperimentas buvo kartotas ne mažiau nei 3 kartus. Iš gautų rezultatų buvo vedami vidurkiai ir

apskaičiuoti paklaidų nuokrypiai. Gauti duomenys buvo apdoroti su Microsoft Excel programa ir pateikti sklaidos grafikuose.



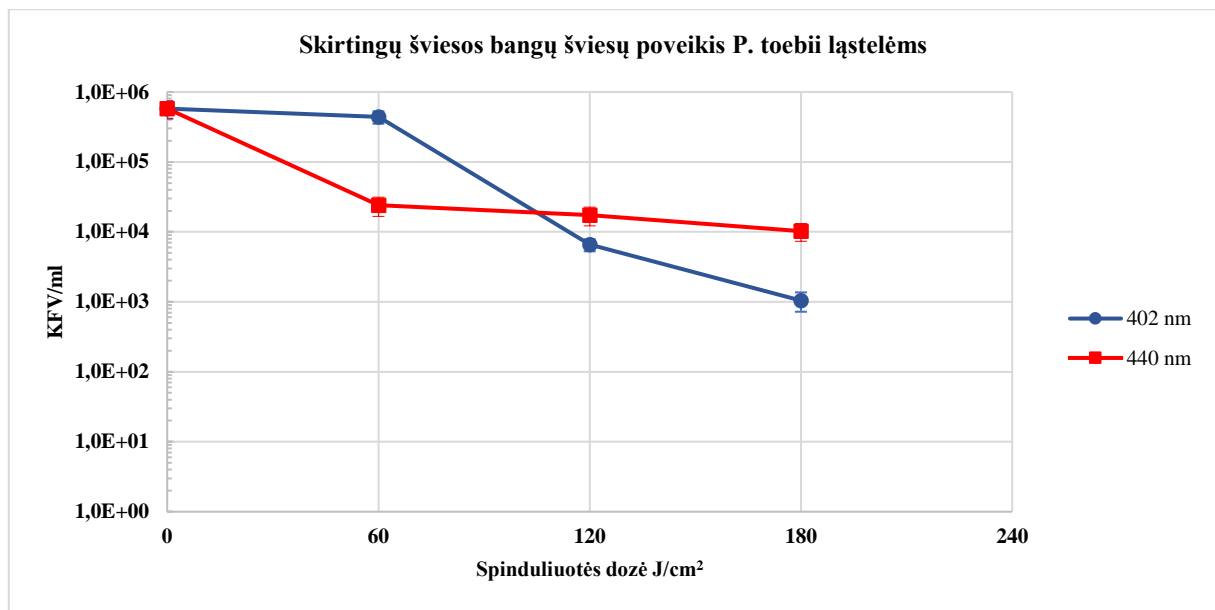
### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. aFDT poveikis *P. toebii* ląstelėms

Tyrimo pradžioje siekiant įvertinti aFDT poveikį *P. toebii* ląstelėms, pirmiausia buvo atliekamos kontrolės, t.y. ląstelės buvo švitinamos 402 nm ir 440 nm ilgių bangų šviesomis, tačiau nepaveikiamos fotosensibilizatoriais (FS). Taip buvo siekiama išsiaiškinti, kaip ląstelės yra paveikiamos tik 402 nm ir 440 nm bangų ilgių šviesa, be jokios FS įtakos. Tokiomis sąlygomis ląstelės buvo švitinamos abejomis šviesomis ( $350 \text{ W/m}^2$ ) iki 3 val. ir skirtingais laiko intervalais: 1 val. ( $126 \text{ J/cm}^2$ ), 2 val. ( $252 \text{ J/cm}^2$ ) ir 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ), išsėjamos ant lėkštelių suskaičiuoti KfV/ml pokytį.

Ekspimento metu nustatyta, jog švitinant ląsteles 402 nm ilgio bangų šviesa *P. toebii* ląstelių gyvybingumas sumažėjo (8 pav.). Pradžioje, po 1 val. švitinimo, ląstelėms gavus  $126 \text{ J/cm}^2$  spinduliuotės dozę, kolonijas formuojančių vienetų skaičius sumažėjo tik per  $\sim 0,1 \text{ log.}$ , tačiau po 2 val. ( $252 \text{ J/cm}^2$ ), kolonijas formuojančių vienetų skaičius sumažėjo per  $\sim 2 \text{ log.}$ , o švitinant ląsteles 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) KfV/ml sumažėjo per 2,5 log iš viso per visą švitinimo laikotarpį.

Mažesnis efektas ląstelėms buvo pastebėtas švitinant jas su 440 nm ilgio bangų šviesa (8 pav.) Per pirmą švitinimo valandą, arba naudojant  $126 \text{ J/cm}^2$  spinduliuotės dozę, ląstelių kiekis sumažėjo per maždaug 1,3 log. Tačiau švitinant toliau ląstelių skaičius mažėjo labai nedaug, po 2 val. ( $252 \text{ J/cm}^2$ ) ląstelių skaičius sumažėjo tik per 0,7 log., o po 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) – 1,4 log per visą švitinimo laikotarpį. Tai nurodo, jog švitinant *P. toebii* ląsteles 402 nm ilgio bangų šviesa, ląstelių jautrumas yra didesnis, nei švitinant jas 440 nm ilgio bangų šviesa.



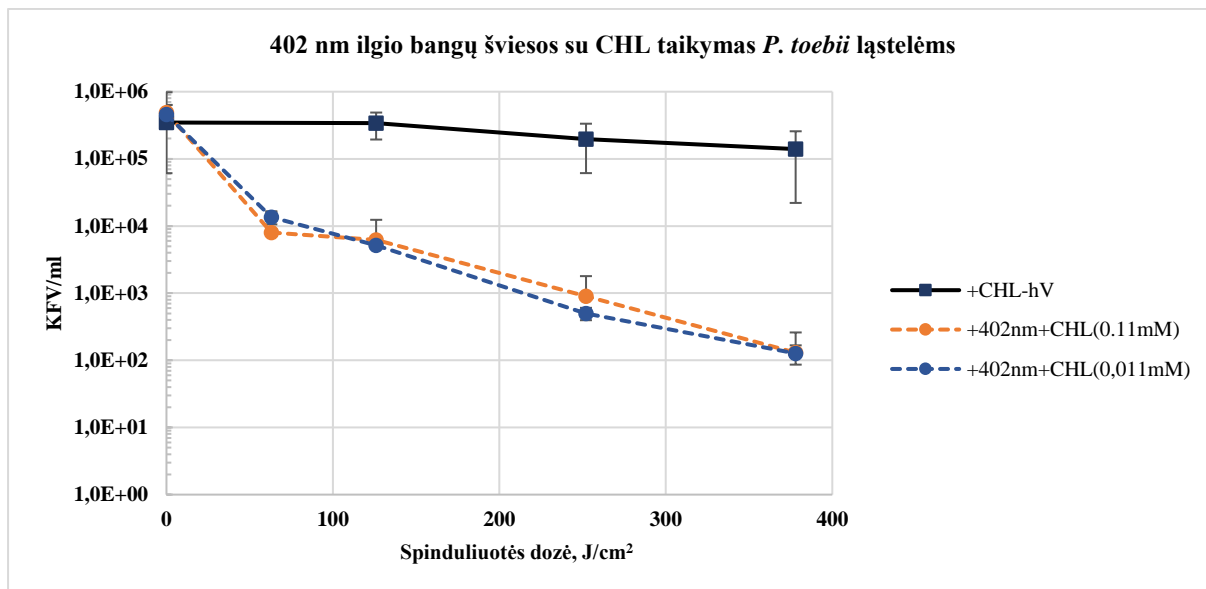
**8 pav.** 402 nm ir 440 nm ilgių bangų šviesų poveikių *P. toebii* ląstelėms vertinimas, veikiant jas skirtingomis šviesos ekspozicijomis. Bakterijos inkubuotos Tris-HCl buferyje be FS, švitintos 402 nm ilgio šviesa (mėlyna) arba 440 nm ilgio šviesa (raudona).

### 3.1.1. Chlorofilino poveikis *P. toebii* ląstelėms

Prieš atliekant aFDT tu chlorofilinu (CHL), pirmiausia buvo atliktas eksperimentas įvertinti CHL veikimą nenaudojant jokio šviesos šaltinio. Toks vertinimas reikalingas kaip kontrolė, kad palyginti CHL toksiškumą ląstelėms neveikiant jo šviesa. Kontrolinių bandymų metu buvo naudojama CHL koncentracija - 0,11 mM. Bandymų metu nustatyta, jog CHL, neveikiamas jokia šviesa, didelio efekto ląstelėms neturi – po 1 val. inkubavimo tamsoje ląstelių kiekis išliko toks pats, o po 2 val. sumažėjo per 0,1 log., tuo tarpu po 3 val. inkubavimo ląstelės sumažėjo dar per 0,2 log (pav. 9). Iš gautų rezultatų galima pasakyti, jog inkubuojant ląsteles su CHL, ląstelių kiekio pokytis labai mažas. Tai pasako, jog CHL be šviesos *P. toebii* ląstelių toksiškai neveikia ir didelio poveikio jų augimui nedaro. (pav. 9)

Sekančiame etape, naudojant 0,11 mM CHL koncentraciją ir švitinant 402 nm ilgio šviesa (pav. 9) po 30 min. ( $63 \text{ J/cm}^2$ ) ląstelės buvo nuslopintos per beveik 1,7 log., po 2 val. ( $252 \text{ J/cm}^2$ ) – per 2,7 log., o po 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) ląstelių gyvybingumas buvo nuslopintas per 3,4 log. Tai užtikrina pasiektą bakteriocidinį poveikį, nes KFV skaičius sumažėjo per 3 log. Panašią situaciją galime pastebėti ir naudojant 0,011 mM CHL koncentraciją ir veikiant 402 nm ilgio šviesa (pav. 9). Pritaikius po 1 val. ( $126 \text{ J/cm}^2$ ) ląstelių kiekis sumažėjo per ~ 2 log., o pasiekus 3 val ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) šviesos ekspoziciją, buvo

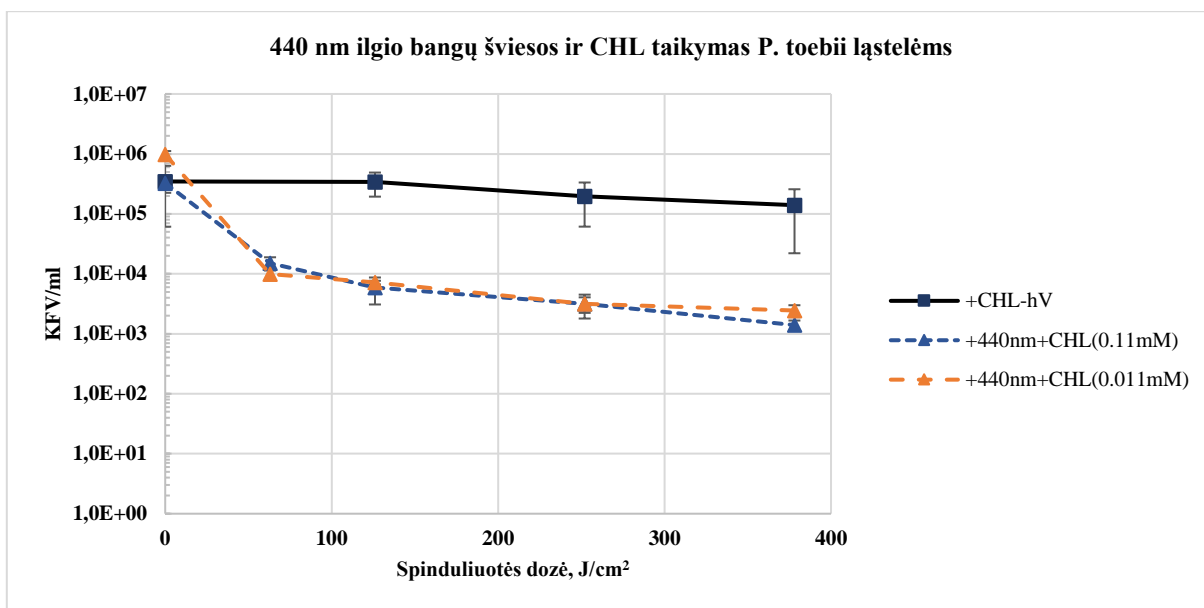
pasiekta gyvybingų ląstelių sumažėjimas per 3,4 log. Čia taip pat matomas labai panašus bakteriocidinis poveikis ląstelėms. (pav. 9)



**9 pav.** CHL poveikis *P. toebii* ląstelėms. +CHL-hV – kontrolė, kai ląstelės su CHL, tačiau nebuvo švitinamos; +402nm+CHL(0,11mM) – ląstelės, švitinamos 402 nm ilgio šviesa su CHL (0,11 mM); +402nm+CHL(0,011mM) – ląstelės, švitinamos 402 nm ilgio šviesa su CHL (0,011 mM).

Taip pat buvo atlikta aFDT su CHL ir 440 nm ilgio šviesa (10 pav.). Veikiant ląsteles 0,11 mM CHL koncentracija po 3 val. švitinimo (378 J/cm<sup>2</sup>) jų gyvybingumo kritimas yra per beveik 2,2 log., o veikiant ląsteles 0,011 mM CHL koncentracija, ląstelių skaičius krenta per beveik 2,5 log. Galima matyti, kad skirtumas tarp 0,11 mM ir 0,011 mM CHL koncentracijos yra labai nedidelis, apie 0,1 log.

Gauti rezultatai rodo, jog CHL kartu veikiant 440 nm bangos ilgio šviesa daro mažesnę poveikį *P. toebii*, nei švitinant 402 nm spinduliuote. Be to, išbandytos FS koncentracijos 0,11 mM ir 0,011 mM neturi reikšmingos įtakos rezultatams ir aFDT efektyvumui. Kitų tyrimų duomenimis, chlorofilinas geriausiai sugeria 405 nm ilgio bangų šviesą (Phasupan, Le and Nguyen, 2021; Gricajeva *et al.*, 2022). Kadangi geresni rezultatai gaunami naudojant 402 nm ilgio bangų šviesą, tolimesni darbai buvo tęsiami su šia šviesa.



**10 pav.** CHL ir 440 nm šviesos poveikis *P. toebii* ląstelėms. **+CHL-hV** – kontrolė, kur ląstelės su CHL, tačiau nebuvo švitinamos; **+440nm+CHL(0,11mM)** – ląstelės švitinamos 440 nm ilgio šviesa su CHL (0,11 mM) **+440nm+CHL(0,011Mm)** – ląstelės švitinamos 440 nm ilgio šviesa su CHL (0,011 mM).

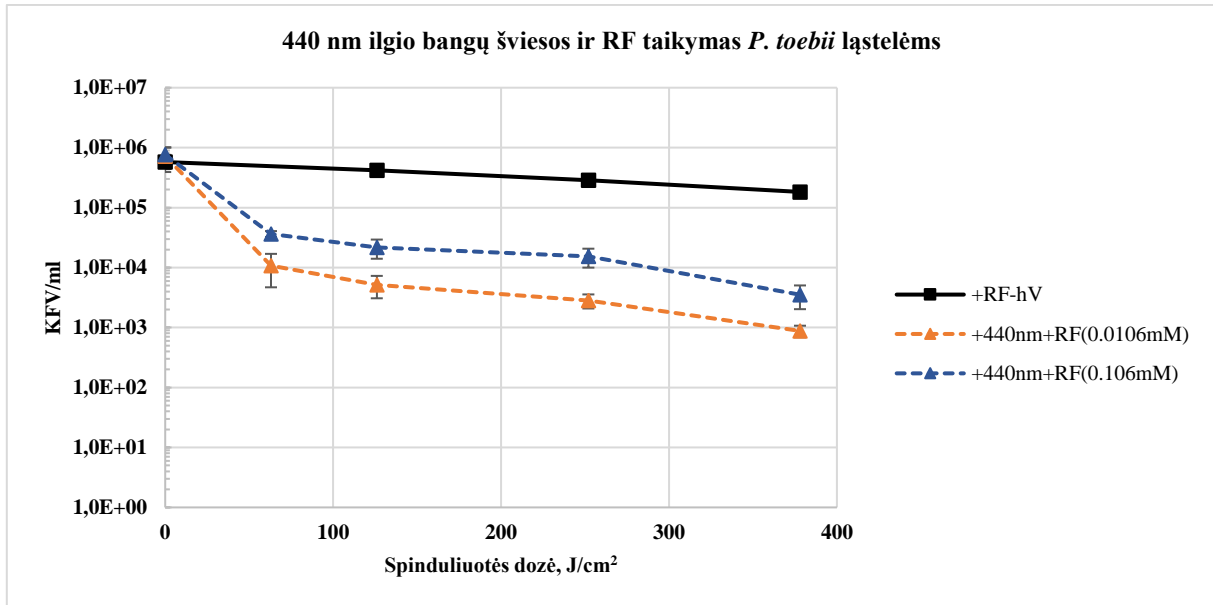
### 3.1.2. Riboflavino poveikis *P. toebii* ląstelėms

Analogiški tyrimai buvo atlikti ir su riboflavinu (RF). Pirmiausia buvo atlikta kontrolė, kurios naudojant RF, bet neveikiant jo šviesa (11 pav.). Kontrolinių bandymų metu naudota RF koncentracija – 0,0106 mM. Rezultatai parodė, jog neveikiant šviesai RF beveik jokio poveikio ląstelėms nepadare. Po 3 val. inkubacijos ląstelių sumažėjo vos per 0,4 log. Tokie rezultatai leidžia teigti, jog RF yra netoksiškas *P. toebii* ląstelėms neveikiant šviesai.

Tolesnių bandymų metu buvo pritaikytos dvi skirtingos spinduliuotės (402 nm ir 440 nm) ir naudotos dvi RF koncentracijos: 0,0106 mM ir 0,106 mM (11 pav.). Švitinant 440 nm ilgio bangų šviesa ir kartu naudojant 0,0106 mM RF koncentraciją, poveikis ląstelėms buvo pastebimas jau po 30 min. (63 J/cm²), KFV sumažėjo per 1,6 log., o po 1 val. (126 J/cm²) – per 2 log. Galiausiai po 3 val. (378 J/cm²) buvo pasiektas KFV sumažėjimas per 3 log.

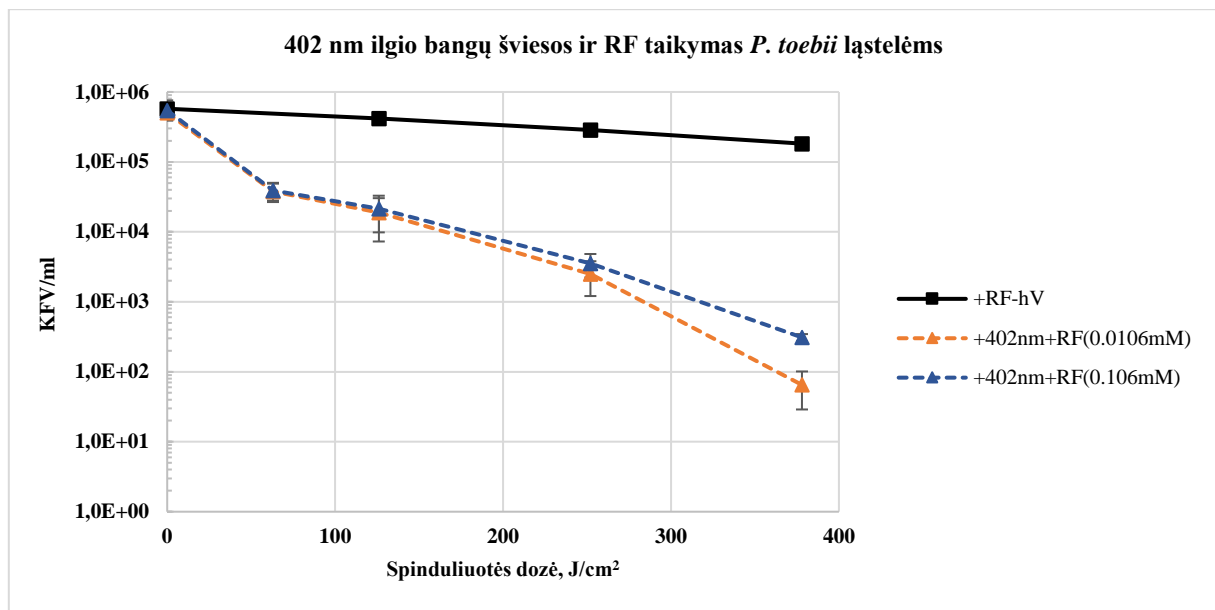
Veikiant ląsteles su didesne RF koncentracija (0,106 mM), buvo pastebėtas ne toks stiprus poveikis – KFV sumažėjimo per maždaug 2,5 log, o tai reiškia baktericidinis poveikis buvo mažesnis su didesne FS koncentracija. Tai galėjo būti paaiškinta sumažėjusiu RF tirpumu gaminant 0,106 mM koncentracijos tirpalą, kas lėmė, jog filtruojant iki galo neištirpusį RF, didelė jo dalis galėjo užstrigti

filtre. Dėl šios priežasties galutiniame mišinyje su ląstelėmis koncentracija galėjo būti mažesnė nei 0,106 mM.



**11 pav.** RF ir 440 nm šviesos poveikis *P. toebii* ląstelėms. **+RF-hV** – kontrolė, kai ląstelės su RF, tačiau nebuvo švitinamos; **+440nm+RF(0,106mM)** – ląstelės švitinamos 440 nm ilgio šviesa su RF (0,106 mM); **+440nm+RF(0,0106Mm)** – ląstelės švitinamos 440 nm ilgio šviesa su RF (0,0106 mM).

Taip pat atlikti aFDT bandymai su RF švitinant 402 nm ilgio bangos šviesa (12 pav.). Verta paminėti, kad kitų tyrėjų yra parodyta ir aprašyta, jog maksimali RF sugertis yra ties 440 nm ilgio bangos šviesa, tuo tarpu kituose šaltiniuose aprašomi ir kiti bangų ilgiai, pvz. 375 nm ilgio šviesa (Zanetti-Polzi *et al.*, 2017; Gricajeva *et al.*, 2022). Šio tyrimo rezultatai parodė, kad naudojant 0,0106 mM ir 0,106 mM koncentracijų RF po 30 min. (63 J/cm<sup>2</sup>) spinduliuotės dozės sumažino ląstelių gyvybingumą per 1 log., po 2 val. (273 J/cm<sup>2</sup>) – per 2,2 log. Po 3 val., apšvitos dozei pasiekus 378 J/cm<sup>2</sup> ir naudojant 0,0106 mM koncentraciją, KFV sumažėjo per 4 log, o naudojant 0,106 mM – per 3 log. Tokie rezultatai, kai gaunamas šiek tiek didesnis efektyvumas naudojant mažesnę FS koncentraciją, galima paaiškinti taip pat kaip ir prieš tai švitinant su 440 nm bangos ilgio šviesa. Be to, verta pažymėti, jog švitinant 402 nm ilgio bangų šviesa buvo gautas geresnis rezultatas nei švitinant 440 nm ilgio bangų šviesa. Šiam eksperimentui buvo atlikti mažiausiai 6 pakartojimai, kad įsitikinti, jog tai nėra klaida, tačiau visais kartais rezultatai buvo analogiški.



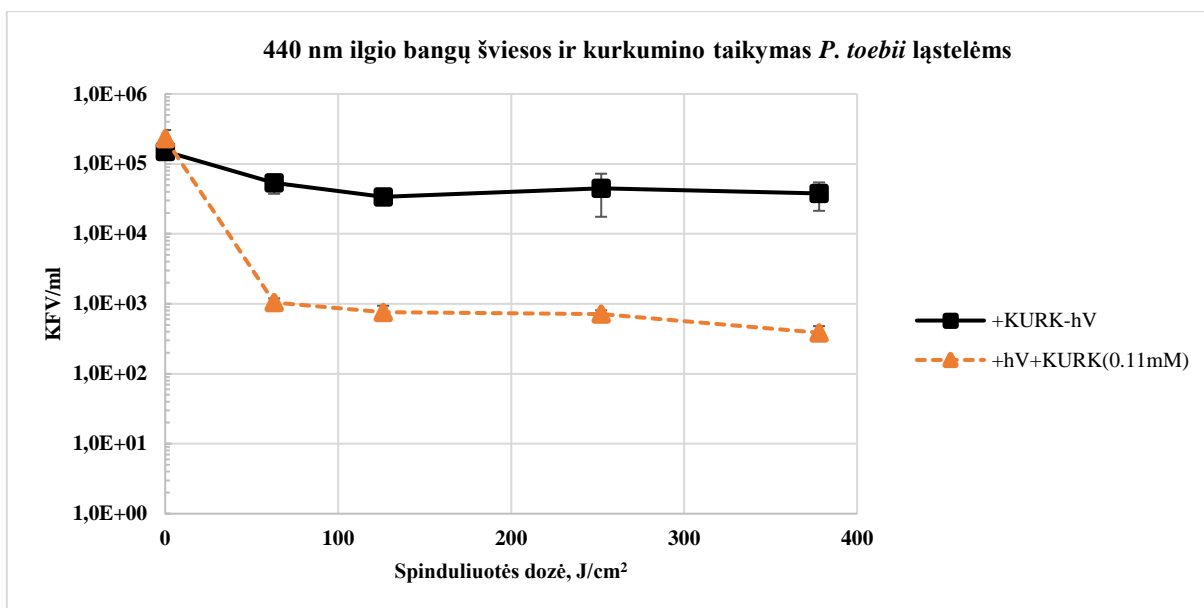
**12 pav.** RF ir 402 nm šviesos poveikis *P. toebii* ląstelėms. **+RF-hV** – kontrolė, kai ląstelės su RF, tačiau nebuvo švitinamos; **+402nm+RF(0,106mM)** – ląstelės švitintos 402 nm ilgio šviesa su RF (0,106 mM); **+402nm+RF(0,0106Mm)** – ląstelės švitinamos 402 nm ilgio šviesa su RF (0,0106 mM).

### 3.1.3. Kurkumino poveikis *P. toebii* ląstelėms

Bandymams su kurkuminu buvo naudojama tik viena FS koncentracija (0,11 mM) bei viena spinduliuotė. Kitų tyrimų duomenys rodo, jog kurkumino didžiausia sugertis yra tarp 300 – 500 nm ilgio bangų šviesa, tačiau didžiausias sugerties pikas yra tarp 408 – 430 nm bangos ilgių, priklausomai nuo naudojamų tirpiklių. (Xie *et al.*, 2022) Šiame tyrime buvo naudojama 440 nm ilgio bangos švitinimas, kadangi jis yra artimiausias sugerties pikui turi mažesnę antimikrobinę poveikį ląstelėms.

Pirmiausia buvo atliktas bandymas be švitinimo (kontrolė), kuomet ląstelės buvo inkubuojamos su kurkuminu tamsoje 3 val., nenaudojant jokios spinduliuotės (13 pav.). Rezultatai parodė, kad 1 val. ląstelių kiekis mėginiuose sumažėjo beveik per 1 log., tačiau po 2 val. ir 3 val. inkubacijos ląstelių kiekis daugiau iš esmės nesikeitė ir išliko daugmaž stabilus. Tai rodo, jog kurkuminas, be šviesos, turi labai nedidelį toksiškumą *P. toebii* ląstelėms.

Toliau, kad sužadinti aFDT naudojant kurkuminą buvo švitinta 440 nm ilgio bangų šviesa (13 pav.). Po 30 min. ( $63 \text{ J/cm}^2$ ) buvo matomas didžiausias efektyvumas – KfV skaičius sumažėjo per beveik 2 log. Švitinant ilgiau efektas nebuvo daug didesnis, kadangi po 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) ląstelių skaičius sumažėjo iš viso per 2,8 log.



**13 pav.** Kurkumino ir 440 nm ilgio šviesos poveikis *P. toebii* ląstelėms. **+KURK-hV** – kontrolė, kai ląstelės su kurkumino, tačiau nebuvo švitinamos; **+hV+KURK(0,11 mM)** – ląstelės švitinamos 440 nm ilgio šviesa ir kurkuminu (0,11 mM).

Įvertinus visus gautus rezultatus su visais FS galima pasakyti, jog RF yra pats veiksmingiausias FS prieš *P. toebii* bakterijas, veikiant jį su 402 nm ilgio spinduliuote, nors tai nesutampa su kitų tyrimų duomenimis, jog didžiausia RF sugertis yra ties 440 nm ilgio bangų šviesa. Šiems rezultatams paaiškinti reiktų atlikti daugiau ir detalesnių tyrimų.

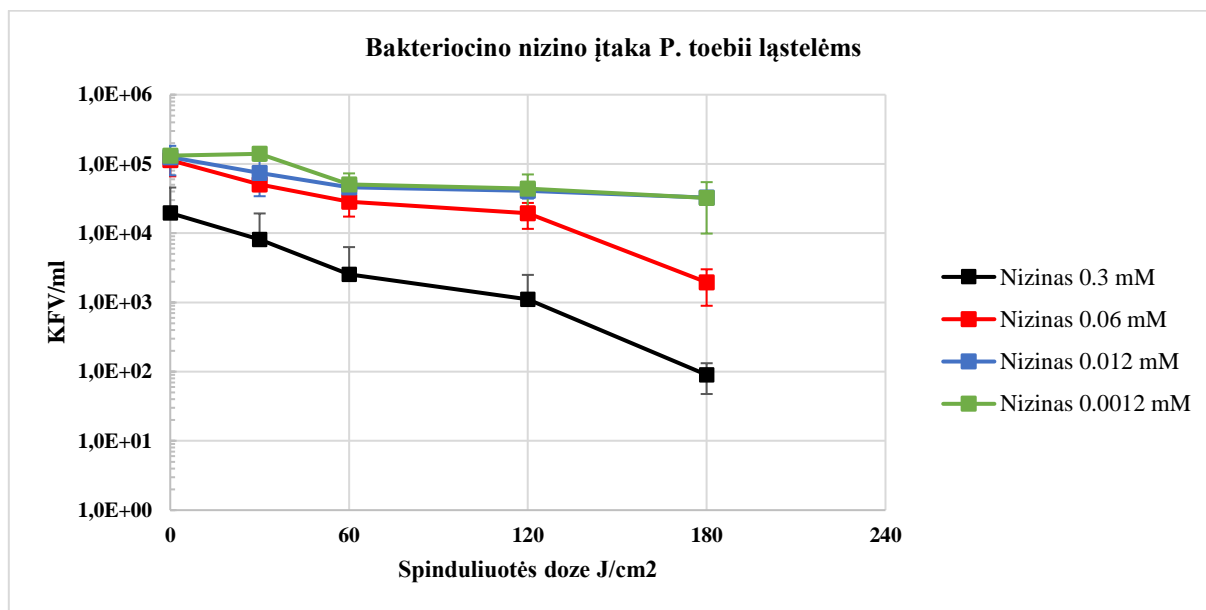
Taip pat gerus rezultatus rodo ir CHL naudojimas veikiant jį 402 nm ilgio bangos šviesa. Tokie rezultatai buvo tikėtini, kadangi pagal literatūrą šis FS ir turi būti efektyvus su šia spinduliuote.

#### 3.1.4. Sinergistinis nizino ir aFDT poveikis *P. toebii* ląstelėms

Pirmiausia buvo įvertinta, kaip nizinas veikia prieš *P. toebii*, nustatyta minimali inhibicinė koncentracija (MIK) auginant ląsteles 96-šulinėlių plokštelėse. Vėliau taip pat buvo įvertinta, kaip nizinas veikia *P. toebii* ląsteles inkubuojant skystoje terpėje 96-šulinėlių plokštelėje be FS (kontrolė). Galiausiai buvo įvertintas ir FS poveikis kartu su nizinu.

Gauti rezultatai parodė, kad minimali nizino *P. toebii* augimą slopinanti koncentracija skystoje terpėje yra 0,012 mM. Tuo tarpu inkubuojant ląsteles su nizinu plokštelėje ir tada išsėjus ant agarizuotos

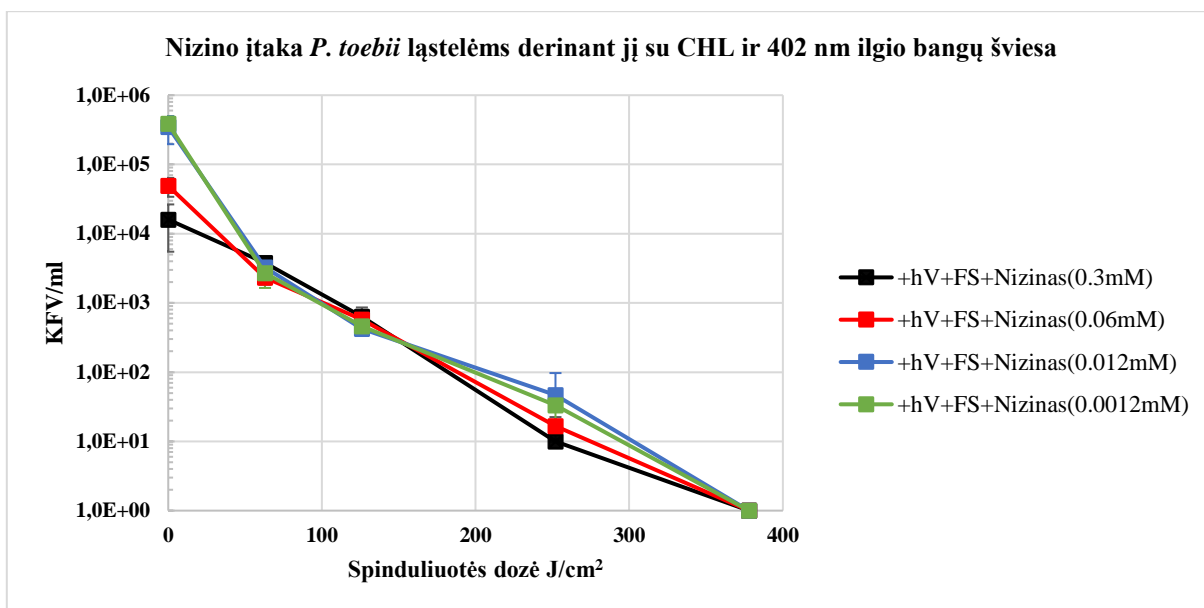
terpės pastebėta, jog 0,012 mM ir 0,0012 mM nizino koncentracijos didelio poveikio neturėjo, ląstelių skaičius po 3 val. inkubacijos sumažėjo per 0,8 log. 0,06 mM koncentracija veikė stipriau ir po 3 val. inkubacijos KfV/ml kiekis sumažėjo per 2 log (14 pav.). Naudojant 0,3 mM koncentraciją per 3 val. ląstelių kiekis sumažėjo per daugiau nei 3 log. Galima pastebėti, kad yra matomas ir gana didelis skirtumas tarp 0,0012 mM ir 0,3 mM koncentracijų 0 val. ( $0 \text{ J/cm}^2$ ). Tai rodo, kad didesnė nizino koncentracija veikia stipriau ir žudo ląsteles dar iki inkubacijos, arba išsėjus jas agarizuotoje terpėje.



**14 pav.** Nizino poveikis *P. toebii* ląstelėms inkubuojant jas 3 val. Tamsoje 96-šulinėlių plokštelėje.

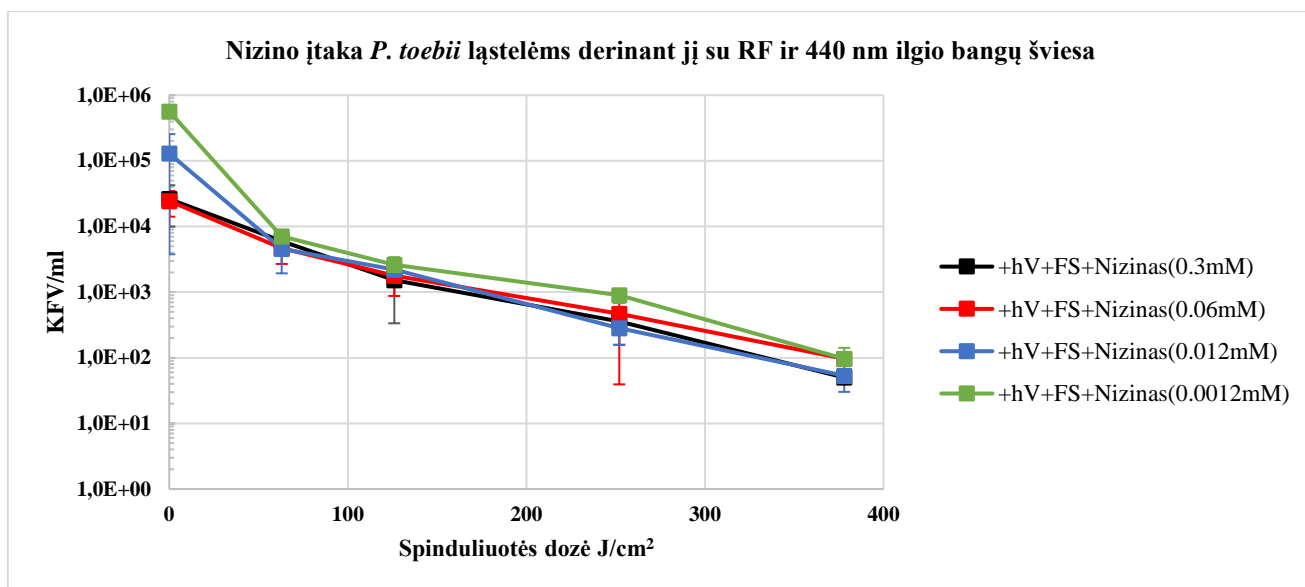
Švitinant ląsteles 402 nm kartu su CHL (0,11 mM) ir nizinu buvo išbandytos skirtingos bakteriocino koncentracijos (15 pav.). Tokio derinio rezultatai parodė labai gerą efektą prieš ląsteles. Visgi įdomu tai, kad naudojant skirtingas nizino koncentracijas didelio antimikrobinio skirtumo nebuvo. Šiuo atveju su visomis nizino koncentracijomis buvo pasiektas labai panašus rezultatas – po 2 val. ( $252 \text{ J/cm}^2$ ) ląstelių kiekis sumažėjo per 3 log, o po 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) KfV/ml kiekis buvo 0. Tai rodo, jog CHL antimikrobinis poveikis ląstelėms kartu su nizinu yra geresnis, nei naudojant tik CHL su ta pačia šviesa, kuomet po 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) buvo matomas ląstelių sumažėjimo skirtumas tik per 2 log.





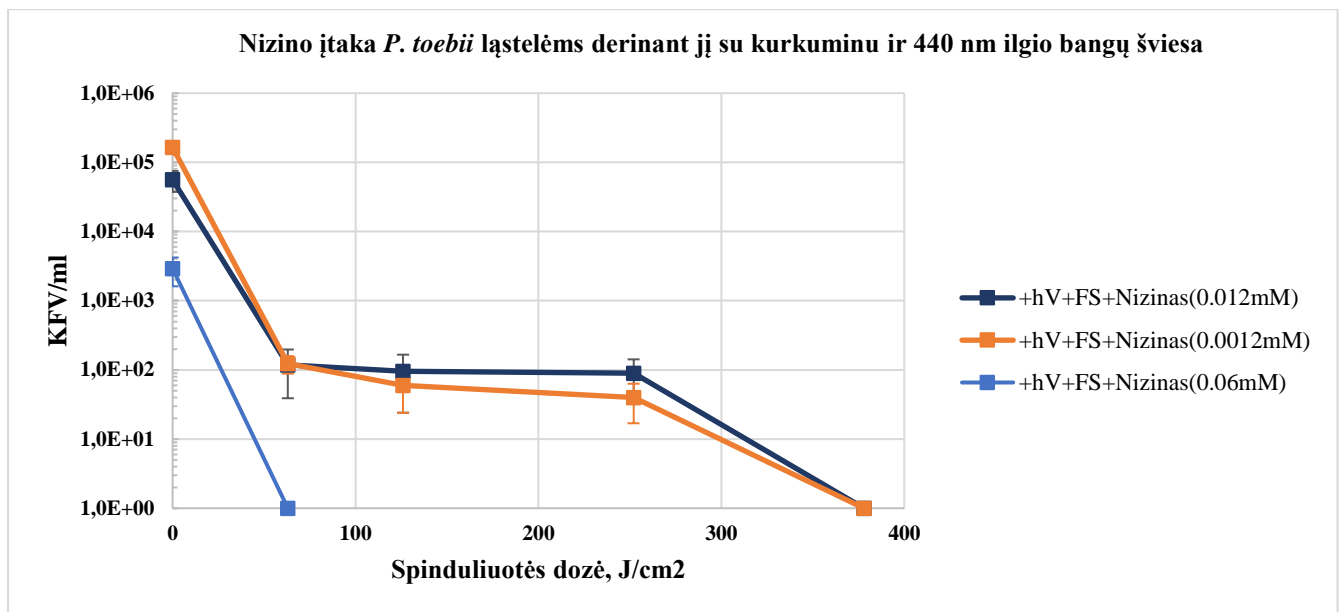
**15 pav.** aFDT taikyta su CHL (0,11 mM) ir 402 nm ilgio šviesa, kartu su nizinu.

Švitinant ląsteles su 440 nm ilgio šviesa, kartu su RF (0,11 mM) ir nizinu (16 pav.) galime matyti analogiškus rezultatus, kaip ir su CHL, visos nizino koncentracijos parodė beveik tokį patį efektą. Tačiau šiuo atveju rezultate matome silpnesnį poveikį, nei eksperimentuose su CHL – švitinant 3 val. (378 J/cm<sup>2</sup>), ląstelių skaičius sumažėjo per 2,5 log. Verta atkreipti dėmesį, kad kontrolės su nizinu (0.3 mM) ir švitinimo su RF (0,0106 mM) ir nizinu (0,3 mM) rezultatai buvo panašūs, KfV/ml skaičius sumažėjo per maždaug 2 log. Tokie rezultatai rodo, jog RF antimikrobinis poveikis ląstelėms kartu su nizinu yra silpnesnis, nei naudojant tik RF su ta pačia šviesa, kuomet po 3 val. (378 J/cm<sup>2</sup>) buvo matomas ląstelių sumažėjimo skirtumas per 3 log.



**16 pav.** aFDT taikymas *P. toebii* ląstelėms, derinant nizina, RF (0,0106 mM) ir 440 nm ilgio spinduliuotę.

Norint įvertinti, kaip nizinas veikia kartu su kurkuminu (0,11 mM), buvo naudota 440 nm ilgio šviesa ir skirtingos nizino koncentracijos (17 pav.). Atlikus tyrimą buvo pastebėta, jog dar prieš švitinimą ląstelės sumaišius su kurkuminu ir 0,3 mM nizino koncentracija *P. toebii* kiekis mėginyje stipriai krenta ir buvo užfiksuotas 0 KfV/ml (neįtraukta į grafiką). Tuo tarpu 0,06 mM nizino koncentracija taip pat buvo labai efektyvi – ląstelių gyvybingumas buvo pilnai nuslopintas jau po 30 min. (63 J/cm<sup>2</sup>). Panaudojus 0,012 mM ir 0,0012 mM nizino koncentracijas po 30 min. (63 J/cm<sup>2</sup>) ląstelių sumažėjo per 3 log., o švitinant iki 3 val. (378 J/cm<sup>2</sup>) ląstelių kiekis buvo sumažintas iki 0 KfV/ml. Tai rodo, jog kurkumino antimikrobinis poveikis ląstelėms kartu su nizinu yra geresnis, nei naudojant tik kurkumina su ta pačia šviesa, kuomet po 3 val. (378 J/cm<sup>2</sup>) buvo matomas ląstelių sumažėjimo skirtumas tik per 2,8 log.



**17 pav.** aFDT taikymas *P. toebii* ląstelėms, derinant nizina, kurkuminą (0,11 mM) ir 440 nm ilgio spinduliuotę.

Apibendrinant, nizinas turi sinergistinį poveikį *P. toebii* ląstelėms veikiant kartu su fotosensibilizatoriais. Galime matyti, jog su kurkuminu nizinas veikia stipriausiai, tačiau, su CHL gaunama taip pat efektyvi *P. toebii* ląstelių inaktyvacija. Tuo tarpu, nizino sinergistinis poveikis kartu su RF buvo silpniausias.

## IŠVADOS

1. Nustatyta, kad *P. toebii* ląsteles švitinant 402 nm ilgio bangų šviesa poveikis po 3 val. yra stipresnis, nei švitinant su 440 nm ilgio banga. Tuo tarpu inkubuojant ląsteles su FS: chlorofilinu, riboflavinu ir kurkuminu žymus poveikis ląstelėms nepastebėtas.
2. Nustatyta, jog taikant aFDT su CHL ir švitinant 402 nm ilgio bangų šviesa, ląstelių skaičius per 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) sumažėja  $>3$  log. Tuo tarpu švitinant su 440 nm ilgio bangų šviesa ląstelių skaičius per 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) sumažėja per 2,2 – 2,5 log. Skirtingos CHL koncentracijos (0,11 Mm ir 0,011 mM) didelės įtakos antimikrobiniui poveikiui neturėjo – abi parodė panašų poveikį.
3. Taikant aFDT su RF ir švitinant 440 nm ilgio bangų šviesa, ląstelių skaičius per 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) sumažėja per 2,9 log. Tačiau švitinant ląsteles su 402 nm ilgio bangos šviesa ląstelių skaičius sumažėja per  $>3$  log. Skirtingos RF koncentracijos (0,0106 Mm ir 0,106 mM) didelės įtakos antimikrobiniui poveikiui neturėjo – abi parodė panašų poveikį.
4. Nustatyta, jog taikant aFDT su kurkuminu ir švitinant 440 nm ilgio bangų šviesa, ląstelių skaičius per 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) sumažėja per 2,8 log.
5. Taikant aFDT, fotosensibilizatoriai turi sinergistinį poveikį kartu su bakteriocinu nizinu. Kombinuojant niziną su chlorofilinu ir 402 nm ilgio bangų šviesa per 3 val. ( $378 \text{ J/cm}^2$ ) ląsteles galima sumažinti iki 0 KFV/ml, kombinuojant su kurkuminu ląstelių skaičius taip pat sumažėja iki 0 KFV/ml, o tuo tarpu kombinuojant su riboflavinu, sinergistinis poveikis mažesnis, ląstelių sumažėja per 2,5 log.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BMI

Gustė KUNIGĖLYTĖ  
Magistro baigiamasis darbas

**Antimikrobinės fotodinaminės terapijos taikymas termofilinių bakterijų  
*Parageobacillus toebii* inaktyvacijai**

Santrauka

Termofilinės bakterijos kelia didžiulį pavojų maisto perdirbimo įmonių įrenginiams. Šias bakterijas yra labai sunku išnaikinti dėl jų didelio aukščio temperatūros toleravimo ir sporų formavimo, tad vis yra bandoma atrasti greičiau veikiančių metodų jų augimo slopinimui. Vienas iš tokių metodų yra antimikrobinė fotodinaminė terapija, kuri jau seniai yra taikoma medicinoje bei mikrobu kontrolės skyriuose. Ši terapija apibrėžiama kaip nuo deguonies priklausoma fotocheminė reakcija, vykstanti šviesai aktyvuojant fotosensibilizatorius, dėl kurios susidaro citotoksinės reaktyvios deguonies rūšys. Ši terapija sulaukia labai didelio dėmesio dėl savo didelio veiksmingumo, specifiškumo ir minimalaus šalutinio poveikio. Kadangi apie antimikrobinės fotodinaminės terapijos taikyma termofilinėms bakterijoms informacijos yra labai mažai, šiame darbe buvo bandyta išanalizuoti jos poveikį termofilinėms *Parageobacillus toebii* ląstelėms. Tirtos bakterijos buvo inaktyvuojamos pasitelkiant šviesos diodus, kurie spinduliuoja 440 nm ir 402 nm ilgio bangų šviesas. Darbe išbandyti natūralūs fotosensibilizatoriai – chlorofilinas, riboflavinai ir kurkuminas. Taip pat buvo atlikti eksperimentai įvertinti sinergistinį aFDT ir nizino poveikį. Fotodinaminės terapijos efektyvumas buvo vertinamas pagal išaugusių kolonijų skaičių taikant skirtingas apšvitos dozes. Remiantis gautais rezultatais efektyviausias FS, slopinantis *P. toebii* augimą yra chlorofilinas. Didžiausią poveikį ląstelėms padarė ir nizino-chlorofilino derinys, kuris, kaip buvo pastebėta, buvo efektyviausias visuose aFDT bandymuose.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
BMI

Gustė KUNIGĖLYTĖ

Master thesis

**Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy for Inactivation of the Thermophilic Bacterium *Parageobacillus toebii***

## Summary

Thermophilic bacteria pose a major threat to food processing plants. These bacteria are very difficult to eliminate due to their high temperature tolerance and spore formation, so attempts are being made to find faster methods of inhibiting their growth. One such method is antimicrobial photodynamic therapy, which has long been used in medicine and in microbial control departments. This therapy is defined as an oxygen-dependent photochemical reaction that takes place through the activation of photosensitisers by light, resulting in the production of cytotoxic reactive oxygen species. This therapy is gaining a lot of attention due to its high efficacy, specificity and minimal side effects. Since very little information is available on the application of antimicrobial photodynamic therapy to thermophilic bacteria, this work was undertaken to analyse its effect on thermophilic *Parageobacillus toebii* cells. The bacteria studied were inactivated by LEDs emitting 440 nm and 402 nm light. The natural photosensitisers chlorophyllin, riboflavin and curcumin were tested. Experiments were also carried out in combination with bacteriocin nisin. The effectiveness of photodynamic therapy was evaluated by the number of colonies grown at different doses of irradiation. According to the results obtained, chlorophyllin is the most effective FS for inhibiting the growth of *P. toebii*. The nisin-chlorophyllin combination also had the greatest effect on the cells and was observed to be the most effective in all aFDT tests.

## LITERATŪROS SARAŠAS

1. Aliyu, H. *et al.* (2016) 'Phylogenomic re-assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*', *Systematic and Applied Microbiology*, 39(8), pp. 527–533. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.09.004>.
2. Buchovec, I. *et al.* (2020) 'Antimicrobial Photoinactivation Approach Based on Natural Agents for Control of Bacteria Biofilms in Spacecraft', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), p. 6932. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21186932>.
3. Burgess, S.A., Lindsay, D. and Flint, S.H. (2010) 'Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing', *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), pp. 215–225. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027>.
4. Cardoso, D.R., Libardi, S.H. and Skibsted, L.H. (2012) 'Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality', *Food & Function*, 3(5), pp. 487–502. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2FO10246C>.
5. Chaturvedi, D., Singh, K. and Singh, V.K. (2019) 'Therapeutic and pharmacological aspects of photodynamic product chlorophyllin', *European Journal of Biological Research*, 9(2), pp. 64–76. Available at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.2638869>.
6. Cieplik, F. *et al.* (2018) 'Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't', *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), pp. 571–589. Available at: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.
7. Dai, C. *et al.* (2022) 'The Natural Product Curcumin as an Antibacterial Agent: Current Achievements and Problems', *Antioxidants*, 11(3), p. 459. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11030459>.
8. Darbandi, A. *et al.* (2021) 'Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials', *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), p. e24093. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>.
9. Etemadi, A. *et al.* (2021) 'Blue Light Photodynamic Therapy With Curcumin and Riboflavin in the Management of Periodontitis: A Systematic Review', *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 12, p. e15. Available at: <https://doi.org/10.34172/jlms.2021.15>.
10. Fontana, C.R. *et al.* (2009) 'The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms', *Journal of Periodontal Research*, 44(6), pp. 751–759. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01187.x>.
11. Gharsallaoui, A. *et al.* (2016) 'Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), pp. 1262–1274. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>.

12. Ghorbani, J. *et al.* (2018) 'Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview', *Laser Therapy*, 27(4), pp. 293–302. Available at: [https://doi.org/10.5978/islsm.27\\_18-RA-01](https://doi.org/10.5978/islsm.27_18-RA-01).
13. Gricajeva, A. *et al.* (2022) 'Riboflavin- and chlorophyllin-based antimicrobial photoinactivation of *Brevundimonas* sp. ESA1 biofilms', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, p. 1006723. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1006723>.
14. Hou, W. *et al.* (2022) 'Application of Fullerenes as Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Inactivation: A Review', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 957698. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.957698>.
15. Insińska-Rak, M. and Sikorski, M. (2014) 'Riboflavin Interactions with Oxygen—A Survey from the Photochemical Perspective', *Chemistry – A European Journal*, 20(47), pp. 15280–15291. Available at: <https://doi.org/10.1002/chem.201403895>.
16. Jha, S., Singh, N. and Anand, S. (2023) 'Occurrence of aerobic bacterial endospores in dried dairy ingredients', *International Journal of Dairy Technology*, 76(4), pp. 1025–1029. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12963>.
17. KILIC, T. (2020) 'Biofilm-Forming Ability and Effect of Sanitation Agents on Biofilm-Control of Thermophile *Geobacillus* sp. D413 and *Geobacillus toebii* E134', *Polish Journal of Microbiology*, 69(4), pp. 411–419. Available at: <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-042>.
18. Kumariya, R. *et al.* (2019) 'Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria', *Microbial Pathogenesis*, 128, pp. 171–177. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>.
19. Lahiri, D. *et al.* (2022) 'Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1005918>.
20. Lin, J.-H. *et al.* (2019) 'Geobacillus strains that have potential value in microbial enhanced oil recovery', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(20), pp. 8339–8350. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10115-7>.
21. Liu, D. *et al.* (2023) 'Photodynamic inactivation and its application in food preservation', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(14), pp. 2042–2056. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1969892>.
22. Luksiene, Z. and Brovko, L. (2013) 'Antibacterial Photosensitization-Based Treatment for Food Safety', *Food Engineering Reviews*, 5(4), pp. 185–199. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9070-7>.
23. Lyon, J.P. *et al.* (2011) 'Photodynamic therapy for pathogenic fungi', *Mycoses*, 54(5), pp. e265–e271. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x>.
24. Mandal, R. and Dutta, G. (2020) 'From photosynthesis to biosensing: Chlorophyll proves to be a versatile molecule', *Sensors International*, 1, p. 100058. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100058>.



25. Martins Antunes de Melo, W. de C. *et al.* (2021) 'Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for biofilm treatments. Possible synergy between aPDT and pulsed electric fields', *Virulence*, 12(1), pp. 2247–2272. Available at: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1960105>.
26. de Melo, W.C. *et al.* (2013) 'Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(7), pp. 669–693. Available at: <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.811861>.
27. Nagini, S., Palitti, F. and Natarajan, A.T. (2015) 'Chemopreventive Potential of Chlorophyllin: A Review of the Mechanisms of Action and Molecular Targets', *Nutrition and Cancer*, 67(2), pp. 203–211. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.990573>.
28. Najar, I.N. and Thakur, N. (2020) 'A systematic review of the genera *Geobacillus* and *Parageobacillus*: their evolution, current taxonomic status and major applications', *Microbiology*, 166(9), pp. 800–816. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000945>.
29. Niculescu, A.-G. and Grumezescu, A.M. (2021) 'Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review', *Applied Sciences*, 11(8), p. 3626. Available at: <https://doi.org/10.3390/app11083626>.
30. Paulraj, F. *et al.* (2019) 'Molecular Pathways Modulated by Curcumin Analogue, Diarylpentanoids in Cancer', *Biomolecules*, 9(7), p. 270. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom9070270>.
31. Phasupan, P., Le, T.D. and Nguyen, L.T. (2021) 'Assessing the photodynamic efficacy of different photosensitizer-light treatments against foodborne bacteria based on the number of absorbed photons', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 221, p. 112249. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112249>.
32. Plenagl, N. *et al.* (2018) 'Hypericin Loaded Liposomes for Anti-Microbial Photodynamic Therapy of Gram-Positive Bacteria', *physica status solidi (a)*, 215(15), p. 1700837. Available at: <https://doi.org/10.1002/pssa.201700837>.
33. Pogorelaya, M., Martynov, A. and Romanova, E. (2020) 'Riboflavin in photodynamic inactivation of pathogens and photodynamic therapy', *Annals of Mechnikov's Institute*, (1), pp. 6–11.
34. Polat, E. and Kang, K. (2021) 'Natural Photosensitizers in Antimicrobial Photodynamic Therapy', *Biomedicines*, 9(6), p. 584. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060584>.
35. Pourhajibagher, M., Pourakbari, B. and Bahador, A. (2022) 'Contribution of antimicrobial photo-sonodynamic therapy in wound healing: an in vivo effect of curcumin-nisin-based poly (L-lactic acid) nanoparticle on *Acinetobacter baumannii* biofilms', *BMC Microbiology*, 22(1), p. 28. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02438-9>.
36. do Prado-Silva, L. *et al.* (2022) 'Antimicrobial photodynamic treatment (aPDT) as an innovative technology to control spoilage and pathogenic microorganisms in agri-food products: An updated review', *Food Control*, 132, p. 108527. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108527>.

37. Sadiq, F.A. *et al.* (2016) 'The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders', *International Journal of Food Microbiology*, 238, pp. 193–201. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009>.
38. Sadiq, F.A., Flint, S. and He, G. (2018) 'Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria', *International Dairy Journal*, 85, pp. 159–168. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>.
39. Santos, J.C.P. *et al.* (2018) 'Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, pp. 179–194. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.008>.
40. Seidi Damyeh, M. *et al.* (2020) 'An insight into curcumin-based photosensitization as a promising and green food preservation technology', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), pp. 1727–1759. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12583>.
41. Sheraz, M.A. *et al.* (2014) 'Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10(1), pp. 1999–2012. Available at: <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.208>.
42. Sidhu, P.K. *et al.* (2021) 'Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria as Potent Antimicrobial Peptides against Food Pathogens', in *Biomimetics*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.95747>.
43. Sun, J. *et al.* (2018) 'Recent Progress in Metal-Based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy', *Molecules*, 23(7), p. 1704. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23071704>.
44. Wang, N. *et al.* (2021) 'Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk', *Food Research International*, 150, p. 110754. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110754>.
45. Wolnicka-Glubisz, A. and Wisniewska-Becker, A. (2023) 'Dual Action of Curcumin as an Anti- and Pro-Oxidant from a Biophysical Perspective', *Antioxidants*, 12(9), p. 1725. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox12091725>.
46. Xie, L. *et al.* (2022) 'Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, p. 112567. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112567>.
47. Zanetti-Polzi, L. *et al.* (2017) 'Theoretical modeling of the absorption spectrum of aqueous riboflavin', *Chemical Physics Letters*, 669, pp. 119–124. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.12.022>.
48. Zeigler, D.R. (2014) 'The Geobacillus paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?', *Microbiology*, 160(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.071696-0>.
49. Zhu, S. *et al.* (2021) 'The application of photodynamic inactivation to microorganisms in food', *Food Chemistry: X*, 12, p. 100150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100150>.

50. Ziental, D. *et al.* (2021) 'Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation against Fungi', *Nanomaterials*, 11(11), p. 2883. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano11112883>.
51. Zimina, M. *et al.* (2020) 'Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins', *Antibiotics*, 9(9), p. 553. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>.

## PADĖKA

Norėčiau labai padėkoti savo darbo vadovui Arnoldui Kauniečiui, kuris darbo rengimo metu su manimi dalinosi savo žiniomis ir patirtimi, taip pat suteikė visą reikiamą pagalbą ir visas problemas sprendė kartu.

Taip pat noriu padėkoti visoms taikomosios mikrobiologijos laboratorijos kolegėms už palaikytą draugišką atmosferą viso darbo laboratorijoje metu, už visą nuoširdžią pagalbą ir palaikymą!