

**VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

AUGUSTĖ VALAVIČIŪTĖ

Mikrobiologijos studijų programa

**Magistro baigiamasis darbas**

**LANTANO (III) NITRATO HEKSAHIDRATO PRIEŠMIKROBINIO POVEIKIO ANALIZĖ**

Darbo vadovė  
prof. Dr. Eglė Lastauskienė

Vilnius, 2024

## Turinys

SANTRUMPŲ SAŖAŠAS.....	4
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. Odos mikroorganizmai .....	8
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> biologija ir morfologija.....	8
1.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> patogeniškumas ir virulentiškumas.....	9
1.1.3. <i>C. guilliermondii</i> biologija ir morfologija.....	11
1.1.4. <i>C. guilliermondii</i> patogeniškumas ir virulentiškumas.....	12
1.2. Impulsinio elektrinio lauko (IEL) poveikis .....	13
1.3. Endogeninis oksidacinis stresas.....	14
1.4. Retieji žemės elementai .....	15
1.4.1. REE ištekliai.....	15
1.4.2. Nežemiški REE ištekliai.....	16
1.4.3. REE nuosėdų rūšys.....	16
1.4.4. REE industrinis panaudojimas .....	17
1.4.5. REE poveikis aplinkai ir sveikatai .....	18
1.4.6. Lantanai ( <i>Lanthanum</i> ).....	20
1.4.7. Lantano (III) nitrato heksahidratas .....	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	22
2.1. Medžiagos.....	22
2.1.1. Mitybinės terpės .....	22
2.1.2. Prietaisai .....	23
2.2. Metodai .....	23
2.2.1. Tyrimo objektas .....	23
2.2.2. Minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) nustatymas.....	24
2.2.3. Elektros šoko poveikis .....	24
2.2.4. $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ poveikis mikroorganizmams laike .....	25
2.2.5. Fluorescencinė mikroskopija ROS.....	26
ROS eksperimentas su bakterijomis .....	26
ROS eksperimentas su mielėmis.....	26

3. REZULTATAI.....	27
3.1. Minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) nustatymas .....	27
3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis <i>S. aureus</i> .....	28
3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis <i>C. guilliermondii</i> .....	31
3.4. $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ poveikis <i>S. aureus</i> laike .....	34
3.5. $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ poveikis <i>C. guilliermondii</i> laike .....	35
3.6. Fluorescencinė mikroskopija, ROS formavimasis <i>S. aureus</i> .....	36
IŠVADOS .....	40
PADĖKA .....	41
SANTRAUKA.....	42
SUMMARY .....	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	44

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

**CHIPS** – angl. *Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus* – chemotaksį slopinantis baltymas;

**CifA** – angl. *Clumping factor A* – sukibimo faktorius A, išreikštas *S. aureus*;

**Fcy** – opsonizuojančių antikūnų efektorinis domenas;

**FLIPr** – (angl. *FLICE inhibitory protein* – į peptidų receptorių panašus inhibitorinis baltymas; **Gd** – gadolinas;

**HREE** – angl. *Heavy rare earth element* – sunkieji retieji žemės elementai;

**HSP** – angl. *Heat shock proteins* – karščio šoko baltymai;

**Ig** – imunoglobulinas;

**K** – kalis;

**La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O** – lantano (III) nitrato heksahidratas;

**MIK** – minimali inhibitorinė koncentracija;

**MREE** – angl. *Medium rare earth element* – viduriniai retieji žemės elementai;

**MRSA** – angl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – atsparios *S. aureus* formos; **Nrf2** – angl. *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2* – eritroidinio branduolio faktoriaus 2 – susijęs faktorius 2;

**PBP** – angl. *Penicillin-binding protein* – peniciliną surišantis baltymas;

**PERK** – angl. *PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase* – į baltymų kinazę R panaši endoplazminio tinklo kinazė);

**PSM** – angl. *Phenol-soluble modulins* – fenolį tirpinantys modulinai;

**LREE** – angl. *Light rare earth element* – lengvieji retieji žemės elementai;

**REE** – angl. *Rare earth element* – retieji žemės elementai;

**ROS** – angl. *Reactive oxygen species* – reaktyvios deguonies formos;

**SCIN** – angl. *Staphylococcal complement inhibitor* – stafilokokų komplemento inhibitorius;

**SdrE** – angl. *Serine-aspartate repeat-containing protein E* – paviršiaus komponentus atpažįstantis baltymas, išreikštas *S. aureus*;

**SpA** – angl. *Staphylococcal protein* – stafilokokinis baltymas;

**SSL5 ir SSL10** – angl. *Staphylococcal superantigen-like protein* – į stafilokokus panašūs superantigenai;

**TMSCN** – angl. trimethylsilyl cyanide – trimetilsililcianidas;

**TSA** – angl. *Tryptone soy agar* – triptono sojų agaras;

**TSB** – angl. *Tryptic soy broth* – triptono sojų mitybinė terpė;

**UPR** – angl. *Unfolded Protein Response* – nesulankstytų baltymų atsakas.

## ĮVADAS

Dėl vis didėjančio mikroorganizmų atsparumo antimikrobiniais preparatais, tyrėjai stengiasi ieškoti naujų alternatyvių ir ekologiškai saugių, mikroorganizmų sukeltų infekcijų, gydymo būdų. Patogeniniai organizmai yra sutinkami ir gali kolonizuoti visas įmanomas ekologines nišas, taip pat ir žmogų. Žmogaus oda atlieka pagrindinę barjerinę funkciją, skiriančią kūną nuo išorinės aplinkos bei yra gyvenamoji buveinė daugeliui mikroorganizmų. Gramteigiamos bakterijos *Staphylococcus aureus* ir mieliagrybiai *Candida guilliermondii* yra vieni iš mikroorganizmų gyvenančių ant žmogaus odos kaip simbiotai, tačiau atsiradus palankioms sąlygoms gali tapti patogenais.

Retieji žemės metalai, tai septyniolikos elementų šeima, pasižyminti unikaliomis fizinėmis, cheminėmis, magnetinėmis savybėmis. Dėl savo reaktyvumo šie metalai randami ne grynųjų elementų pavidalu, o kaip sudedamosios rūdų dalys. Taigi, besiplečianti globalinė paklausa retiesiems žemės elementams šiuo metu kelia didelį susidomėjimą tiek geochemikams, tiek biotechnologams, ypač dėl jų labai svarbios funkcijos žaliosiose technologijose, kaip hibridiniai automobiliai, elektriniai automobilių akumulatoriai ir vėjo jėgainės.

Yra žinoma nemažai lantano druskų pritaikymo būdų biotechnologijose, tačiau trūksta žinių apie jų poveikį gyvoms ląstelėms. Todėl, šiame tyrime, naudojant bakterijas *S. aureus* ir mieles *C. guilliermondii*, buvo analizuojamas Lantano (III) nitrato heksahidrato ( $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) poveikis, kombinuojant šią medžiagą su elektros šoko impulsais, poveikis laike bei reaktyvių deguonies formų (angl. *reactive oxygen species*, toliau ROS) generavimas.

**Darbo tikslas:** atlikti ( $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) poveikio analizę mikroorganizmams *S. aureus* ir *C. guilliermondii*.

**Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  minimalias inhibitorines koncentracijas (toliau, MIK) mikroorganizmams *S. aureus* ir *C. guilliermondii*.
2. Nustatyti 2 mg/ml ( $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) poveikį priešmikrobiniam elektroporacijos efektyvumui bakterijoms *S. aureus*.
3. Nustatyti 1,5 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikį priešmikrobiniam elektroporacijos efektyvumui mieliagrybiams *C. guilliermondii*.

4. Nustatyti skirtingų koncentracijų (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml)  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikį laike bakterijoms *S. aureus*.
5. Nustatyti skirtingų koncentracijų (3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml)  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikį laike mieliagrybiams *C. guilliermondii*.
6. Nustatyti  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  ROS generavimą mikroorganizmuose *S. aureus* ir *C. guilliermondii*.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Odos mikroorganizmai

Oda yra natūrali ekosistema, sudaryta iš 1,8 m<sup>2</sup> įvairių specializuotų nišų, kuriose gyvena daug įvairių mikroorganizmų. Pagrindinė odos funkcija yra fizinis barjeras, apsaugantis nuo patogeninių mikroorganizmų ar toksiškų medžiagų patekimo į žmogaus kūną. Kadangi oda sąveikauja su išorine aplinka, ji yra kolonizuota įvairių mikroorganizmų, įskaitant bakterijas, grybus bei virusus. Daugelis šių mikroorganizmų yra nekenksmingi ir kai kurie atlieka gyvybiškai svarbias žmogui funkcijas, kuriomis žmogaus genomas nepasižymi. Net ir subtilus nukrypimas nuo odos mikrobiotos balanso, gali sukelti daugelį infekcinių ir uždegiminių odos ligų (Grice ir Segre, 2011). *Staphylococcus epidermidis*, gramteigiamas kokas, laikomas vienu iš pagrindinių odos ir gleivinės mikrobiotos gyventojų, sudarančių net 90 % aerobinės vietinės floros. Patekusios į organizmą, šios bakterijos formuoja bioplėveles, apsaugančias nuo gydymo antibiotikais. Taip pat, dažnai odos mikrobiotą sudaro ir gramteigiamos aktinobakterijos *Corynebacterium diphtheriae*, kurios yra skirstomos į toksigeninius ir netoksigeninius kamienus, priklausomai ar gamina mirtiną difterijos toksiną, ar ne. Tuo tarpu, netoksigeninės (toksino negaminančios) gali sukelti sepsį, sepsinį artritą, endokarditą ir osteomielitą (Martin ir kt., 1995; Cogen, Nizet ir Gallo, 2008). Dar viena įprasta žmogaus epitelio bakterijų rūšis *Corynebacterium jeikeium*, kuri prasiskverbusi pro odos barjerą gali sukelti sepsį arba endokarditą (Lelie ir kt., 2009). Taip pat, gramteigiama odos bakterija *Propionibacterium acnes*, gamina propiono rūgštį kaip šalutinį medžiagų apykaitos produktą bei dažnai yra laikoma spuogų priežastimi (Ashkenazi ir kt., 2003). *Pseudomonas aeruginosa* irgi yra laikoma normalia natūralios mikrobiotos dalimi, šios bakterijos yra aptinkamos nesteriliose sveikų žmonių vietose ir yra laikoma oportunistiniu patogenu, nes esant tinkamoms aplinkos sąlygoms šios bakterijos gali kolonizuoti bet kokį žmogaus audinį. Be visų šių bakterijų yra daug kitų mikroorganizmų, kurie simbiozėje gyvena ant mūsų odos (Lam ir kt., 1980).

#### 1.1.1. *Staphylococcus aureus* biologija ir morfologija

*Staphylococcus aureus* gramteigiamos fakultatyvinės anaerobinės bakterijos taksonomiškai yra priskiriamos *Staphylococcaceae* šeimai, *Staphylococcus* genčiai (Liu, 1930). Morfologiškai stafilokokai neformuoja sporų, yra nejudrūs, teigiami katalazės atžvilgiu, poromis besidauginantys kokai, kurie šviesiniu mikroskopu, matomi kaip trumpos grandinėlės arba į vynuoges panašios netaisyklingos kekės.



*S. aureus* bakterijos ant agarizuotos terpės Petri lėkštelių, formuoja dideles (1-4 mm dydžio), apvalias, gelsvas dažnai su hemolize kolonijas. Ląstelės dauginasi dvinario dalijimosi būdu, kai dvi dukterinės ląstelės ne visiškai atsiskiria ir lieka sujungtos, todėl dažnai ląstelės atrodo panašios į klasterius (Liu, 1930). Aerobinėmis sąlygomis auga gausiai ir greitai. Bakterijų genomineje DNR GC santykis sudaro 36 %. Ląstelės sienelės peptidoglikano diamino rūgštis yra lizinas, o skersinis tiltelis sudarytas iš penkių glicino liekanų, kurios yra fermentinio lizostafino fermento taikiny (Schleifer ir Kandler, 1972). Taip pat ląstelių sienelėje yra ribitolio teichoinės rūgšties, kuri yra pakeista N-acetil gliukozaminu (Ward, 1981). Išskirtinis šių bakterijų požymis yra gebėjimas sukelti žmonių ir gyvūnų kraujo krešėjimą, kurį lemia du išskiriami produktai – koagulazė ir von Willebrando faktorių surišantis baltymas (Cheng ir kt., 2010).

*S. aureus* yra viena iš labiausiai osmotolerantiškų bakterijų rūšių. Kadangi skirtingai nuo daugelio kitų organizmų, kurie auga padidinto osmoliariškumo aplinkoje, *S. aureus* auga ir esant mažam osmoliariškumui, tai rodo, kad šios bakterijos turi veiksmingą citoplazmos osmoliariškumo reguliavimo būdą (Grahamt ir Wilkinson, 1992). Dėl aukšto osmosinio ir joninio streso toleravimo, bakterijos gali augti didelę osmolitų koncentraciją turinčiuose maisto produktuose, o tai kelia pavojų žmonėms užsikrėsti šiomis bakterijomis per maistą (Vijaranakul ir kt., 1995), kadangi vandens aktyvumo mažinimas dažnai naudojamas kaip maisto produktų konservavimo metodas (Grahamt ir Wilkinson, 1992). Jų gebėjimas išgyventi didelį osmosinį (joninį) stresą yra susijęs su tuo, kad jos palaiko didelę viduląstelinę osmoprotektorių koncentraciją ir geba pasisavinti osmoprotektorius iš terpės, reaguodamas į stresą, veikiant transporto sistemoms (Wilkinson, 1997). Jos turi didelę viduląstelinę kalio (toliau,  $K^+$ ) koncentraciją, kurią palaiko konstitucinė  $K^+$  transportavimo sistema, tuo tarpu viduląstelinė prolino koncentracija padidėja dėl konstitucinės transporto sistemos, kai bakterijos auginamos NaCl turtingoje terpėje (Koujima ir kt., 1978). Kitos viduląstelinės molekulės, kurių taip pat padaugėjo esant didelei NaCl koncentracijai aplinkoje, buvo cholinas, taurinas ir glutamo rūgštis. Iš šių tirpalų, tyrimo metu, prolino ir glicino betainas buvo veiksmingiausi *S. aureus* osmoprotektoriai, kadangi bakterijų augimas pastebėtas net kai šie tirpalai buvo pašalinti iš apibrėžtos osmosinės terpės (Schwan ir kt., 2016).

### **1.1.2. *Staphylococcus aureus* patogeniškumas ir virulentiškumas**

Natūrali *S. aureus* buveinė žmogaus organizme yra oda ir nosiaryklė (Foster, 2002). Tai yra vieni dažniausių gramteigiamų bakterinių patogenų visuomenėje ir ligoninėse. *S. aureus* sukelia daugelį nekomplikuotų odos infekcijų ir sunkesnių invazinių infekcijų (Liu, 1930). Taip pat, šios bakterijos

sukelia endovaskulinių vietų ir vidaus organų (Foster, 2002) bei kvėpavimo takų infekcijas. *S. aureus*, gamindama enterotoksinus ir kitus superantigenus, sukelia apsinuodijimą stafilokokais užkrėstu maistu (Liu, 1930). Didžiausią susirūpinimą kelia pacientai, kuriems pasikartoja stafilokokinės infekcijos, nes jos gali sukelti invazinę *S. aureus* ligą bei sepsį. Taip pat, rizika susirgti stafilokokinėmis infekcijoms yra padidėjusi mažo svorio naujagimiams ir pacientams, kurių gydymui reikia endotrachėjinės intubacijos, medicininės svetimkūnių implantacijos, chirurginių procedūrų, hemodializės, peritoninės dializės, kateterio į veną, kurie serga cukriniu diabetu yra patyrę traumas arba, kuriems buvo atlikta imunosupresija ar vėžio gydymas (Kallen ir kt., 2010). Vis dažnesnis antibiotikų vartojimas visuomenėje lėmė vaistams atsparių *S. aureus* atsiradimą, įvardijamų kaip MRSA – meticilinui atsparios bakterijų formos (angl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, toliau MRSA). PBP2a (angl. *penicillin-binding protein*, toliau PBP) yra peniciliną surišantis baltymas. Tradiciniai penicilino tipo antibiotikai veikia, jungdamiesi su PBP ir sutrikdo bakterijų sienelės sintezę, sunaikindami bakterijas. Tačiau MRSA yra atspari tradiciniams penicilinams ir kitiems  $\beta$ -laktaminams, nes PBP2a pasikeičia. Tai leidžia MRSA išlikti gyvybinga net esant gydymui antibiotikais (Hartman ir Tomasz, 1984).

Bakterijos per žaizdą odoje gali patekti į kraują ir išplisti į vidaus organus, kur gali sukurti infekcijos židinių. Pagrindinėmis ligoninių pacientų infekcijų vietomis tampa chirurginės žaizdos, nešiojamieji medicinos prietaisai, kai bakterijos gali kolonizuoti implantuotą prietaisą ir išplisti ar sukelti vietinę infekciją (Foster, 2002).

*S. aureus* bakterijos yra išvysčiusios ne vieną mechanizmą, padedantį išvengti įgimto imuniteto. Bakterijų gaminamas su membrana susietas karotinoidas stafiloksantinas lemia geltoną kolonijų pigmentaciją. Gaminamas pigmentas šalina ROS ir gali būti laikomas biologiniu antioksidantu prieš vandenilio peroksidą ir hidroksilo radikalus ir taip pat gali būti naudingas kaip terapinis radikalo surinkėjas ir apsaugoti bakterijas nuo fagocitinio žudymo (Clauditz ir kt., 2006). Neutrofilai žmogaus kraujyje yra gausiausia polimorfonuklearinių (branduolys išsišakojęs ir dažnai įvairios formos) leukocitų populiacija, kuri yra svarbi organizmo apsaugai nuo *S. aureus*. Šios patogeninės bakterijos taikosi į neutrofilus ir jų efektorines funkcijas, neleisdamos neutrofilams migruoti į infekcijos vietas, kadangi sutrikdo chemotaksį, išskirdamos į stafilokokus panašius superantigenus SSL5 ir SSL10 (angl. *staphylococcal superantigen-like proteins*, toliau SSL5 ir SSL10), *S. aureus* chemotaksį slopinantį baltymą (angl. *chemotaxis inhibitory protein of S. aureus*, toliau CHIPS) ir jo homologus, formilą į peptidų receptorių panašius inhibitorinius baltymus (angl. *FLICE inhibitory protein*, toliau FLIPr) ir į FLIPr panašius baltymus (Haas ir kt., 2004; Bestebroer ir kt., 2009). Taip pat SSL5 neleidžia neutrofilams

judėti ant endotelio ląstelių, šį procesą palengvina stafilokokų išskiriamas ekstraląstelinio lipnumo baltymas, kuris blokuoja neutrofilų ligandų adheziją prie giminingų endotelio adhezijos receptorių (Chavakis ir kt., 2002). *S. aureus* taip pat gali skatinti neutrofilų chemotaksį, išskiriant fenolį tirpinančius modulinius peptidus (angl. *phenol-soluble modulins*, toliau PSM) (Forsman ir kt., 2012).

Neutrofilų fagocitozė ir mikroorganizmų išvalymas palengvėja, kai taikininis mikrobus opsonizuoja komplemento sistemos komponentai ir/arba imunoglobulinai (toliau Ig). Komplementas greitai atpažįsta ir opsonizuoja bakterijas arba tiesiogiai žudo bakterijas, suformuodamas membraninės atakos kompleksus. Svetimkūnio atpažinimas ir komplemento kaskados aktyvavimas vyksta per vieną iš trijų nepriklausomų kelių, tačiau *S. aureus* mažina arba atideda opsonizaciją taikant universalų komplemento aktyvavimo žingsnį: faktorių C3 (komplemento sistemos baltymas) ir jo aktyvacijos kompleksus, taip pat vadinamus C3 konvertazėmis (Muller-eberhard ir Jolla, 1988; Rooijackers, 2014).

Šios bakterijos blokuoja C3 konvertazėmis per stafilokokų komplemento inhibitorių (angl. *staphylococcal complement inhibitor*, toliau SCIN) arba SCIN-B ir SCIN-C homologus arba su išorinio fibrinogeno prisijungimo baltymu ir jo homologu, išoriniu komplemento prisijungimo baltymu (Jongerius ir kt., 2007). *S. aureus* išskiria metaloproteinazę, aureoliziną, kuris skaldo ir inaktyvina C3 (Horswill ir Rooijackers, 2011), bei pritraukia komplemento inhibicinius faktorius H ir I per paviršiuje pritvirtintus baltymus SdrE ir sukibimo faktorių A (angl. *clumping factor A*, toliau ClfA), kita kryptimi skatinant C3 skilimą (Hair ir kt., 2010). Stafilokokai taiko komplemento faktorių C5 per SSL7 išskyrimą. Norėdami užkirsti kelią opsonizacijai Ig, *S. aureus* išsivystė Ig prisijungimo faktorius, tokius kaip stafilokokinis baltymas A (angl. *staphylococcal protein A*, SpA), stafilokokinis Ig ryšys ir SSL10. Kiekvienas iš šių faktorių blokuoja opsonizuojančių antikūnų Fcγ efektorinį domeną (Itoh ir kt., 2010; Smith ir kt., 2011). Stafilokinazė (angl. *staphylokinase*, Sak) generuoja fermentiškai aktyvų plazminą, kuris skaldo fibriną, Ig ir C3, esančius ant bakterijų paviršiaus (Rooijackers ir kt., 2005).

Stafilokokai turi keletą būdų, kaip sukurti apsauginį apvalkalą, sudarytą iš polisacharidinės kapsulės arba fibrino; toks apvalkalas trukdo neutrofilams ar makrofagams fagocituoti stafilokokus (Riordan ir Lee, 2004; Guggenberger ir kt., 2012).

### **1.1.3. *C. guilliermondii* biologija ir morfologija**

Eukariotinis askomicetinis mieliagybis *C. guilliermondii* (teleomorfinė būseną *Pichia guilliermondii*) yra genetiškai heterogeniškas kompleksas, apimantis daugybę fenotipiškai neatskiriamų taksonų, kurie buvo suvesti į sinonimiją, įskaitant *Candida fermentati* (*Pichia caribbica*) ir *Candida*

*carophila*, arba priskirti nauji pavadinimai. *C. guilliermondii* yra labiau nutolusi nuo *Candida albicans* nei *Candida tropicalis*, tačiau yra artimesnė nei *Candida lusitaniae*. *C. guilliermondii*, kaip ir *C. albicans*, *C. tropicalis* ir *C. lusitaniae*, tripletas CTG koduoja seriną vietoj leucino, o tai išskiria šias rūšis iš kitų labiau nutolusių hemiascomicetų, kaip *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae* ir *Candida glabrata* (Sibirny ir Boretsky, 2009). Šis organizmas yra natūraliai randamas žmogaus odos ar gleivinės paviršiuje, tačiau taip pat yra plačiai paplitęs gamtoje ir dažnai išskiriamas iš naftos turinčio dirvožemio, vabzdžių, augalų, jūros vandens, perdirbtų maisto produktų (Savini, Catavittello, Onofrillo, ir kt., 2010).

*C. guilliermondii* kolonijos paprastai yra lygaus paviršiaus, plokščios, dažniausiai pailgos formos ir drėgnos, pasižyminčios kreminės ar geltonos spalvos pigmentacija. Šie mieliagrybiai negeba sukurti tikrųjų hifų, tačiau, esant tam tikroms aplinkos sąlygoms, pavyzdžiui azoto ar anglies trūkumui, šios pumpuruojančios mielės gali efektyviai pereiti į pseudohifinę struktūrą, kurioje yra blastokonidijų cirkuliaras (Kreger-van Rij, 1970). Be to, šios mielės yra linkusios formuoti bioplėveles (Sachivkina, Podoprigora ir Bokov, 2021). Būdama heterotaline rūšimi, t.y. egzistuoja ir haploidinės ir diploidinės būsenos, šios mielės geba poruotis ir sporuliuoti. Visi žinomi kamienai nenaudoja laktozės, krakmolo ir inozitolio, tačiau skiriasi gebėjimu naudoti D-ribozę, D-arabinozę, D-celiobiozę, D-melibiozę, saliciną, L-ramnozę, L-sorbozę ir dulcitolį. Taip pat metabolizuoja angliavandenilius (natūralius mišinius ar nheksadekaną) kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. *C. guilliermondii* yra aerobinis mieliagrybis ir negali augti griežtai anaerobinėmis sąlygomis. Jų standartinė augimo temperatūra yra 30 C°, o viršutinė riba siekia beveik 42 C° (Sibirny ir Boretsky, 2009; Shavlovskiĭ ir kt., 1979).

Šios mielės sudomino tyrėjus savo gebėjimu naudoti angliavandenilius kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį bei gebėjimu konvertuoti ksilozę į ksilitolį – antikariesinį saldiklį (Carvalho ir kt., 2002; Rodrigues ir kt., 2006). Šios mielės yra efektyviausias organizmas biokonversijai iš ksilozės į ksilitolį ir gali naudoti net hemiceliuliozės hidrolizatus, gautus rūgštinės hidrolizės būdu bei perprodukuoti riboflaviną (vitaminą B2) augant geležies stokojančioje terpėje (Tanner, Vojnovich ir Lanen, 1944; Canettieri, Silva ir Felipe, 2001). Be to, šios mielės yra perspektyvus fermentų (pvz., inulinazės) (Guo ir kt., 2009), biodegalų (Schirmer-michel ir kt., 2008) ir aromatinių medžiagų šaltinis (Wah ir kt., 2013).

#### **1.1.4. *C. guilliermondii* patogeniškumas ir virulentiškumas**

*Candida* rūšių infekcijos yra svarbi hospitalinių kraujotakos infekcijų priežastis. *C. guilliermondii* anksčiau laikyta nedažna kandidozės sukėlėja (Wenzel ir Gennings, 2005), tačiau pastaraisiais metais ji

tapo dažna kandidozės sukėlėja ir net antra pagal dažnumą *Candida* rūšimi, sukeliančia kraujo infekcijas Kinijos ligoninėse (Chen *et al.*, 2020). Per daugelį metų klinikinėje aplinkoje šios mielės kaip grybelio sukėlėjos buvo rastos kraujo, minkštųjų audinių bei šlapimo ir lytinių takų (rečiau) mėginiuose (Savini, Catavittello, Di, ir kt., 2010). Taip pat yra pastebėta, jog įsisenėjusios ir sisteminės infekcijos silpniems pacientams dažnai baigiasi mirtimi, ypač sergantiems onkologinėmis ligomis, kuriems *C. guilliermondii* yra pagrindinė fungemijos priežastis. Tačiau tarp žmogaus imunodeficito virusu (toliau, ŽIV) sergančių pacientų šių mieliagybių nepasitaiko (Mcmanners, 1990; Wingard, Marrow ir Program, 1995; Reichard ir kt., 2007). *C. guilliermondii* infekcijų pasireiškimas apima celiulitą (dėl kateterio įvedimo), odos bėrimus, onichomikoze, makšties kandidoze, besimptomę kandidurija, osteomielitą, endokarditą, septinis artritą, periodontitą, išplitusią kandidozę su daugelio organų nepakankamumu ir kandidemiją (Savini, Catavittello, Di, ir kt., 2010; Savini, Catavittello, Onofrillo, ir kt., 2010; Dibair kt., 2012).

Tyrimų metu buvo atrasti kamieniai atsparūs vaistams: azoliams, polienams ir echinokandinams. Dažniausi šios rūšies atsparumo vaistams mechanizmai yra padidėjęs eflukso siurblio aktyvumas, 14  $\alpha$ -demetilazės pokyčiai ir taškinės mutacijos FKS1 (Savini, Catavittello, Onofrillo, *et al.*, 2010).

## 1.2. Impulsinio elektrinio lauko (IEL) poveikis

Elektroporacija (impulsinis elektrinis laukas) yra ląstelių membranos permeabilizavimo (pralaidumo padidinimo) metodas. Jis yra paremtas potencialo skirtumu tarp laidaus biologinio objekto, esančio tarp dviejų elektrodų, sukuriančių elektrinį lauką. Šis metodas šiuo metu yra plačiai naudojamas biotechnologijoje ir medicinoje, skirtas vaistų ir genų pristatymui į gyvas ląsteles (Neumann ir kt., 1982). Tai alternatyvus metodas vandens sterilizavimui ir maisto konservavimui (Teissie ir kt., 2002), taip pat tai yra būtina sąlyga ląstelių elektrosujungimui (Zimmermann, 1982). Elektroporacijos reiškinį galima apibūdinti kaip membranos pralaidumo padidėjimą, kurį sukelia iš išorės taikomi trumpi ir intensyvūs elektriniai impulsai. Sukurti įvairūs teoriniai modeliai, skirti apibūdinti elektroporaciją, iš kurių tranzitinis vandens porų modelis yra plačiausiai pripažintas. Pagal šį modelį, hidrofilinės poros susidaro ląstelės membranos lipidų dvigubame sluoksnyje, kai jis yra veikiamas išoriniais elektriniais impulsais. Ląstelės membranoje hidrofobinės poros susidaro dėl membranos lipidų savaiminių spontaniškų temperatūrinių svyravimų. Tuomet, ląstelėje, kurią veikia išorinis elektrinis laukas, indukuoto transmembraninio potencialo buvimas suteikia laisvąją energiją, reikalingą membranos fosfolipidų struktūrinėms pertvarkoms ir taip sudaro sąlygas hidrofilinių porų formavimuisi. Hidrofilinės poros formuojasi tik nedidelėje membranos dalyje, kurią veikia elektrinis laukas (Tsong, 1991). Ląstelės

membranos elektroporacija vyksta, nes ląstelės membrana sustiprina taikomą išorinį elektrinį lauką, kadangi jos laidumas yra keliais dydžiais mažesnis nei ekstraląstelinės terpės ir ląstelės citoplazmos laidumai (Marszalek, Liu ir Tsong, 1990).

Elektroporacija gali būti grįžtamoji arba negrįžtamoji, priklausomai nuo elektrinių impulsų parametrų. Tai yra slenkstinis reiškinys: išorinio elektrinio lauko įtakos indukuotas transmembraninis įtampos lygis turi pasiekti kritinę vertę, kuri yra tarp 200 mV ir 1 V, kad būtų inicijuotas laikinų vandens porų susidarymas ląstelės membranoje (Kinosita ir Tsong, 1979; Zimmermann, 1982; Tsong, 1991). Norint, kad elektroporacija būtų grįžtamoji, membranos potencialas turėtų būti laikomas žemiau kritinės vertės. Tokiomis sąlygomis, po elektrinio impulso taikymo, ląstelės membrana atsistato. Priešingai, kai kritinė vertė yra viršyta, įvyksta negrįžtamoji elektroporacija, kurios metu ląstelės membrana suyra ir prarandamas ląstelės gyvybingumas (Hamilton ir Sale, 1967; Meaking ir kt., 1995).

Elektroporacijos procesas susideda iš skirtingų fazių. Pirmoji yra porų formavimasis, kuris yra ląstelės membranos atsakas į indukuotą slenkščio membraninį potencialą ir trunka kelias mikrosekundes. Antra fazė yra nuo laiko priklausomas porų dydžio didėjimas, vykstantis laiko intervale nuo šimtų mikrosekundžių iki milisekundžių ir trunkantis per visą impulsų trukmę. Paskutinė fazė yra membranos atsistatymas, kuris įvyksta po elektrinio impulso taikymo ir susideda iš porų užsandaravimo, trunkantis kelias minutes. Ši fazė stipriai priklauso nuo temperatūros ir citoskeleto vientisumo (Kinosita ir Y., 1977). Elektroporacijos pirmoji fazė gali būti matuojama stebint membranos laidumo pokyčius ir yra susijusi su trumpalaikiu tranzientiniu porų formavimu, kuris neturi įtakos molekulinei pernašai. Molekulinė pernaša per pralaidžiąją ląstelės membraną, susijusi su elektroporacija, pastebima nuo porų formavimosi fazės iki membranos pilno užsidarymo (Pavlin, Leben ir Miklav, 2007).

### **1.3. Endogeninis oksidacinis stresas**

Aerobinei medžiagų apykaitai reikia, kad ląstelės būtų veikiamos deguonies, kuris kartais nefermentiniu būdu reaguoja su ląstelių komponentais ir sukuria laisvuosius radikalus ir kitas reaktyvias molekules (Chance, Sies ir Boveris, 1979). Šie reaktyvieji šalutiniai produktai gali pažeisti visas biologines makromolekules ir taip sutrikdyti augimą ar sukelti mutacijas. Ši oksidacinė žala yra sumažinama mažomis molekulėmis, kaip gliutationas, kuris neutralizuoja kai kuriuos oksidantus, ir fermentais, kaip superoksidodismutazė ir katalazė, kurios pašalina specifinius reaktyvius produktus (Halliwell ir kt., 1986). Mikroorganizmai išvystė gana didelę antioksidacinių apsaugos priemonių įvairovę prieš skirtingus oksidacinio streso tipus. Nuo mažų, oksidantus sugeriančių molekulių, pavienių baltymų iki sudėtingų, savireguliacinių homeostatinių genetinių tinklų, šie gynybos mechanizmai šalina

ROS ir tarpininkauja taisant ląstelės pažeidimus. Oksidacija gali pažeisti visas biologines makromolekules, todėl ląstelės gyvybingumas priklauso nuo jos gebėjimo kontroliuoti oksidantų kiekį (Dempsey, 1999; Storz ir Imlay, 1999; Grant, 2001; Pomposiello ir Bruce, 2002).

Endogeninis oksidacinis stresas gali būti sukeliamas daugybės veiksnių, įskaitant aerobinį kvėpavimą, autooksidacijos reakcijas, vidinius redoksinius procesus ir antibiotikus (Pomposiello ir Bruce, 2002). Aerobinio kvėpavimo metu deguonis veikia kaip galutinis elektronų akceptorius, elektronų pernašos grandinėje, kur jo visiškai redukcija lemia vandens susidarymą. Kartais deguonis ne visiškai redukuojamas sąveikaujant su flavoproteinu (pvz., oksidazės ir monooksidazės) ir gali generuoti ROS (Messner ir Imlay, 1999). Sąveikaujant su sumažėjusiu flavoenzimų FAD (flavino adenino dinukleotidas) kofermentu, vienas ar du elektronai perduodami molekuliniam deguoniui (Müller, 1987), dėl to susidaro endogeniniai superoksido anijonai ( $O_2^-$ ) ir vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ) (Massey ir kt., 1969; Korshunov ir Imlay, 2010).

#### **1.4. Retieji žemės elementai**

Retieji žemės elementai (toliau REE) yra septyniolikos cheminių elementų grupė periodinėje lentelėje, iš kurių penkiolika lantanidai, o likę du - itris ir skandis. Skandis ir itris laikomi REE, nes jie dažniausiai pasitaiko tuose pačiuose rūdų telkiniuose kaip ir lantanidai ir pasižymi panašiomis cheminėmis savybėmis. Visi REE randami gamtoje, tačiau dėl savo reaktyvumo neegzistuoja kaip atskiri vietiniai metalai, kaip pavyzdžiui auksas, varis ir sidabras, o randami daugelyje rūdų/ su papildomais mineralais, kaip nedidelės arba pagrindinės sudedamosios dalys. Nors REE aptinkami įvairiuose mineraluose, įskaitant silikatus, karbonatus, oksidus ir fosfatus, jie netinka daugumai mineralų struktūrų ir aptinkami tik keliose geologinėse aplinkose (Castor ir Hedrick, 2001).

##### **1.4.1. REE išteklių**

Pagrindiniai ekonominiai REE mineralų šaltiniai yra bastnaesitas, monazitas ir loparitas bei lateritiniai jonų adsorbcijos moliai. Yra daugiau kaip 250 mineralų, kurių cheminėje formulėje ir kristalinėje struktūroje REE yra svarbios sudedamosios dalys. Prometis, rečiausias, o gamtinėse medžiagose aptinkami tik jo pėdsakai, kadangi jis neturi ilgalaikių arba stabilų izotopų. Nors REE sudaro reikšmingą daugelio mineralų kiekį, beveik visa produkcija kilo iš mažiau nei 10 mineralų.

Ekstrakcija iš potencialiai ekonominio REE išteklių stipriai priklauso nuo jo REE mineralogijos (Castor ir Hedrick, 2001; Dostal, 2017).

Šiuo metu pasaulinės REE atsargos pagal pagrindines šalis, tokias kaip Kinija, Brazilija, Vietnamas, Rusija ir Indija, siekia apie 130 milijonų tonų. Šie ištekliai daugiausia yra iš keturių geologinių aplinkų: karbonatitų, šarminių magminių sistemų, jonų adsorbcijos molio nuosėdų ir monazito-ksenotimo turinčių placerinių nuosėdų. Kinija, turinti trečdalį pasaulinių REE atsargų ir vis dar yra pasaulio lyderė REE tyrinėjimų ir gamybos srityje. Prieš REE išteklių pakilimą Kinijoje, JAV dominavo pasaulinėje rinkoje. „Mountain Pass“ pradėjo veikti 1965 m. ir buvo pirmaujanti gamintoja pasaulyje daugelį dešimtmečių (Barakos, 2018). Nors tyrimų laboratorijos visame pasaulyje daugiausia koncentruojasi į aukso, sidabro, vario, platinos grupės elementus, nikelio, chromo, ličio, urano, cinko, kalio ir švino, kai kurios Afrikos ir Azijos Ramiojo vandenyno šalys 2017 m. parodė susidomėjimą REE tyrinėjimais. Išskyrus Kiniją ir Indiją, tokios šalys kaip Kazachstanas, Kirgizija, Tadžikija, Uzbekistanas ir Turkmenistanas taip pat nustatė svarbius REE turinčius mineralinius atvejus, įskaitant alkalinių ugnikalnių uolienas ir karbonitus (Mihalasky ir kt., 2018).

#### 1.4.2. Nežemiški REE ištekliai

Remiantis kai kuriais naujausiais tyrimais, dabartiniai pasaulio REE telkinių rezervai bus pakankami tik mūsų kasdieniniams poreikiams dar maždaug 2500 metų. Atsižvelgiant į dabartinę paklausą, kasybos veiklą ir technologijas, tikimasi, kad kartu su numatytu gyventojų skaičiaus ir technologijų poreikių padidėjimu, neišvengiamai reikia tyrinėti kitus potencialius REE išteklius, o Žemės Mėnulis yra logiškas pirmasis taikynys, kadangi Mėnulis kadaise buvo dalis Žemės, kuri atsiskyrė ankstyvoje Saulės sistemos istorijoje. Lyginant su žemiškaisiais mineraliniais telkiniais REE kiekiai užfiksuotuose mėnulio uolų fazių pėdsakuose, yra nedideli. Šiuo metu jokių geologinių, mineraloginių ar cheminių įrodymų, patvirtinančių, kad Mėnulyje REE yra tokios koncentracijos, kuri leistų juos priskirti rūdoms, nėra. Tačiau *Procellarum KREEP Terrane* regionas dar nėra kartografuotas didele raiška ir turi potencialo, kad jame bus atrastos didesnės REE koncentracijos vietiniu mastu (< 10 km). Todėl būsimi Mėnulio tyrinėjimai ir kartografavimas gali atskleisti naujų REE telkinių. Be Mėnulio, Marse REE randama apatite, merilite, vitlokite ir ksenotime. Šios fazės yra palyginti nedidelės iki šiol tirtų meteoritų sudedamosios dalys, sudarančios < 0,6 % viso mėginio (McLeod ir Krekeler, 2017).

#### 1.4.3. REE nuosėdų rūšys

Nors REE yra santykinai gausu Žemės plutoje, skirtingai nei dauguma kitų metalų, jie retai susikoncentruoja į išgryninamus mineralinius telkinius. Potencialius REE telkinius galima suskirstyti į



pirminius ir antrinius telkinius. Pirminiai telkiniai susidaro magminių, hidroterminių ir / arba metamorfinių procesų metu. Šie telkiniai dažniausiai siejami su šarminėmis-magminėmis uolienomis ir karbonatitais. Antriniai telkiniai susidaro dėl erozijos ir oro sąlygų (pvz.: temperatūros pokyčiai, drėgmė) ir gali apimti placerinius, laterito ir boksito telkinius. Šių dviejų grupių REE telkiniai gali būti toliau skirstomi, priklausomai nuo jų genetinių sąsajų, mineralogijos ir atsiradimo formos. Kadangi

REE telkiniai aptinkami įvairiose geologinėse aplinkose, juos ne itin lengva klasifikuoti į skirtingas kategorijas (Balaram, 2010).

Lantanidų atomuose išorinė elektronų orbitų konfigūracija yra tokia pati visoms rūšims, o 4f orbitalese elektronai palaipsniui užpildomi/pritraukiami didėjant atomų numeriui. 4f orbitalių užpildymas lemia labai panašias REE fizikines ir chemines savybes. REE paprastai priskiriami lengvųjų REE (angl. *light rare earth element*, toliau LREE), sunkiųjų REE (angl. *heavy rare earth element*, toliau HREE) ir kartais vidutinių arba vidurinių REE (angl. *medium rare earth element*, toliau MREE) grupėms, kur elektroninė konfigūracija yra pagrindas skirtumui tarp dviejų grupių. Elektroninių konfigūracijų f0 (visos f-būsenos yra neužimtos), f7 (pusė f-būsenų yra užimtos) ir f14 (visos f-būsenos yra užimtos) laikomos stabilesnės nei kitos konfigūracijos. Taigi šios stabilios būsenos gali veikti kaip ribos grupėms, pavyzdžiui, cerio – gadolinio (toliau Gd) elementai gali būti grupuojami į ceričius ar LREE, o terbija—lutecija—į itrinius ar HREE. Priežastis, kodėl lantanai nėra priskiriami LREE, yra ta, kad lantanai nėra f-elementai, todėl jie netinka LREE nomenklatūrai. Kitas susijęs reiškinys yra „lantanidų sutraukimas“, kuriame joninis spindulys palaipsniui mažėja nuo  $\text{La}^{3+}$  (1,06 Å)(lantanai) iki  $\text{Lu}^{3+}$  (0,85 Å) (lutecis). Vidutinė REE koncentracija Žemės plutoje svyruoja nuo ~ 130 mg/g iki ~240 mg/g ir yra didesnė nei kitų dažnai eksploatuojamų elementų bei daug didesnė nei jų atitinkamos chondritinės masės (Zepf, 2013).

#### 1.4.4. REE industrinis panaudojimas

Pastaraisiais trisdešimtmečiais didėjo REE ir jų lydinių taikymas įvairiuose technologiniuose prietaisuose, tokiuose kaip kompiuterių atmintis, DVD diskai, įkraunamosios baterijos, autokatalizatoriai, supermagnetai, mobilieji telefonai, LED šviesos šaltiniai, superlaidai, stiklo priedai, fluorescentinės medžiagos, fosfatų surišimo agentai, saulės baterijos ir magnetinio rezonanso tomografijos (toliau MRT). Dėl jų unikalių fizinių, cheminių, magnetinių ir liuminescencinių savybių šie elementai padeda sukurti daugybę technologinių pranašumų, tokių kaip veikimas sunaudojant mažiau energijos, didesnis efektyvumas, mažesnis dydis, greitis, ilgaamžiškumas ir temperatūrinis stabilumas, šie

metalai yra naudojami įvairiose srityse rekordiniu tempu. Šiuo metu jų paklausa yra ypač didelė energijos taupymo prietaisuose (žaliosios technologijos), kurie yra greitesni, lengvesni, mažesni ir efektyvesni (Balaram, 2016).

#### 1.4.5. REE poveikis aplinkai ir sveikatai

Aplinkos užterštumas skirtingomis toksiškomis neorganinėmis, organinėmis ir organometalinėmis rūšimis yra viena rimčiausių problemų šiandieniniame pasaulyje. REE grupė atstovauja svarbiems elementams, randamiems aplinkoje, ir juos reikia išsamiau ištirti, siekiant suprasti jų poveikį žmogaus sveikatai. Aplinkos mokslininkai dirba prie gerai žinomų toksiškų mikroelementų, tokių kaip švinas, kadmis, gyvsidabris ir uranas, neigiamų poveikių (Sparks, 2005; Rani ir kt., 2013). Didžiulis elektroninės įrangos atliekų kiekio išmetimas, palengvina šių elementų, kartu su keletu kitų toksiškų elementų, išleidimą į požeminius sluoksnius ir gruntinius vandenis. Žinoma, kad REE yra judresni tirpale, kuriame yra  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $CO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$  jonų. Be to, didžiuliai REE kiekiai patenka į žemės ūkio dirvožemius per fosfatų pagrindu pagamintas trąšas (Balaram, 2016; Vysetti, 2016). Natūraliomis sąlygomis REE gali tapti prieinami tik mažais kiekiais per gruntinį vandenį ir atmosferą, tačiau dažnesnis jų naudojimas padidino REE kiekį ir sukūrė kelis naujus būdus bioakumuliacijai (nuodingų medžiagų susikaupimas augaluose, gyvūnuose ir žmonėse). REE kiekio vandenyje, tiek paviršiniame, tiek požeminiame, lygis labai kinta ir tai daugiausia priklauso nuo vietinės geologijos. Deja, maksimalūs leidžiami REE kiekiai geriamajame vandenyje nėra pateikiami jokios tarptautinės sveikatos organizacijos, taip pat nėra pakankamai duomenų apie jų toksinį poveikį žmogaus sveikatai (Al-rimawi, Kanan ir Qutob, 2013).

2013 metais atlikto Al-Rimawi tyrimo metu buvo pastebėta labai dideli REE ir kitų metalų koncentracijų lygiai požeminiuose vandens mėginiuose iš pietų Vakarų kranto / Palestinos. Tyrėjai pareiškė susirūpinimą, kad daugelis jų neturi maksimalių leidžiamų ribų, be to nėra pakankamai duomenų apie jų toksinį poveikį žmogaus sveikatai (Al-rimawi, Kanan ir Qutob, 2013). Vienas pagrindinių užterštumo tipų, pastebėtas Europoje ir JAV yra susijęs su gadoliniu, kuris naudojamas kaip kontrastingas agentas MRT. Iš organizmo išsiskyręs su šlapimu, jis beveik nepakitęs praeina per nuotekų valymo įrenginius į vandens ekosistemą. Todėl tikimasi, kad upės, tekančios per gausiai apgyvendintas urbanizuotas teritorijas, šalyse su išsivysčiusia sveikatos priežiūros sistema, turės didelę teigiamą Gd anomaliją (Bau, Knappe ir Dulski, 2006).

Intensyvūs REE gavybos ir gamybos veiksmai sukėlė reikšmingų aplinkos ir sveikatos poveikių šalyse kaip Kinija, JAV, Indija, Malaizija ir Brazilija. Gavybos veiksmai, kaip kasimas, gręžimas,

sprogdinimas, transportavimas, saugojimas ir perdirbimas, išskiria dulkes, kuriose yra REE, kitų toksiškų metalų bei chemikalų, kurie patenka į orą ir apylinkės vandens telkinius bei gali paveikti vietinę dirvą, gyvūniją, augmeniją bei žmones. Didesnė REE gavyba reikštų didesnę aplinkos degradaciją ir pavojų žmogaus sveikatai, nes atliekų šalinimo plotai gali būti veikiami atmosferos sąlygų ir turi potencialą užteršti orą, dirvą ir vandenį, jei nėra naudojama pakankamai apsaugos priemonių utilizacijos užtikrinimui (Barakos, 2015). Viena iš svarbiausių problemų yra rūdos radioaktyvumas, pavyzdžiui, uranas ir toris sudaro reikšmingus radioaktyviųjų elementų kiekius. Dauguma žalingų REE poveikių žmonėms ir jų sveikatai yra nustatyta remiantis kasyklų darbuotojais ir kitais žmonėmis, kurie reguliariai dirba su REE arba jų produktais. Tyrimai rodo, kad chemikalai, naudojami rūdos perdirbimo, išskyrimo ir rafinavimo procesuose, buvo atsakingi už darbuotojų ir vietinių gyventojų sveikatos pavojus, vandens taršą ir dirbamos žemės naikinimą (Rim ir kt. 2013).

Taip pat yra pranešimų apie REE poveikį darbuotojams, kuris sukėlė bioakumuliaciją ir neigiamą poveikį kvėpavimo takams (Sabbioni ir kt., 1982; Yoon ir kt., 2005; Rim, 2017).

Be to, REE yra naudojami žemės ūkyje kaip trąšos, siekiant pagerinti augalų augimą ir derlingumą, dėl to REE koncentracijos dirvožemyje dar labiau didėja (Tyler, 2004). Paprastai mineralinės trąšos (pvz., fosfatų trąšos) ir dirvožemio kondicionieriai turi makroelementų (kalcis, magnis, azotas, fosforas ir siera), mikroelementų (pvz., geležis ir silicis) bei REE. Dirvožemyje REE taip pat gali atsirasti iš pagrindinių vietinių geologinių medžiagų. REE turinčios mikrotrąšos Kinijoje tiesiogiai dideliu mastu naudojamos augalams, siekiant pagerinti derlių ir kokybę (Diatloff, Smith ir Asher, 1989). Apskritai, augaluose sukauptos REE koncentracijos pranešamos kaip labai mažos. Tačiau tam tikro augalo kaupimo gebėjimas priklauso nuo kelių veiksnių, kaip augalų rūšys, jų augimo sąlygos, REE kiekio substrato dirvožemyje ar uolienose (Fu ir kt., 2001). Pavyzdžiui, didesnės vertės buvo nustatytos ryžiuose, kas parodė, kad ryžiai kaupia daugiau REE nei kukurūzai. Dėl pernelyg didelio REE naudojimo žemės ūkyje, kyla aplinkosaugos susirūpinimas, kad šie elementai gali patekti į maisto grandinę per augalus, o tai gali būti žalinga žmonių sveikatai. Kai kurie tyrimai patvirtino, kad REE koncentracija javų grūduose yra labai maža ir tręšiant REE reikšmingo susikaupimo nėra. Todėl grūdai ir jų produktai, kaip kvietiniai miltai, laikomi saugiais (Redling, 2006).

Šių elementų unikalios savybės, kaip radiacijos emisija ar magnetizmas, leidžia REE taikyti daugybėje terapijų ir diagnostikų šiuolaikinėje medicinoje. Kelių tyrimų metu buvo patvirtintos antibakterinės ir priešgrybelinės REE savybės (Zhang ir kt., 1999; Wakabayashi ir kt., 2016). Pavyzdžiui, Gd yra naudojamas chelatinu pavidalu kaip kontrastinė medžiaga MRT (Raju ir kt., 2010), nors nauji

tyrimai pateikia tiesioginius įrodymus apie Gd nusėdimą nervų audiniuose, kuris gali būti kenksmingas pacientams (McDonald ir kt., 2015; Gulani ir kt., 2017). Nauji medicinos taikymo būdai šiems elementams yra atrandami vis dažniau, o naujos technologijos, kaip nanotechnologija, gali dar labiau padidinti REE naudojimą medicinoje ateityje (Zhang ir kt., 1999)

#### 1.4.6. Lantanas (*Lanthanum*)

Lantanas yra vienas iš REE, priklausantis lantanoidų grupei. Lantanoidai dažniausiai skirstomi į dvi dalis pagal jų elektronų konfigūraciją. LREE (su atominiais numeriais nuo 57 iki 64, dar vadinama cerio grupe), kita grupė – HREE (su atominiais numeriais nuo 65 iki 71). Lantano atominis numeris yra 57, todėl jis priklauso LREE. Lantano atominis spindulys yra 1,877 Å, o jo elektronų konfigūracija yra  $5d^16s^2$ . Nors lantanas yra retųjų žemių metalas, jis yra gana gausus Žemės plutoje, kur jo gausumas (atominio santykio) yra 30 ppm. Šis rodiklis yra labai panašus į nikelio ir vario gausumą (Gschneidner, 1964).

Lantano fizinės ir cheminės savybės labai priklauso nuo jo elektronų konfigūracijos. Lantanas lengvai sudaro stabilų  $La^{3+}$  joną dėl elektronų praradimo iš  $5d^16s^2$  orbitalių. Be to, jis egzistuoja tik  $La^{3+}$  jono pavidalu dėl itin stabilios inertinių dujų konfigūracijos bei  $f^0$  konfigūracijos. Kadangi  $f$  orbitalėje nėra elektronų, lantanas sunkiai sudaro kompleksus su koordinaciniais ligandais, išskyrus kai kuriuos stiprių ligandų (pvz., deguonies turinčių ligandų) atvejus. Kadangi  $La^{3+}$  jono dydis yra palyginti didelis su inertinių dujų konfigūracija, sąveika tarp  $La^{3+}$  jono ir ligando dažniausiai yra elektrostatinė trauka, panaši į joninę jungtį. Kita vertus, kovalentinis poveikis tarp jų yra silpnas, todėl lantano jonų kompleksai dažnai pakeičiami labiau elektroneigiamais ligandais (Cotton, 2013). Remiantis kietosminkštos, rūgšties-bazės teorijomis (Pearson, 1990), lantanas turi aukštą afinitetą deguonį turintiems ligandams, tokiems kaip fosfato ir nitrato jonai, todėl sudaro netirpius lantano teršalų (ang. *Lapollutant*) kompleksus net esant mažai koncentracijai (Xie, Wang, Fang, ir kt., 2014; Xie, Wang, Lu, ir kt., 2014).

Taip pat, atliktų tyrimų metu, buvo nustatyta, jog lantanas gali būti naudojamas kaip antibakterinė medžiaga (Balusamy ir kt., 2012), katalizinis agentas (Nejad ir kt., 2010) bei adsorbentas (Wang ir kt., 2015, 2016). Lantano adsorbcijos tankis (molių santykis tarp adsorbento ir lantano) dažniausiai yra aukštas, rodo, kad lantanas yra vienas efektyviausių elementų teršalų adsorbcijai iš nuotekų. Lantano junginiai dažniausiai veikia plačiame pH intervale ir pasižymi dideliu šalinimo efektyvumu (Dong ir Wang, 2016). Taip pat, Firsching ir Brune 1991 metais tyrė lantano-fosfato komplekso tirpumą ir nustatė jo tirpumo produktą ( $K_{sp}$ ) atitinkamai 24.76 ir 27.92 vandeniniame tirpale ir jūros vandenyje. Tai yra mažiausiai tirpus tarp retasis žemių fosfatų kompleksas. Atsižvelgiant į palyginant mažas medžiagų

sąnaudas ir puikias taikymo savybes, lantanas vertas tolesnių tyrimų. Be to, lantano kaina yra maža dėl jo didelio gausumo žemės plutoje ir mažo toksiškumo (Firsching ir Brune, 1991).

#### **1.4.7. Lantano (III) nitrato heksahidratas**

Narasimhulu atliktame tyrime 2007 metais, buvo nustatyta, kad  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  leidžia efektyviai sintetinti  $\alpha$ -aminonitrus per vieno indo trijų komponentų jungimą, susidedantį iš karbonilo junginio, amino ir trimetilsililcianido (angl. *trimethylsilyl cyanide*, TMS-CN). Šios metodologijos pagrindiniai bruožai: bendras pritaikomumas skirtingiems aldehidų ir aminių tipams, pigūs ir komerciškai prieinami reagentai, trumpi reakcijos laikai ir didelė produktų išeiga. Galiausiai, šiame tyrime buvo aprašomi aplinkai nekenksmingi cheminiai procesai (Narasimhulu ir kt., 2007). Taip pat, kito tyrimo metu, vykdant tęstinius chemoselektyvių reagentų paieškos tyrimus, buvo nustatyta, kad  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  yra švelnus ir efektyvus katalizatorius pirminių alkoholių chemoselektyviai tetrahidropiranyliacijai, chemoselektyviai acetonidų deprotektinimui ir kvinazolinonų sintezei. Be to, buvo pastebėta, jog  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  yra efektyvus ir švelnus rūgštinis katalizatorius alkoholio acetilimui naudojant  $\text{Ac}_2\text{O}$  be tirpiklių. Šie rezultatai parodė, kad acto anhidridas ir  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  yra puikus derinys alkoholio, fenolio ir amino acetilimui be tirpiklių (Reddy ir kt., 2006).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

Gamintojas – CARL ROTH:

- D(+)-gliukozės monohidratas;
- Mielių ekstraktas;
- Agaras;
- Peptonas;
- Triptono sojų agaras (angl. *tryptone soy agar*, toliau TSA);
- Triptono sojų mitybinė terpė (angl. *tryptic soy broth*, toliau TSB);
- Lantano (III) nitrato heksahidratas –  $(\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O})$ ;
- Natrio chloridas.

Gamintojas – Merck:

- Poli-L-lizinas.

Gamintojas – Calbiochem:

- ab113851 DCFDA/H2DCFDA C ląstelių ROS analizės rinkinys.

#### 2.1.1. Mitybinės terpės

Terpių sudėtis nurodyta **2.1 lentelėje**, pateiktas reikalingas medžiagų kiekis, kuris ištirpintas 1 l dejonizuoto vandens. Prieš išpilstant į Petri lėkšteles terpės autoklavuotos esant 0,8 atm. Agaras papildomai pridėtas tik gaminant kietas YPD terpes.

**2.1 lentelė.** Mitybinės terpės ir jų sudėtis

YPD (mielių ekstrakto- peptono-dekstrozės)	D(+)-gliukozės monohidratas, 20 g/l; Peptonas, 20 g/l; Mielių ekstraktas, 10 g/l; Agaras, 20 g/l.
TSA (triptono sojų agaras)	Kasos kazeino virškinimas kasoje, 17 g/l; Sojos pupelių miltų virškinimas, 3 g/l; Natrio chloridas, 5 g/l;

	Dekstrozė (gliukozė), 2,5 g/l; Diklio vandenilio fosfatas, 2,5 g/l; Agaras, 15 g/l.
TSB (triptono sojų mitybinė terpė)	Kazeino peptonas (kasos), 17 g/l; Diklio vandenilio fosfatas, 2,5 g/l; Gliukozės monohidratas, 2,5 g/l; Natrio chloridas, 5 g/l; Sojų peptonas (suvirškintas papainas), 3 g/l.

### 2.1.2. Prietaisai

Darbe naudoti prietaisai ir pasirinkti parametrai:

- termopurtyklė, 130 rpm, 30 °C, 37 °C (CERTOMAT U);
- termostatas, 30 °C, 37 °C (Binder); šaldytuvas, 4 °C (Snaigė);
- impulsinio elektrinio lauko kvadratinių bangų generatorius, 1 μs ×100, 10 μs ×10, 100 μs ×1 trukmės, 5, 10 ir 15 kV/cm stiprio impulsai (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Aukšto magnetinio lauko institutas);
- osciloskopas (Owon TAO3000 Series 4CH 8/14bit Tablet);
- biofotometras OD 600 nm (Eppendorf);
- stalinė centrifuga, 6000 rpm, 30 / 60 s (Eppendorf);
- laminarinis boksas, II saugumo klasė (ScanLAF);
- mikroskopas (Olympus ix83, programa „cellSens“);
- mikrotitracinių plokštelių skaitytuvas (Varioscan Flash Thermo fisher scientific, programa ScanIt).
- įkrovai buvo naudojama standartinė komercinė elektroporacijos kiuvetė su 1 mm tarpu tarp aliuminio elektrodų (Eppendorf).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Tyrimo objektas

Šiame tyrime naudoti du organizmai – *S. aureus* ir *C. guilliermondii*. Mikroorganizmai gauti iš Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros (Vilniaus Universitetas, Gyvybės mokslų centras) ląstelių

kolekcijos. Ląstelių kolonijos augintos ant sterilių agarizuotų terpių. Bakterijų ląstelės augintos 24 valandas ant TSA agarizuotos mitybinės terpės 37 °C termostate. Mielių ląstelės augintos 48 valandas ant agarizuotos YPD terpės 30 °C termostate.

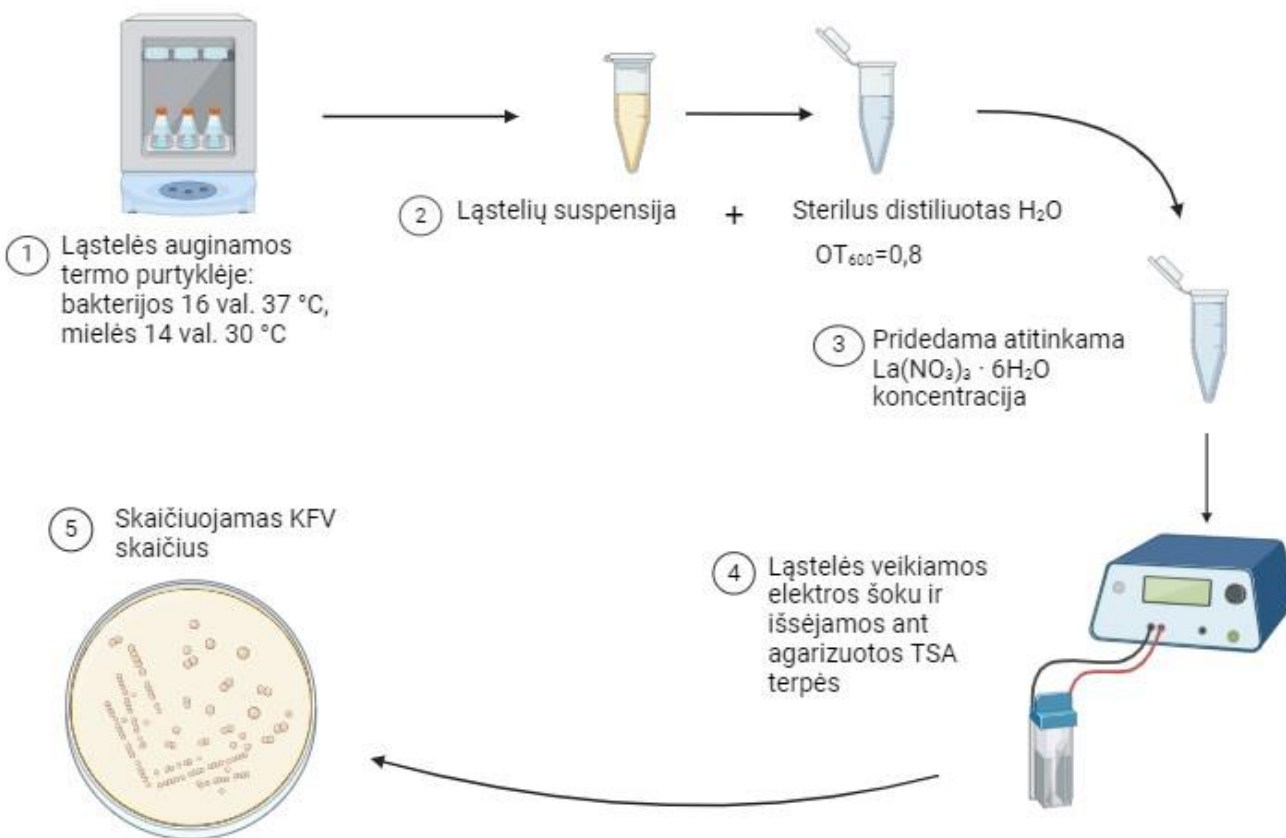
### **2.2.2. Minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) nustatymas**

Tirti mikroorganizmai auginti rotacinėje purtyklėje, 130 RPM: mielės – YPD skystoje terpėje 12 val. 30 °C, bakterijos – TSB skystoje terpėje 16 val. 37 °C. Eksperimentui naudota  $OT_{600} = 1$  ląstelės koncentracija. Minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) nustatymui 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai užpildyti skirtingomis  $La(NO_3)_3 \times 6H_2O$  koncentracijomis, skiedimui naudotas sterilus distiliuotas  $H_2O$ , santykiu 1:1. Mielių plokštelės laikytos 48 val, 30 °C temperatūros termostate, o bakterijų 16 val. 37 °C ir praėjus inkubacijos periodui iš kiekvieno šulinėlio, 5  $\mu$ l išsėti ant agarizuotų mitybinių terpių. Neapverstos lėkštelės laikytos 48 val. mielės – 30 °C temperatūros termostate, bakterijos – 24 val 37 °C temperatūros termostate. Praėjus inkubaciniam periodui įvertintas mikroorganizmų augimas ir nustatyta MIK.

### **2.2.3. Elektros šoko poveikis**

Prieš elektroporaciją bakterijos augintos ant agarizuoto terpės 24 val. 37 °C termostate, mielės – 48 val. 30 °C termostate. Mikroorganizmams užaugus, pasirinkta kolonija perkelta į 5 ml terpės mėgintuvėlį, auginama rotacinėje purtyklėje, mielės – 14 val. 30 °C, 130 rpm, o bakterijos 16 val. 37 °C, 130 rpm. Elektros šoko poveikiui įvertinti, mėginiai 3 min. centrifuguoti 6000 aps/min., supernatantas nupiltas. Ląstelės du kartus praplautos 1 ml sterilaus vandens, ir resuspenduotos 1 ml sterilaus vandens, kuris naudotas kaip elektroporacijos terpė. Prieš elektroporaciją ląstelės skiestos iki  $OT_{600} = [0,8-0,9]$  ir sumaišytos 1:1 santykiu su atitinkamos koncentracijos  $La(NO_3)_3 \times 6H_2O$  (šio darbo metu gautais MIK/2). 85  $\mu$ l suspensijos perkelta į 1 mm elektroporacijos kiuvetę ir veikta skirtingo stiprio ir trukmės impulsiniu elektriniu lauku. Po elektroporacijos iš kiuvetės yra perkeltos 80  $\mu$ L ląstelių suspensijos, praėjus 10 min. pridėta 720  $\mu$ L, 0,9 % fiziologinio tirpalo ir 100  $\mu$ L išsėjama ant agarizuotos terpės. Bakterijos augintos 37 °C, 24 val., tuo tarpu mielės augintos 30 °C, 48 val. Po inkubacijos periodo skaičiuotas užaugusių kolonijų skaičius. Visi skaičiavimai, grafikų braižymas ir statistinė analizė atlikti, naudojantis „Microsoft Excel“ programa. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas porinis T-testas (angl. *two-tailed*). Eksperimento metu 0,9 % fiziologinis tirpalas naudojamas kaip gaivinimui skirta medžiaga po elektroporacijos, kad būtų užtikrintas ląstelės gyvybingumas (**2.1 pav**).





**2.1 pav.** Darbo eigos schema ir metodai

Šaltinis: sukurta darbo autorės, naudojantis internetine BioRender programa.

#### 2.2.4. La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O poveikis mikroorganizmams laike

Visi 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai užpildyti 100 μl skirtingomis La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O koncentracijomis ir 100 μl ląstelių suspensijomis (OT<sub>600</sub> = 1). Mielėms paveiktos 3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml koncentracijos, bakterijos – 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml koncentracijos. Teigiamą kontrolę – ląstelių suspensija terpėje, neigiamą – sterili terpė su atitinkamomis La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O koncentracijomis. Plokštelė statyta į mikrotitracinių plokštelių skaitytuvą ir laikyta jame atitinkamą laiką (bakterijos – 24 val., mielės – 48 val.) atitinkamoje mikroorganizmams temperatūroje. Matuotas OT<sub>600</sub>: bakterijų po 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 val., o mielių tokiu pačiu principu 36 val. Prieš kiekvieną matavimą plokštelė silpnai (intensyvumas 2, 3 s) supurtyta. Gauti duomenys išsaugoti ir analizuoti „Microsoft Excel“ programoje.

## 2.2.5. Fluorescencinė mikroskopija ROS

### ROS eksperimentas su bakterijomis

Prieš eksperimentą ant visų mikroskopavimo stikliukų užlašinta 50 µl poli-L-lizino ir stikliukai inkubuoti 70 °C, 3 val. Tirti mikroorganizmai auginti rotacinėje purtyklėje, 130 rpm, skystoje TSB terpėje 16 val. 37 °C. 1 ml ląstelių nucentrifuguotas 5 min., 6000 rpm, supernatantas nupiltas, užpilta nauja terpe, matuotas  $OT_{600}$  ir praskiesta iki  $10^8$  ląstelių koncentracijos. Ląstelių suspensijos mėginiai užpilti atitinkamomis 100 µl  $La(NO_3)_3 \times 6H_2O$  koncentracijomis, gautomis šio darbo metu (MIK/2) bei 5 % acto rūgštimi (teigiama kontrolė) ir inkubuota 10 min., kambario temperatūroje. Tada buvo atliktas dažymas su rinkinyje esančiu 200 µl 20 µM DCFDA dažu ir inkubuota tamsoje 2 val., 30 °C. Praėjus inkubacijos periodui, ląstelės plautos su rinkinyje esančiu 1× buferiu. Toliau, ant švaraus objektinio stikliuko lašinta 30 µl ląstelių suspensijos. Nuotraukos darytos šviesiniu mikroskopu, naudojant 100× padidinimo objektyvą, fluorescencija taikyta 2 s (bangos ilgis 480/530).

### ROS eksperimentas su mielėmis

Prieš eksperimentą visi 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai užpildyti 70 µl poli-L-lizinu ir inkubuoti 70 °C, 3 val. Eksperimentas buvo atliktas 96 šulinėlių plokštelėje. Mielės augintos rotacinėje purtyklėje, 130 rpm, YPD skystoje terpėje 12 val., 30 °C. 1 ml ląstelių nucentrifuguotas 5 min., 6000 rpm, supernatantas nupiltas, užpilta nauja terpe, matuotas  $OT_{600}$  ir praskiesta iki  $10^8$  ląstelių koncentracijos. Ląstelių suspensijos mėginiai užpilti atitinkamomis 100 µl  $La(NO_3)_3 \times 6H_2O$  koncentracijomis, gautomis šio darbo metu (MIK/2) bei 5 % acto rūgštimi (teigiama kontrolė) ir inkubuota 10 min., kambario temperatūroje. Tada atliktas dažymas su rinkinyje esančiu 200 µl 20 µM DCFDA dažu ir inkubuota tamsoje 45 min., 30 °C temperatūroje. Praėjus inkubacijos periodui, ląstelės plautos su rinkinyje esančiu 1× buferiu. Paruoštos ląstelių suspensijos supiltos į 96 šulinėlių plokštelės šulinėlius. Nuotraukos buvo darytos šviesiniu mikroskopu, naudojant 40× padidinimo objektyvą, fluorescencija taikyta 2 s (bangos ilgis 480/530).

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) nustatymas

*S. aureus* bakterijos yra ypatingai atsparios antibiotikams ir žinomos dėl savo gebėjimo išgyventi net ir didelėms antibiotikų dozėms. Tyrime gautais rezultatai parodyta, kad bakterijų augimas sustabdytas esant  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracijoms nuo 10 mg/ml iki 4 mg/ml, tai žymima simboliu (-), reiškiančiu – jokio mikroorganizmų augimo. 3 mg/ml koncentracijoje augimas nesustabdytas (+), tai leidžia teigti, kad 4 mg/ml koncentracija yra minimali inhibitorinė koncentracija, kurioje pradeda pastebėti atsparumas  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  junginiui (**3.1 lentelė**).

*C. guilliermondii* atsparumo profilis nuo bakterijų šiek tiek skiriasi. Augimas sustabdytas aukštesnėse koncentracijose nuo 10 mg/ml iki 3 mg/ml, tai rodo (-) simbolis. 2 mg/ml ir žemesnėse koncentracijose augimas nesustabdytas (+). Tai įrodo, kad 3 mg/ml koncentracija yra minimali inhibitorinė koncentracija, kuri efektyviai stabdo šio mikroorganizmo augimą, tai leidžia manyti, kad mieliagybiai yra jautresni šio junginio poveikiui, nei *S. aureus* (**3.1 lentelė**).

**3.1 lentelė.** Tyrimo metu nustatytos  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) vertės *S. aureus* ir *C. guilliermondii*

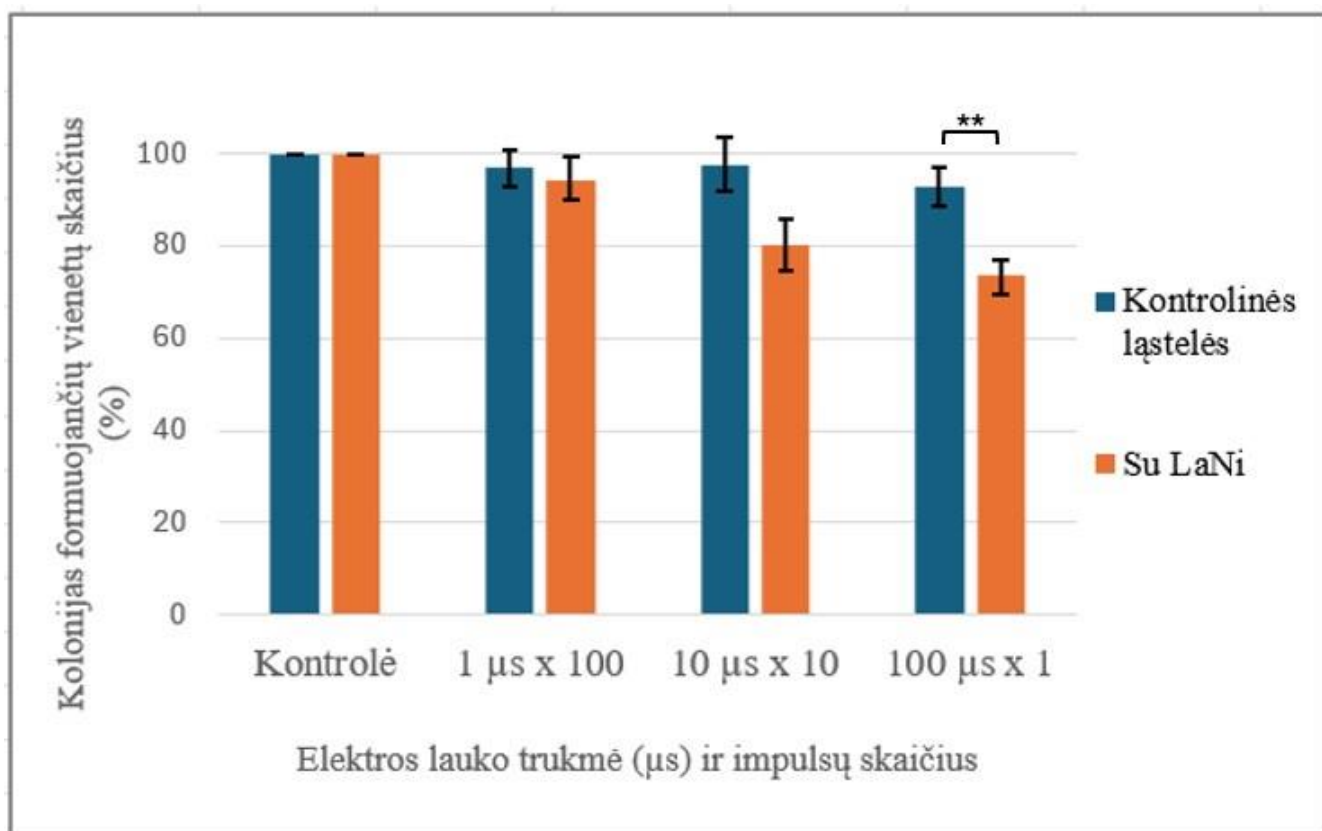
Rausva spalva bei ženklu (+) pažymėtos koncentracijos, kurios mikroorganizmų augimo nesustabdė; žalia spalva bei ženklu (-) pažymėtos koncentracijos, kurios mikroorganizmų augimą visiškai sustabdė.

La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O koncentracija	Mikroorganizmas	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
10 mg/ml	-	-
9 mg/ml	-	-
8 mg/ml	-	-
7 mg/ml	-	-
6 mg/ml	-	-
5 mg/ml	-	-
4 mg/ml	-	-
3 mg/ml	+	-
2 mg/ml	+	+
1 mg/ml	+	+

### 3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *S. aureus*

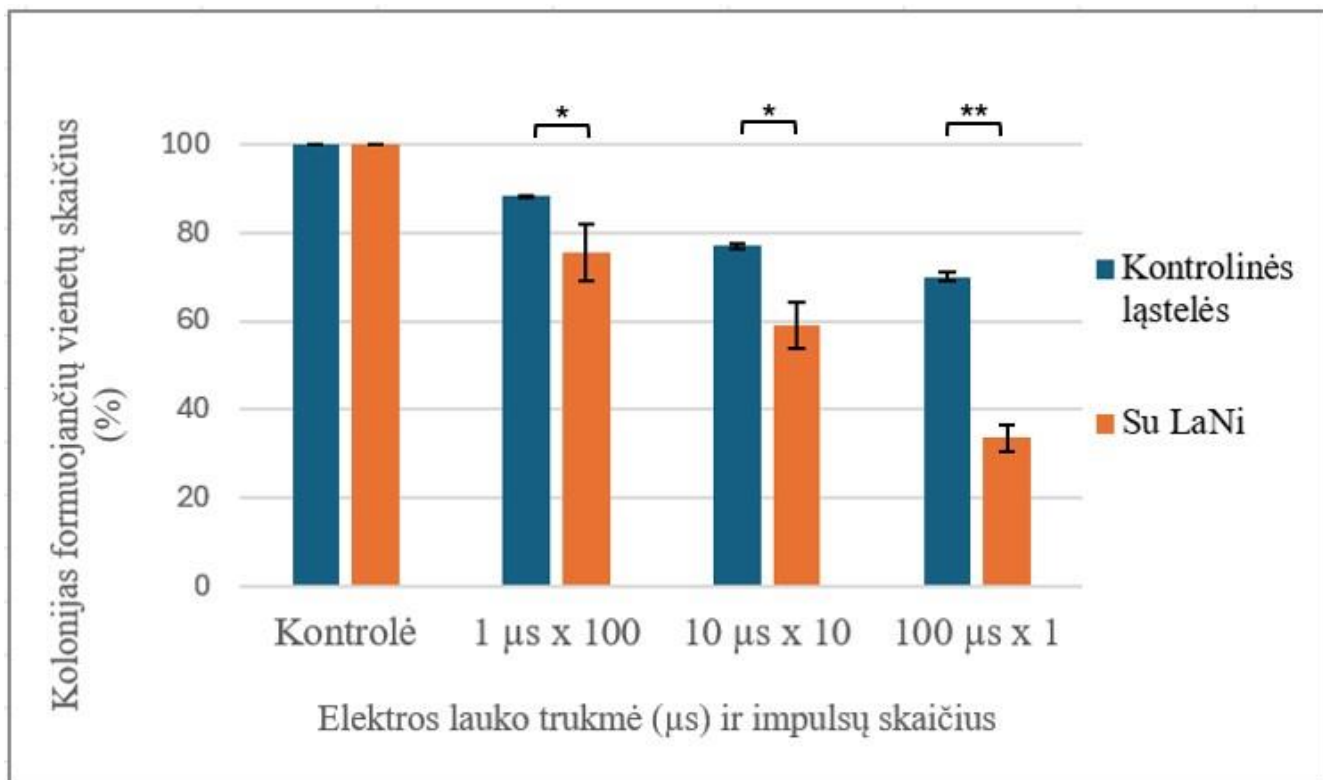
Ankstesnių tyrimų metu buvo pastebėta, jog didinant impulsinio elektrinio lauko stiprį membranų permeabilizaciją didėja, o tai paskatina ląstelių žūtį (Trziszka, 2007). Šiame tyrime nustatytas  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  2 mg/ml (pusė šio darbo metu gautos MIK) poveikis *S. aureus* bakterijoms, taikant 5 kV, 10 kV ir 15 kV impulsinį elektrinį lauką. Gauti rezultatai parodė, jog po elektros šoko į ląsteles patekęs  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  2 mg/ml ženkliai padidina ląstelių žūties tikimybę, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Taip pat, svarbu paminėti, jog darbe gauti rezultatai rodo, kad svarbus yra ne tik impulsinio elektros lauko stipris, tačiau ir laikas bei impulsų kiekis laike. Ilgesnis impulso perdavimas į ląstelę, paskatina hidrofobinių porų didėjimą, tokiu būdu į ląstelę patenka didesnis kiekis medžiagos, reikalingos užtikrinti ląstelės žūtį (Mohr, Pablo ir Palecek, 2006). Nors ląstelių gyvybingumo sumažėjimas matomas ir mikroorganizmus veikiant elektros šoku  $1 \mu\text{s}$  100 kartų, visgi nenutrūkstamas 1 elektros impulsas  $100 \mu\text{s}$  antimikrobiškai veikia stipriau.

5 kV/cm stiprio elektrinio lauko poveikio ląstelėms rezultatai pateikti **3.1 pav.** Statistinis reikšmingumas nustatytas tarp kontrolinių ląstelių ir LaNi mėginių tik taikant  $100 \mu\text{s} \times 1$  elektrinį lauką. LaNi mėginiuose ląstelių gyvybingumas buvo sumažėjęs apie 1,34 karto, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Taip pat, taikant šiuos parametrus gyvybingumas lyginant su elektros šoku nepaveiktomis ląstelėmis sumažėjo 25,57 %.



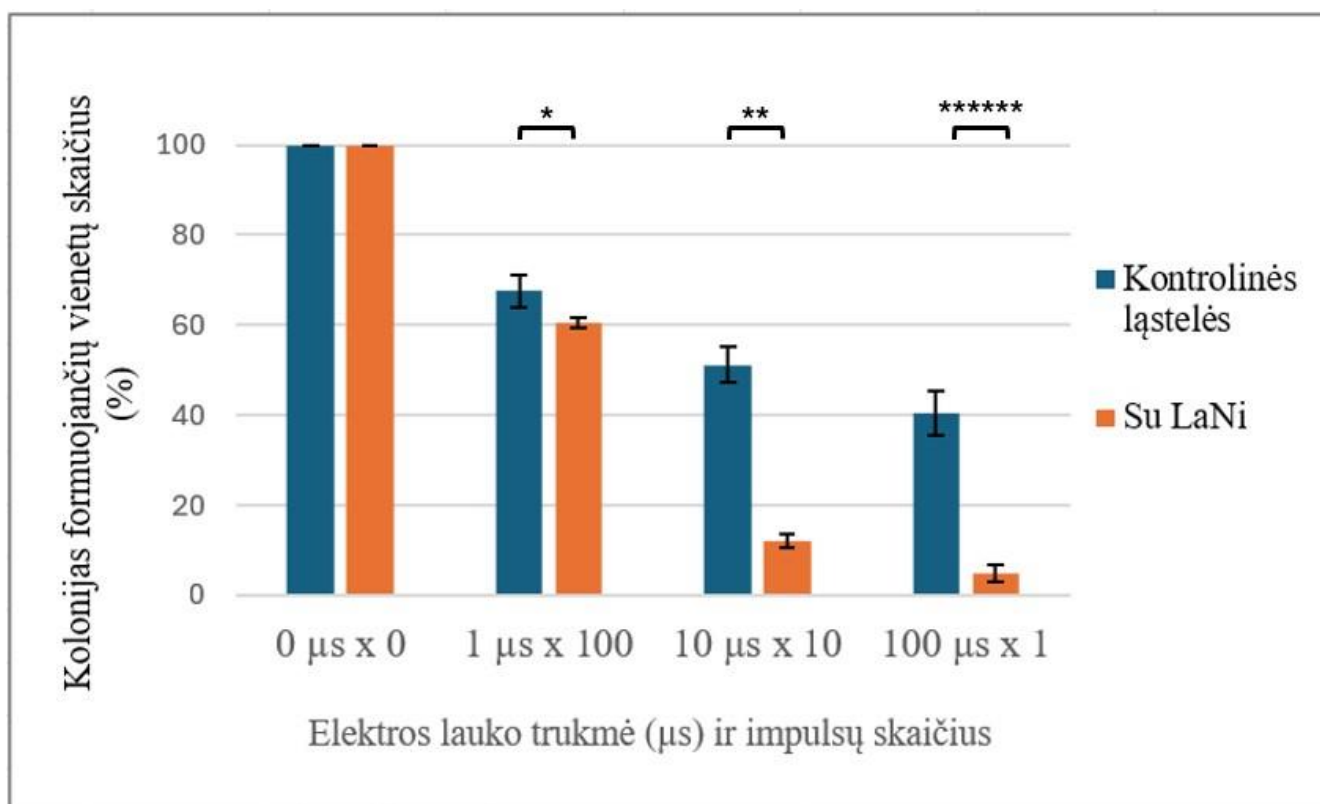
**3.1 pav.** 2 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *S. aureus* ląstelėms, taikant 5 kV/cm elektrinį lauką p reikšmė  $** \leq 0,005$ . Statistiniam reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas porinis t testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

10 kV/cm stiprio elektrinio lauko poveikio ląstelėms rezultatai pateikti (3.2.pav.). Statistiškai reikšmingiausias poveikis nustatytas tarp  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  veiktų mėginių ir kontrolinių ląstelių, jas veikiant  $100 \mu\text{s} \times 1$  impulsiniu lauku, kur LaNi veiktuose mėginiuose ląstelių gyvybingumas buvo 2,08 karto mažesnis. Tokie elektrinio impulso parametrai ląstelių gyvybingumą sumažino net 66,37 %, lyginant su ląstelėmis nepaveiktomis IEL. Taip pat statistinis reikšmingumas nustatytas tarp LaNi veiktų mėginių ir kontrolinių ląstelių taikant  $10 \mu\text{s} \times 10$  elektrinį lauką, LaNi mėginiuose ląstelių kiekis buvo 1,3 karto mažesnis. Be to, šiuos parametrus taikant, gyvybingumas lyginant su nepaveiktomis ląstelėmis buvo 40,94 % mažesnis. Praščiausias efektyvumas buvo  $1 \mu\text{s} \times 100$  parametru, kur gyvybingumas sumažėjo 24,41 %, lyginant su elektros impulsais nepaveiktomis ląstelėmis, bei 1,17 karto, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis.



**3.2. pav.** 2 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *S. aureus* ląstelėms, taikant 10 kV/cm elektrinį lauką p reikšmės: \*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ . Statistiniam reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas porinis t testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

15 kV/cm stiprio elektrinio lauko poveikio ląstelėms rezultatai pateikti (**3.2.3 pav.**). Statistiškai reikšmingiausias poveikis nustatytas tarp  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  turinčių mėginių ir kontrolinių ląstelių jas veikiant 100  $\mu\text{s} \times 1$  impulsiniu lauku. Nustatyta, jog veikiant LaNi ląsteles tokiais elektrinio lauko parametrais, gyvybingumas sumažėjo net 9,42 karto ir šis rezultatas yra statistiškai reikšmingiausias tarp visų elektrinių laukų (5 kV, 10 kV, 15 kV). Taip pat, šių parametų taikymas sumažino ląstelių gyvybingumą 95,69 % lyginant su elektros impulsais neveiktais mėginiais. Taip pat statistinis reikšmingumas matomas ir kituose LaNi veikuose mėginiuose, kur ląstelių skaičius buvo mažesnis: 1  $\mu\text{s} \times 100$  – 1,19 karto ir 10  $\mu\text{s} \times 10$  – 3,96 karto. Lyginant elektros srove veiktas ląsteles su nepaveiktom gyvybingumas sumažėjo: 1  $\mu\text{s} \times 100$  – 43,04 % ir 10  $\mu\text{s} \times 10$  – 87,06 %.



**3.3 pav.** 2 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *S. aureus* ląstelėms, taikant 15 kV/cm elektrinį lauką p reikšmės: \*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ; \*\*\*\*\*  $\leq 0,0000005$ . Statistiniam reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas porinis t testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

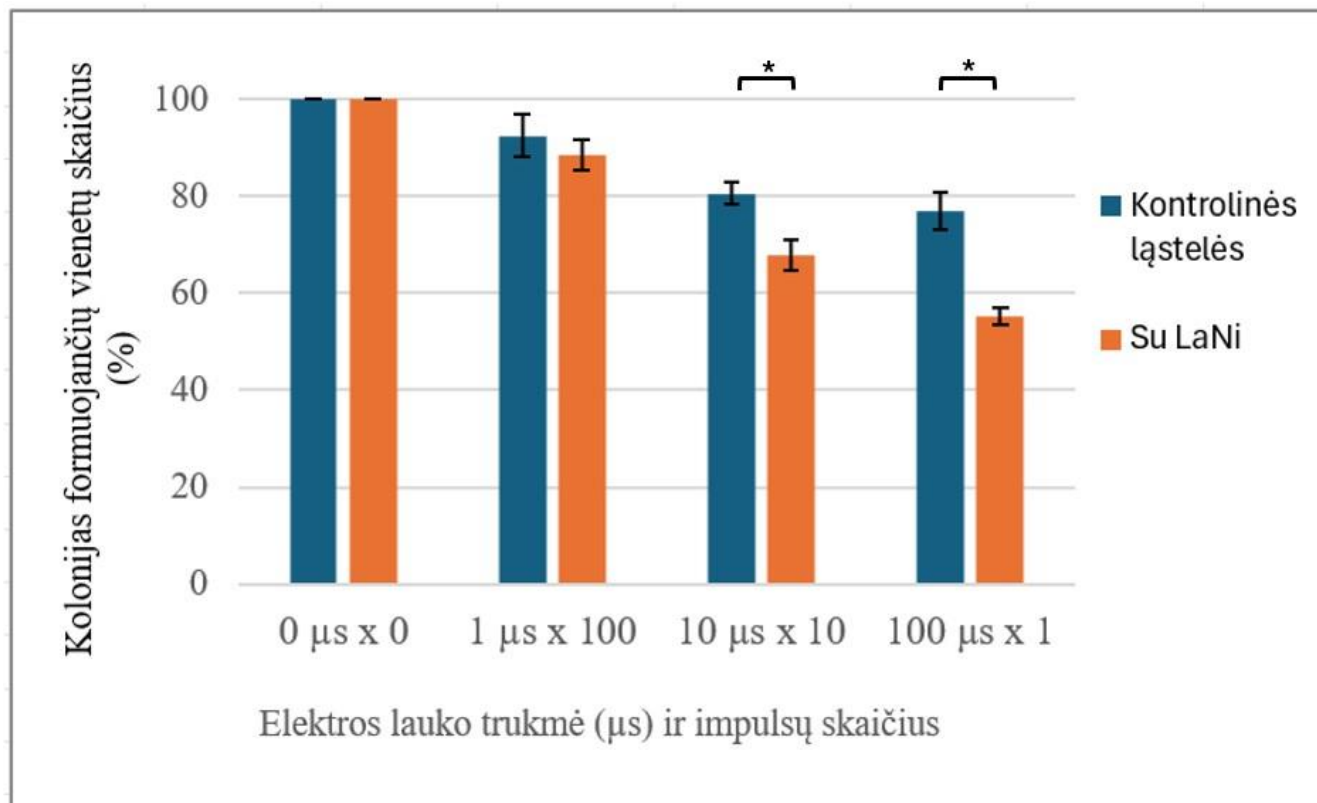
### 3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *C. guilliermondii*

Mielėms taip pat, kaip ir bakterijoms svarbus, ne tik elektrinio lauko stipris, bet ir impulsų kiekis bei jų trukmė. Šio eksperimento metu siekta nustatyti  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  1,5 mg/ml ir skirtingo stiprumo impulsinio elektrinio lauko (5 kV, 10 kV, 15 kV) poveikį mielėms *C. guilliermondii*.

Įvertinta ar  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  1,5 mg/ml ir skirtingo stiprumo impulsinis elektrinis laukas turi įtakos mielių gyvybingumui po elektros šoko ląstelių neveiktų lantanais (kontrolinės ląstelės) ir ląstelių paveiktų  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (Su LaNi).

Kituose tyrimuose buvo pastebėta, jog būtent nuo 5 kV/cm yra pastebimas impulsinio elektrinio lauko poveikis mikroorganizmams (Šimonis, 2021). 5 kV/cm stiprio elektrinio lauko poveikio ląstelėms rezultatai pateikti (3.4 pav.). Statistinis reikšmingumas nustatytas tarp kontrolinių ląstelių ir LaNi paveiktų mėginių taikant 10 μs x 10 elektrinį lauką, LaNi mėginiuose ląstelių gyvybingumas buvo sumažėjęs apie 1,19 karto, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Lyginant šiuos parametrus su elektros

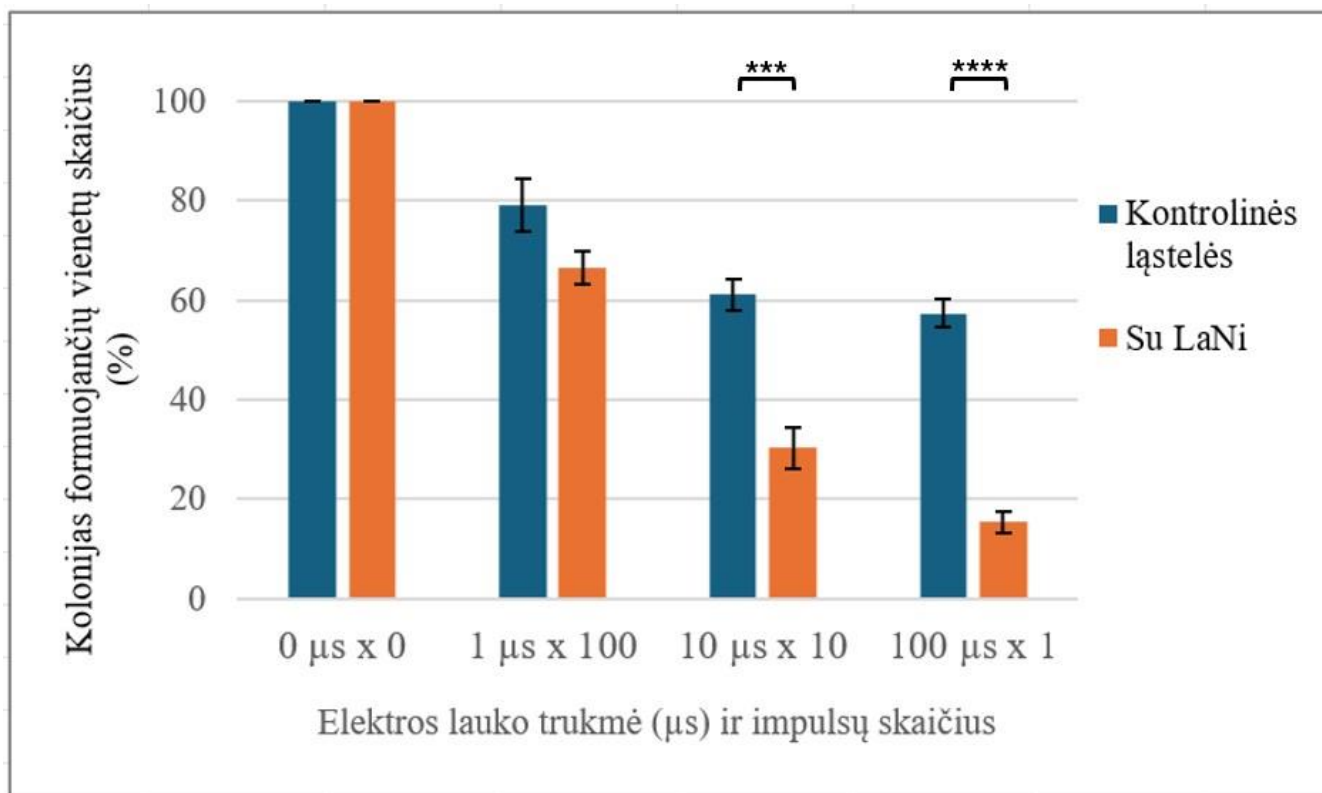
impulsais nepaveiktais mėginiais, ląstelių gyvybingumas buvo sumažėjęs 32,08 %. Taip pat, statistiškai reikšmingas rezultatas gautas taikant  $100 \mu\text{s} \times 1$ , ląstelių sumažėjimas mėginiuose veiktuose LaNi buvo 1,39 karto didesnis. Be to, ląstelių gyvybingumas, lyginant su elektros impulsais nepaveiktomis ląstelėmis, sumažėjo 44,71 %.



**3.4 pav.**  $1,5 \text{ mg/ml La(NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *C. guilliermondii* ląstelėms, taikant  $5 \text{ kV/cm}$  elektrinį lauką  
 $p$  reikšmė  $* \leq 0,05$ . Statistiniam reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas porinis  $t$  testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

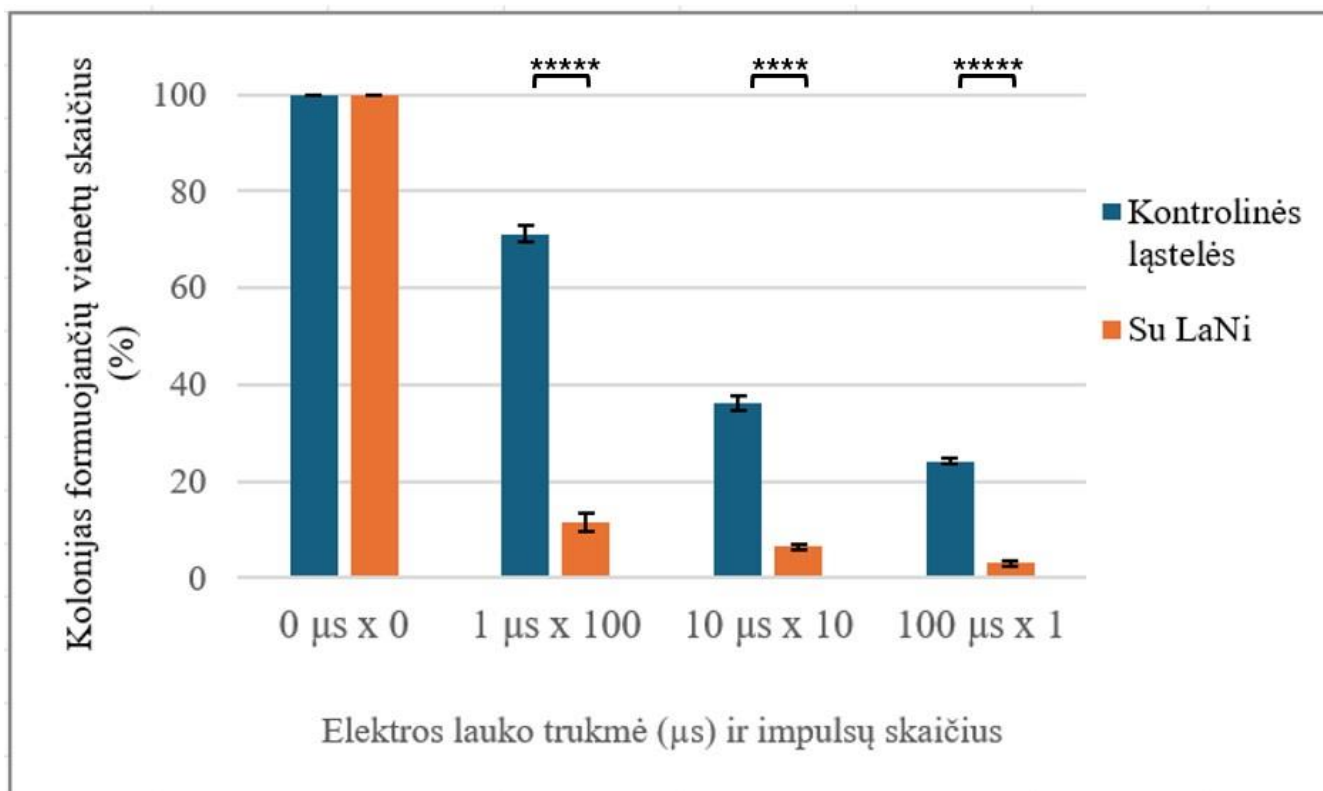
Šio darbo metu gauti rezultatai yra panašūs į ankstesnių tyrimų, kuriuose buvo nustatyta, jog didinant impulsinio elektrinio lauko stiprį iki  $10 \text{ kV}$ , gyvybingų mielių skaičius sumažėja netaikant papildomo apdorojimo osmosiniu šoku (Gančytė, Šimonis ir Stirė, 2023).  $10 \text{ kV/cm}$  stiprio elektrinio lauko poveikio ląstelėms rezultatai pateikti (**3.5 pav.**). Statistiškai reikšmingiausias poveikis nustatytas tarp  $\text{La(NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  turinčių mėginių ir kontrolinių ląstelių jas veikiant  $10 \mu\text{s} \times 10$  impulsiniu lauku, kur LaNi paveiktuose mėginiuose ląstelių gyvybingumas buvo 2,02 karto mažesnis. LaNi ląstelių gyvybingumas lyginant su elektros impulsų nepaveiktomis ląstelėmis sumažėjo  $70,18 \%$ . Taip pat, LaNi paveiktuose mėginiuose ląstelių buvo 3,76 karto mažiau taikant  $100 \mu\text{s} \times 1$  elektrinį lauką, o lyginant su IEL nepaveiktomis ląstelėmis gyvybingumas sumažėjo net  $84,76 \%$ .





**3.5 pav.** 1,5 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *C. guilliermondii* ląstelėms, taikant 10 kV/cm elektrinį lauką p reikšmės: \*\*\*  $\leq 0,0005$ ; \*\*\*\*. Statistiniam reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas porinis t testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

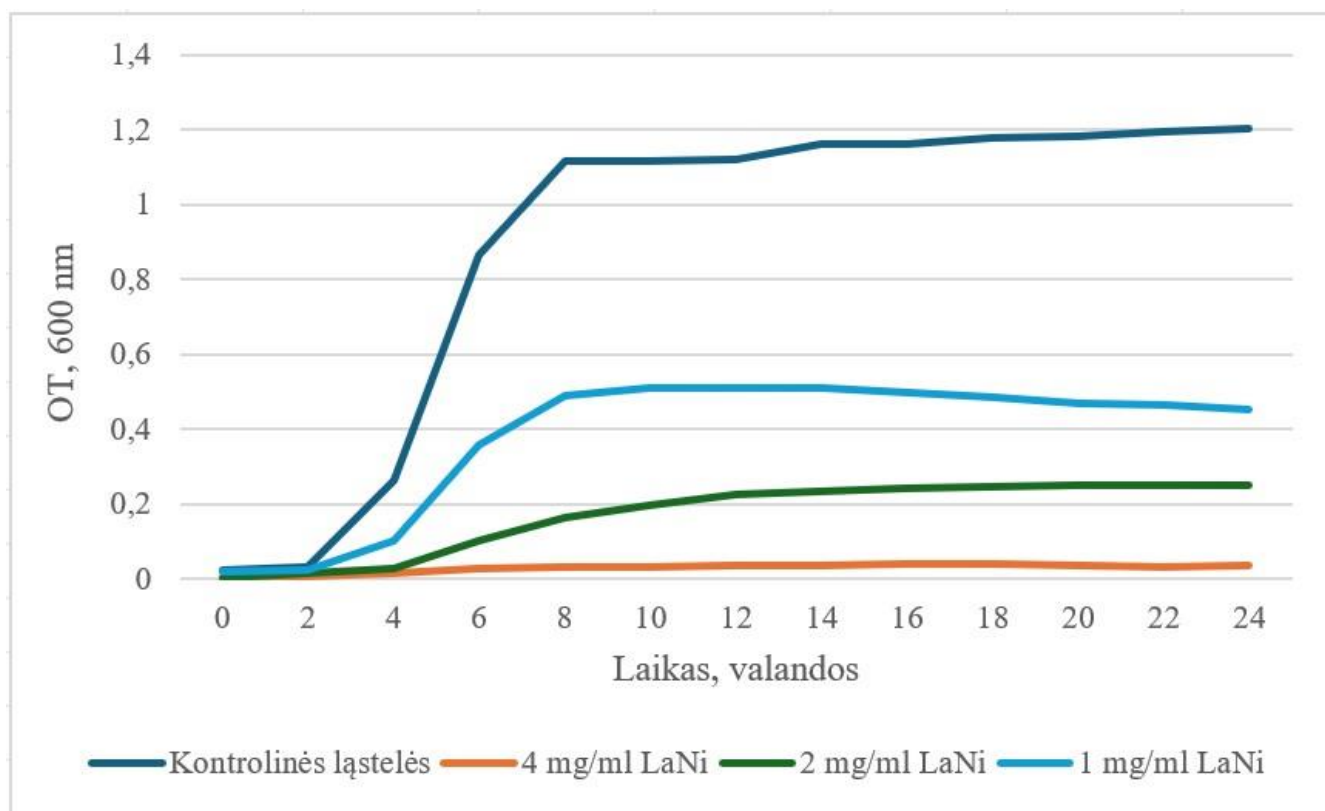
15 kV/cm stiprio elektrinio lauko poveikio ląstelėms rezultatai pateikti (3.6 pav.). Statistiškai reikšmingi rezultatai nustatyti tarp visų  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  paveiktų mėginių ir kontrolinių ląstelių jas veikiant impulsiniu lauku. Nustatyta, jog veikiant LaNi mėginių ląsteles tokiais elektrinio lauko parametrais, gyvybingumas sumažinamas: 1  $\mu\text{s} \times 100$  – 6,13 karto, 10  $\mu\text{s} \times 10$  – 5,65 karto, 100  $\mu\text{s} \times 1$  – 8,17 karto. Taip pat, ląstelių gyvybingumas sumažėjo taikant IEL, lyginant su nepaveiktomis elektros impulsais ląstelėmis atitinkamai: 1  $\mu\text{s} \times 100$  – 88,4 %, 10  $\mu\text{s} \times 10$  – 93,59 %, 100  $\mu\text{s} \times 1$  – 97,05 %.



**3.6 pav.** 1,5 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *C. guilliermondii* ląstelėms, taikant 15 kV/cm elektrinį lauką  
 p reikšmės: \*\*\*\*  $\leq 0,00005$ ; \*\*\*\*\*  $\leq 0,000005$ . Statistiniam reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas porinis t testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

### 3.4. $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ poveikis *S. aureus* laike

Šio eksperimento metu siekta nustatyti skirtingų  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracijų poveikį ląstelėms laike. Nustatyta, jog 4 mg/ml yra minimali inhibitorinė koncentracija *S. aureus*, kuri visiškai nužudo ląsteles, tad  $\text{OT}_{600}$  per laiką nesikeičia. 1 mg/ml koncentracija veikia laike taip pat, kaip kontrolė, tačiau ląstelių biomasės yra beveik 3 kartus mažiau. Ląstelės, paveiktos 2 mg/ml LaNi koncentracija, pradeda augti 2 valandomis vėliau nei kontrolinės ląstelės ir jų biomasės kiekis yra net 4,8 karto mažesnis (3.7 pav.).

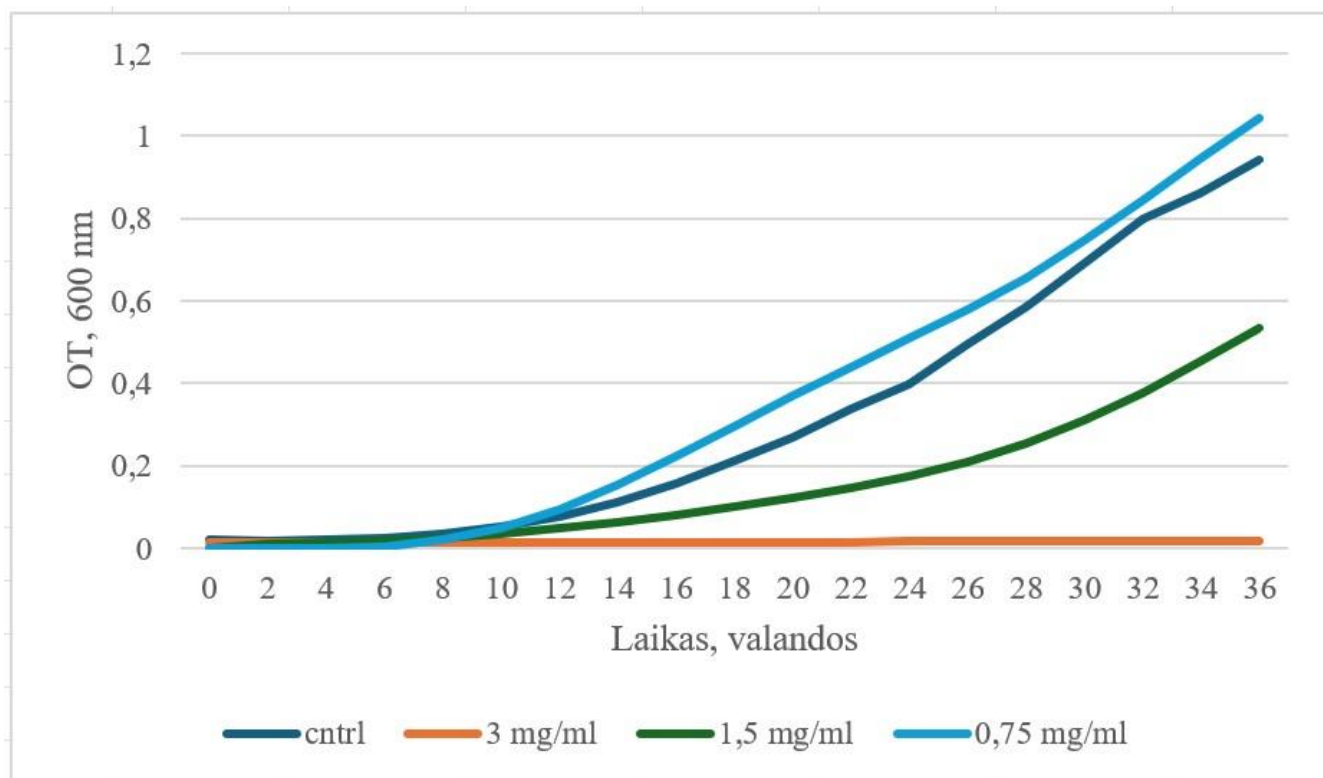


**3.7 pav.** *S. aureus* ląstelių paveiktų skirtingomis  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracijomis poveikis laike OT – optinis tankis.

### 3.5. $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ poveikis *C. guilliermondii* laike

Šio tyrimo metu taip pat siekta ištirti skirtingų  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracijų poveikį mielių ląstelėms laike. Nustatyta, jog 3 mg/ml yra minimali inhibitorinė koncentracija *C. guilliermondii* mielėms, kuri visiškai nužudo ląsteles, tad ląstelių OT<sub>600</sub> per laiką nesikeičia. Tuo tarpu 1,5 mg/ml koncentracija veikia laike taip pat, kaip kontrolė, ląstelės pradeda sparčiau augti po 10 valandų, tačiau ląstelių biomasės yra 1,76 kartus mažiau. Ląstelės, paveiktos 0,75 mg/ml LaNi koncentracija, taip pat po 10 valandų pradeda sparčiau augti bei ląstelių biomasės kiekis tampa 1,1 karto didesnis nei kontrolinių ląstelių. Taip gali būti dėl to, jog ląstelės pajutusios nežymų oksidacinį stresą, suaktyvina savo apsauginius mechanizmus. Pavyzdžiui, žinoma, kad oksidacinis stresas sukelia tam tikrų indukuojamų karščio šoko baltymų (angl. *heat shock proteins*, toliau Hsp), ypač Hsp27, raiškos padidėjimą (Gorman ir kt., 2005; Swindell, Huebner ir Weber, 2007). Taip pat nustatyta, kad Hsp apsaugo nuo įvairaus streso: sunkiųjų metalų, radiacijos, azoto oksido, šilumos šoką. Be to, nesulankstytų baltymų atsakas (angl. *Unfolded Protein Response*) aktyvinimas skatina antioksidacinių genų reguliavimą per nuo į baltymų

kinazę R panašios endoplazminio tinklo kinazės (angl. *PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) priklausomą eritroidinio branduolio faktoriaus 2 –susijusį faktorių 2 (angl. *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*, Nrf2) fosforilinimą, kurio taikinių genai apima fermentus, dalyvaujančius glutationo biosintezėje bei hemooksigenazę-1 (Cullinan ir Diehl, 2006). Tad galima teigti, kad nedidelė  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracija gali sustiprinti ląstelių atsparumą, taip skatinant ląstelių augimą ir išgyvenamumą (3.8 pav.).

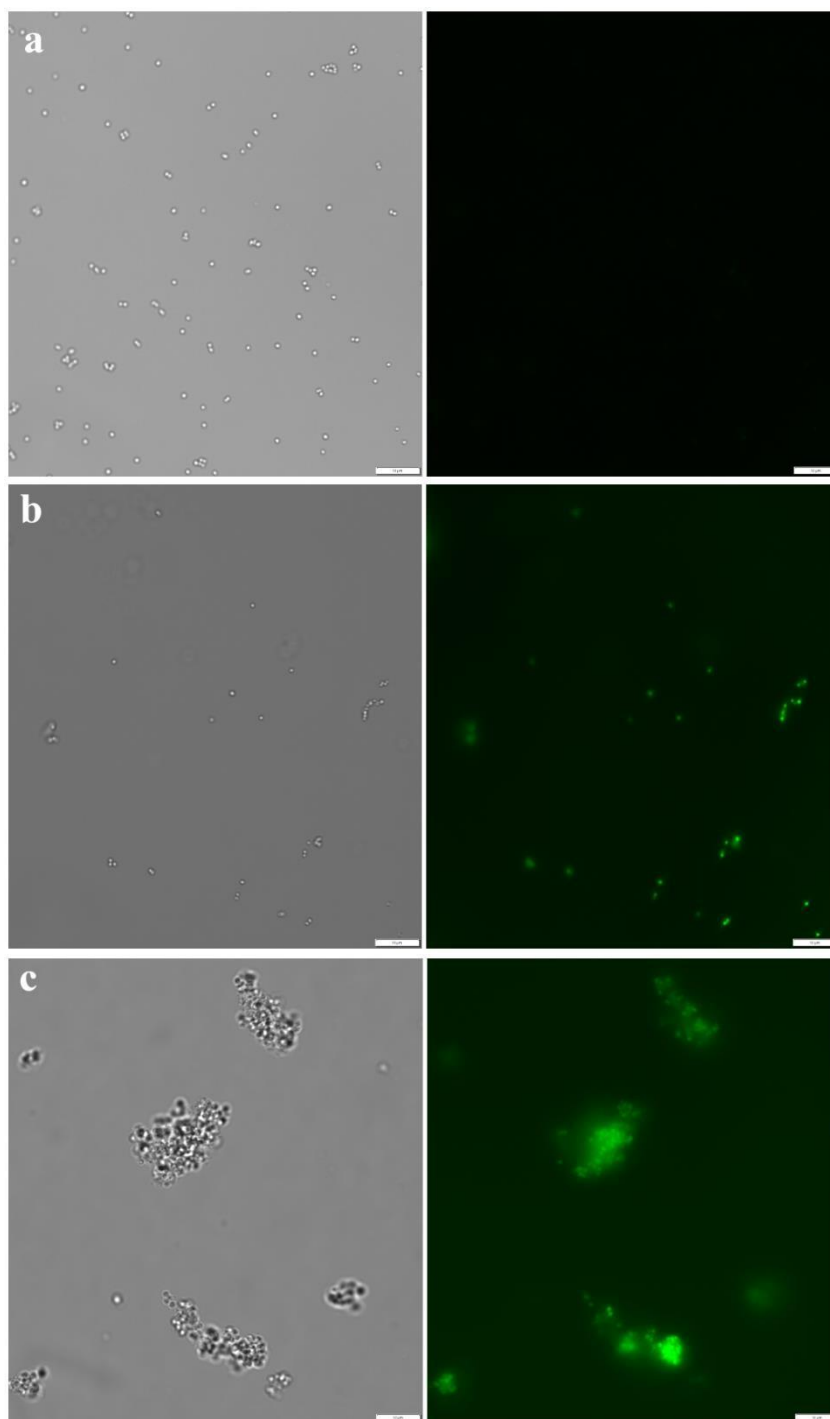


**3.8 pav.** *C. guilliermondii* ląstelių paveiktų skirtingomis  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracijomis poveikis laike  
OT – optinis tankis.

### 3.6. Fluorescencinė mikroskopija, ROS formavimasis *S. aureus*

Šio tyrimo metu siekta nustatyti ar  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  junginys sukelia ląstelėms oksidacinį stresą ir skatina ROS formavimąsi *S. aureus*. Kontrolinės ląstelės, kaip ir tikėtasi, taikant bangos ilgį 480/530 nm ROS generavimas nevyko (0 % fluorescencija) (3.9 pav., a). Teigiama kontrolė pasirinkta 5 % acto rūgštis, kuri jau žinoma, jog paskatina ROS susidarymą (Terasaki ir kt., 2018). Taikant fluorescenciją, ląstelės veiktos acto rūgštimi parodė 100 % ROS generavimą (3.9 pav., b). Tuo tarpu, ląstelių veiktu

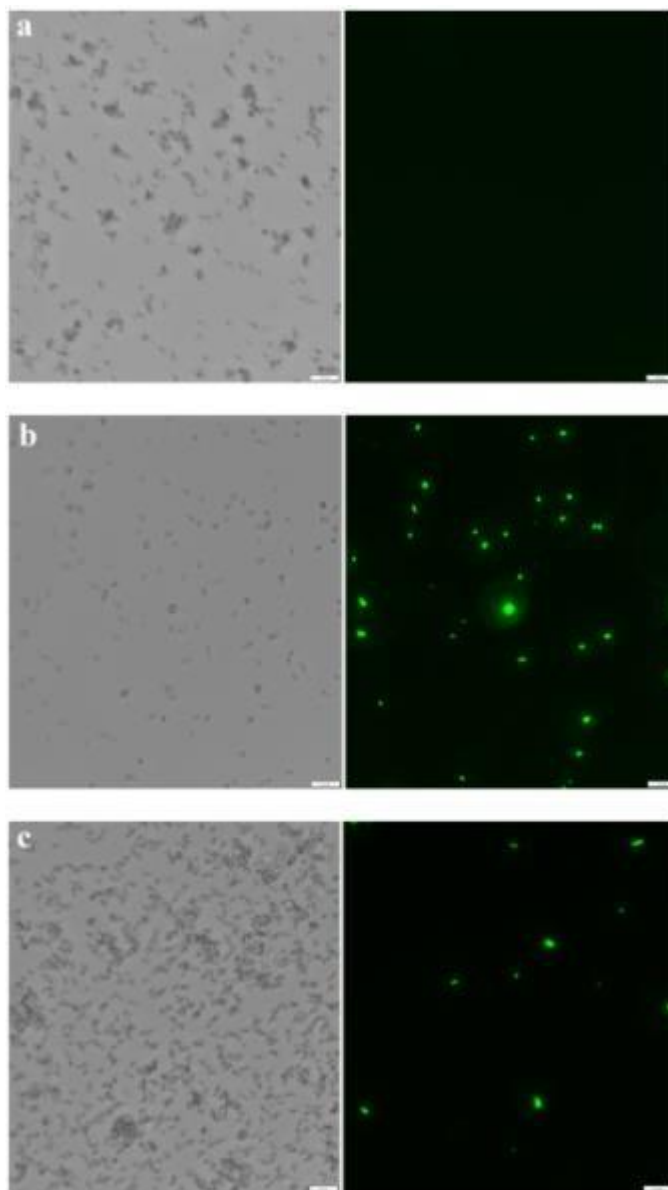
$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  kiekybinių rezultatų gauti nepavyko, kadangi lantano buvimas mėginiuose, skatino ląsteles sukibti. Tačiau kokybiškai įvertinti buvo galima, ląstelių sankaupose buvo matoma fluorescencija, o tai rodo, jog  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  sukelia ROS *S. aureus* ląstelėse (3.9 pav., c).



**3.9 pav.** *S. aureus* ląstelių nuotraukos darytos šviesiniu mikroskopu (kairė) ir taikant fluorescenciją 2 s (bangos ilgis 480/530 nm). a – kontrolinės ląstelės; b – ląstelės 10 minučių veiktos 5 % acto rūgštimi; c – ląstelės 10 minučių veiktos  $2 \text{ mg/ml} \times 6\text{H}_2\text{O}$ . Mastelis – 10  $\mu\text{m}$ , objektyvo padidinimas  $\times 100$ .

### 3.7 Fluorescencinė mikroskopija ROS, formavimasis *C. guilliermondii*

Šio tyrimo metu siekta nustatyti ar  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  sukelia ląstelėms oksidacinį stresą ir skatina ROS formavimąsi *C. Guilliermondii* ląstelėse. Kontrolinės ląstelės, taikant bangos ilgį 480/530 nm fluorescencinių požymių nerodė (0 % fluorescencija) (**3.10 pav., a**). Šio darbo metu taikant fluorescenciją, 34 % ląstelių veiktų acto rūgštimi fluorescavo, tai yra žymiai mažesnis procentas nei bakterijose (**3.10 pav., b**). Atvirkščiai nei bakterijose, mielių ląstelių veiktų  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  kiekybiškus rezultatus pavyko gauti, apie 3,5 % ląstelių fluorescavo (**3.10 pav., c**).



**3.10 pav.** *C. guilliermondii* ląstelių nuotraukos darytos šviesiniu mikroskopu (kairė) ir taikant fluorescenciją 2 s (bangos ilgis 480/530 nm) a – kontrolinės ląstelės; b – ląstelės 10 minučių veiktos 5

% acto rūgštimi; c – ląstelės 10 minučių veiktos 2 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ . Mastelis – 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 40$  padidinimo objektyvas.

## IŠVADOS

1.  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  yra MIK mielėms *C. guilliermondii* yra 3 mg/ml, o *S. aureus* bakterijoms 4 mg/ml.
2.  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (2 mg/ml) ir skirtingo stiprumo impulsinis elektrinis laukas daro reikšmingą poveikį *S. aureus* bakterijų gyvybingumui. Stipriausias poveikis pastebėtas taikant 15 kV/cm stiprio laukas, kur LaNi paveiktuose mėginiuose mikroorganizmų kiekis sumažėjo net 9,42 karto.
3.  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (1,5 mg/ml) ir skirtingo stiprumo impulsinis elektrinis laukas reikšmingai sumažina *C. guilliermondii* mielių gyvybingumą. Stipriausias poveikis pastebėtas taikant 15 kV/cm stiprio lauką, kur LaNi paveiktuose mėginiuose ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki 8,17 karto.
4. 4 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracija nužudo *S. aureus*, 1 mg/ml sumažina ląstelių biomasę tris kartus, o 2 mg/ml koncentracija sumažina biomasės kiekį 4,8 kartais bei ląstelės pradeda augti 2 valandomis vėliau nei kontrolinės.
5. 3 mg/ml  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  koncentracija nužudo *C. guilliermondii* mieles, o mažesnės koncentracijos veikia skirtingai. 1,5 mg/ml koncentracija veikia panašiai kaip kontrolė, tačiau ląstelių biomasė yra 1,76 karto mažesnė. 0,75 mg/ml koncentracija skatina spartesnį augimą po 10 valandų ir padidina ląstelių biomasę 1,1 karto.
6.  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  gali sukelti *S. aureus* ląstelėms oksidacinį stresą ir skatinti ROS formavimąsi. ROS atsiradimas buvo fiksuojamas 0 % kontrolinių ir 100 % acto rūgštimi veiktų ląstelių. Nors kiekybiniai duomenys apie  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikį nebuvo gauti dėl ląstelių sukibimo, kokybinė analizė parodė ROS generavimą ląstelių sancaupose.
7.  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  junginys sukelia oksidacinį stresą ir skatina ROS formavimąsi *C. guilliermondii* ląstelėse. Reaktyvaus deguonies atsiradimas buvo nustatytas: 0 % kontrolinėse ląstelėse, 34 % acto rūgšties paveiktose ląstelėse, 3,5 %  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  paveiktų mielių ląstelėse.



## **PADĖKA**

Padėka išreiškiama darbo vadovei prof. Dr. Eglei Lastauskienei už temos pasiūlymą, nuolatinę pagalbą, rūpestį bei motyvaciją nesustoti. Taip pat dėkoju Dr. Gediminui Staigvilai ir prof. dr. Vitalij Novickij už impulsinį elektrinio lauko generatorių ir pagalbą atliekant eksperimentus.

Augustė Valavičiūtė

Magistro baigiamasis darbas

## LANTANO (III) NITRATO HEKSAHIDRATO PRIEŠMIKROBINIO POVEIKIO ANALIZĖ

### SANTRAUKA

Didėjantis mikroorganizmų atsparumas esamiems gydymo metodams, skatina tyrėjus ieškoti naujų alternatyvių ir natūralių būdų kovoti su jų sukeliamomis ligomis. Retieji žemės elementai dėl gausumo žemės plutoje bei unikalių fizinių, cheminių, magnetinių ir liuminescencinių savybių elementai pasižymi daugybę technologinių pranašumų, todėl visuomenei pastaraisiais dešimtmečiais tapo vis patrauklesni. Šiame darbe tiriamas  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis *Staphylococcus aureus* ir *Candida guilliermondii* mikroorganizmams.

Tyrime nustatyta  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  MIK prieš mikroorganizmus *S. aureus* ir *C. guilliermondii*, naudojant 96 šulinėlių plokštelę. Be to, tyrimų metu lantano junginys kombinuotas su elektros šoku, kai ląstelės veiktos impulsinio elektrinio lauko generatoriumi. Taip pat atliktas ROS generavimas, taikant fluorescentinę mikroskopiją bei stebėtas  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  poveikis laike, matuojant optinį ląstelių tankį.

Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadas, kad  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  veikia antimikrobiškai, o kombinuojant šį junginį su elektros šoku gaunamas dar efektyvesnis rezultatas. Bakterijos šiam junginiui buvo atsparesnės (MIK – 4 mg/ml), už mieles (MIK – 3 mg/ml). Stipriausias antimikrobinis poveikis abiem mikroorganizmams nustatytas taikant parametrus – 15 kV 100  $\mu\text{s}$   $\times$  1. Taip pat tyrimo metu nustatyta, jog  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  generuoja ROS tiek *S. aureus*, tiek *C. guilliermondii* ląstelėse.

Augustė Valavičiūtė

Master thesis

**ANALYSIS OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF LANTHANUM (III) NITRATE  
HEXAHYDRATE**

**SUMMARY**

The increasing resistance of microorganisms to existing treatments is encouraging researchers to find new alternative and natural ways to combat diseases caused by them. Due to their abundance in the Earth's crust and their unique physical, chemical, magnetic and luminescent properties, rare earth elements have contributed to many technological advances and have become increasingly attractive to the public over the last decades. In this work, the effect of  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  on *Staphylococcus aureus* and *Candida guilliermondii* microorganisms was investigated.

The study determined the MIC of  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  against *S. aureus* and *C. guilliermondii* using a 96-well plate. In addition, the lanthanum compound was combined with an electric shock to the cells with a pulsed electric field generator. ROS generation by fluorescence microscopy was also performed and the temporal effects of  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  were monitored by measuring the optical density of the cells.

Based on the results obtained, it can be concluded that  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  is antimicrobial, and that combining this compound with electric shock is even more effective. Bacteria were more resistant to this compound (MIC 4 mg/ml) than yeast (MIC 3 mg/ml). The strongest antimicrobial effect for both microorganisms was observed at 15 kV 100  $\mu\text{s} \times 1$ . The study also showed that  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  generates reactive oxygen species in both *S. aureus* and *C. guilliermondii*.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Al-rimawi, F., Kanan, K. and Qutob, M. (2013) 'Analysis of different rare metals , rare earth elements , and other common metals in groundwater of south west bank / Palestine by ICP / MSdata and health aspects', 2013(October), pp. 1157–1164.
2. Ashkenazi, H. *et al.* (2003) 'Eradication of propionibacterium acnes by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light', 35, pp. 17–24.
3. Balaram, V. (2010) *Chapter 4 sources and applications of rare earth elements.*
4. Balaram, V. (2016) 'Trends in analytical chemistry recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – status , challenges and moving frontiers', *Trends in analytical chemistry*, 80, pp. 83–95. doi: 10.1016/j.trac.2016.02.001.
5. Balusamy, B. *et al.* (2012) 'Characterization and bacterial toxicity of lanthanum oxide bulk and nanoparticles', 30(12), pp. 1298–1302. doi: 10.1016/S1002-0721(12)60224-5.
6. Barakos, G. (2015) 'Rare earth underground mining approaches with respect to radioactivity control and monitoring strategies', (January 2018). doi: 10.1016/B978-0-12-802328-0.00008-5.
7. Barakos, G. (2018) *An assessment tool for the mineability of rare earth element deposits berichte der professur rohstoffabbau band 4 georgios barakos an assessment tool for the mineability of rare earth element deposits.* doi: 10.13140/RG.2.2.35277.69601.
8. Bau, M., Knappe, A. and Dulski, P. (2006) 'Anthropogenic gadolinium as a micropollutant in river waters in Pennsylvania and in Lake Erie , northeastern United States', 66, pp. 143–152. doi: 10.1016/j.chemer.2006.01.002.
9. Bestebroer, J. *et al.* (2009) 'Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins', 113(2), pp. 328–337. doi: 10.1182/blood-2008-04-153882.The.
10. Canettieri, E. V., Silva, J. B. A. and Felipe, M. G. A. (2001) 'Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate', 94.
11. Carvalho, W. *et al.* (2002) 'Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate'. doi: 10.1002/bit.10319.
12. Castor, S. B. and Hedrick, J. B. (2001) 'Rare earth elements', pp. 769–792.
13. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) 'Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / F', 59(3).

14. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, et al. (2002) ‘*Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes’, 1, pp. 687–693. doi: 10.1038/nm.
15. Chen, J. *et al.* (2020) ‘Clinical characteristics and outcomes of Candidemia caused by *Meyerozyma guilliermondii* complex in cancer patients undergoing surgery’, *Mycopathologia*, 185(6), pp. 975–982. doi: 10.1007/s11046-020-00485-2.
16. Cheng, A. G. *et al.* (2010) ‘Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and Protective Immunity’, 6(8). doi: 10.1371/journal.ppat.1001036.
17. Clauditz, A. *et al.* (2006) ‘Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress’, 74(8), pp. 4950–4953. doi: 10.1128/IAI.00204-06.
18. Cogen, A. L., Nizet, V. and Gallo, R. L. (2008) ‘From bench to bedside skin microbiota : a source of disease or defence ?’, pp. 442–455.
19. Cotton, S. (2013) *Lanthanide and actinide chemistry*.
20. Cullinan, S. B. and Diehl, J. A. (2006) ‘Coordination of ER and oxidative stress signaling : The PERK / Nrf2 signaling pathway’, 38, pp. 317–332. doi: 10.1016/j.biocel.2005.09.018.
21. Demple, B. (1999) ‘Experimental biology 1998 symposium on molecular approaches to understanding cellular responses to stress radical ideas : genetic responses to oxidative stress’, (August 1998), pp. 64–68.
22. Diatloff, E., Smith, F. W. and Asher, C. J. (1989) ‘Rare earth elements and plant growth : II . Responses of corn and mungbean to low concentrations of lanthanum in dilute , continuously flowing nutrient solutions .’, (November 2012), pp. 1977–1989.
23. Diba, K. *et al.* (2012) ‘Rapid identification of drug resistant *Candida* species causing recurrent vulvovaginal candidiasis’, 53(3), pp. 193–198.
24. Dong, S. and Wang, Y. (2016) ‘Characterization and adsorption properties of a lanthanum-loaded magnetic cationic hydrogel composite for fluoride removal’, *Water Research*, 88, pp. 852–860. doi: 10.1016/j.watres.2015.11.013.
25. Dostal, J. (2017) ‘Rare earth element deposits of alkaline igneous rocks’, (39). doi: 10.3390/resources6030034.
26. Firsching, F. H. and Brune, S. N. (1991) ‘Solubility products of the trivalent rare-earth Phosphates’, pp. 93–95.

27. Forsman, H. *et al.* (2012) 'Receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects of phenol-soluble modulin peptides from *Staphylococcus aureus* on human neutrophils are abrogated through peptide inactivation by reactive oxygen species', (4). doi: 10.1128/IAI.05906-11.
28. Foster, T. J. (2002) '39 - *Staphylococcus aureus*', in *Molecular medical microbiology*, pp. 839–888.
29. Fu, F. *et al.* (2001) 'The variation of REE (rare earth elements) patterns in soil-grown plants : a new proxy for the source of rare earth elements and silicon in plants', (1974), pp. 53–64.
30. Gančytė, G., Šimonis, P. and Stirke, A. (2023) 'Investigation of osmotic shock effect on pulsed electric field treated *S. cerevisiae* yeast cells', *Scientific reports*, pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598023-37719-4
31. Gorman, A. M. *et al.* (2005) 'Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome', 327, pp. 801–810. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.066.
32. Grahamt, J. E. and Wilkinson, B. J. (1992) '*Staphylococcus aureus* osmoregulation: roles for choline, glycine, betaine, proline, and taurine', 174(8), pp. 2711–2716.
33. Grant, C. M. (2001) 'MicroReview role of the glutathione / glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions', 39.
34. Grice, E. A. and Segre, J. A. (2011) 'The skin microbiome', 9(April), pp. 244–253. doi: 10.1038/nrmicro2537.
35. Gschneidner, K. A. (1964) *Rare earths; the fraternal fifteen.*
36. Guggenberger, C. *et al.* (2012) 'Two distinct coagulase-dependent barriers protect *Staphylococcus aureus* from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model', 8(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1002434.
37. Gulani, V. *et al.* (2017) 'Personal view gadolinium deposition in the brain : summary of evidence and recommendations', *The lancet neurology*, 16(7), pp. 564–570. doi: 10.1016/S14744422(17)30158-8.
38. Guo, N. *et al.* (2009) 'Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis', pp. 499–507. doi: 10.1007/s10295-008-0519-2.
39. Haas, C. J. C. De *et al.* (2004) 'Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent', 199(5). doi: 10.1084/jem.20031636.

40. Hair, P. S. *et al.* (2010) 'Clumping factor a interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis', 78(4), pp. 1717–1727. doi: 10.1128/IAI.01065-09.
41. Halliwell, B. *et al.* (1986) 'Book reviews free radicals in biology and medicine carcinogenesis : a comprehensive survey. Volume 10, the role of chemical and radiation in the etiology of cancer', I (page 116), pp. 331–332.
42. Hamilton, W. A. and Sale, J. H. (1967) 'Effects of high electric fields on microorganisms II. mechanism of action of the lethal effect', 48, pp. 789–800.
43. Hartman, B. J. and Tomasz, A. (1984) 'Low-affinity penicillin-binding protein associated with ractam resistance in *Staphylococcus aureus*', 158(2), pp. 513–516.
44. Horswill, A. R. and Rooijackers, S. H. M. (2011) '*Staphylococcus aureus*', 186, pp. 6445–6453. doi: 10.4049/jimmunol.1002948.
45. Itoh, S. *et al.* (2010) 'Staphylococcal superantigen-like protein 5 inhibits matrix metalloproteinase 9 from human neutrophils', 78(7), pp. 3298–3305. doi: 10.1128/IAI.00178-10.
46. Jongerius, I. *et al.* (2007) 'Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules', 204(10), pp. 2461–2471. doi: 10.1084/jem.20070818.
47. Kallen, A. J. *et al.* (2010) 'Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008', *JAMA*, 304(6), pp. 641–647. doi: 10.1001/jama.2010.1115.
48. Kinoshita, K. and Tsong, T. Y. O. W. (1979) 'Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes', 554.
49. Kinoshita, K. and Y., T. T. (1977) 'Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane', 268(5619), pp. 438–441.
50. Korshunov, S. and Imlay, J. A. (2010) 'Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*', 75(February), pp. 1389–1401. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07059.x.
51. Koujima, I. *et al.* (1978) 'Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration', 35, pp. 467–470.
52. Kreger-van Rij, N. J. W. (1970) '*Pichia Hansen*', The yeasts. a taxonomic study, pp. 455–554.
53. Lam, J. *et al.* (1980) 'Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis', 28(2), pp. 546–556.

54. Lelie, H. Van Der *et al.* (2009) ‘*Corynebacterium* CDC group JK (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients : a report of three cases and a systematic literature review’, 5548(April 2016). doi: 10.3109/00365549509047071.
55. Liu, D. (1930) Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus*, molecular medical microbiology, three-volume set. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00055-X.
56. Marszalek, P., Liu, D. S. and Tsong, T. Y. (1990) ‘Schwan equation and transmembrane potential induced by alternating electric field’, *Biophysical Journal*, 58(4), pp. 1053–1058. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82447-4.
57. Martin, T. *et al.* (1995) ‘*Corynebacterium diphtheriae* osteomyelitis in an immunocompetent child : a case report’, pp. 381–383.
58. Massey, V. *et al.* (1969) ‘The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen’, 36(6), pp. 891–897.
59. McDonald, R. J. *et al.* (2015) ‘Intracranial gadolinium deposition’, 275(3).
60. Mcleod, C. L. and Krekeler, M. P. S. (2017) ‘Sources of extraterrestrial rare earth elements : to the moon and beyond’. doi: 10.3390/resources6030040.
61. McManners, J. (1990) ‘Suppurative oral candidosis review of the literature and report of a case’, pp. 257–259.
62. Meaking, W. S. *et al.* (1995) ‘et Biophysica electroporation-induced damage in mammalian cell DNA’, 1264, pp. 357–362.
63. Messner, K. R. and Imlay, J. A. (1999) ‘The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli* \*’, *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), pp. 10119–10128. doi: 10.1074/jbc.274.15.10119.
64. Mihalasky, M. J. *et al.* (2018) *Rare earth element and rare metal inventory of central Asia, Fact Sheet*. Reston, VA. doi: 10.3133/fs20173089.
65. Muller-eberhard, H. J. and Jolla, L. (1988) ‘Molecular organization and function of teh complement system’.
66. Müller, F. (1987) ‘Flavin radicals: Chemistry and biochemistry’, *Free radical biology and medicine*, 3(3), pp. 215–230.



67. Narasimhulu, M. *et al.* (2007) 'Lanthanum (III) nitrate hexahydrate or gadolinium (III) chloride hexahydrate catalyzed one-pot synthesis of amino nitriles', 264, pp. 288–292. doi: 10.1016/j.molcata.2006.09.036.
68. Nejad, J. S. *et al.* (2010) 'The journal of supercritical fluids fractional factorial design for the optimization of hydrothermal synthesis of lanthanum oxide nanoparticles under supercritical water condition', *The journal of supercritical fluids*, 52(3), pp. 292–297. doi: 10.1016/j.supflu.2010.01.013.
69. Neumann, E. *et al.* (1982) 'Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields', 1(7), pp. 841–845. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.
70. Pavlin, M., Leben, V. and Miklav, D. (2007) 'Electroporation in dense cell suspension — theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization', 1770, pp. 12–23. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.06.014.
71. Pearson, R. G. (1990) 'Hard and soft acids and bases-the of a chemical concept evolution', 100, pp. 403–425.
72. Pomposiello, P. J. and Bruce, D. (2002) 'Global adjustment of microbial physiology during free radical stress', 46.
73. Raju, C. S. K. *et al.* (2010) 'Speciation of gadolinium based MRI contrast agents in environmental water samples using hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry †', pp. 55–61. doi: 10.1039/b919959d.
74. Rani, A. *et al.* (2013) 'Analysis of uranium concentration in drinking water samples using ICPMS', (May 2018). doi: 10.1097/HP.0b013e318279ba05.
75. Reddy, S. T. *et al.* (2006) 'A mild and efficient acetylation of alcohols, phenols and amines with acetic anhydride using La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O as a catalyst under solvent-free conditions', *Tetrahedron Letters*, 47(38), pp. 6825–6829.
76. Redling, K. (2006) 'Rare earth elements in agriculture'.
77. Reichard, U. *et al.* (2007) 'Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp . to six antifungal agents : results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005', (June), pp. 424–428. doi: 10.1093/jac/dkm145.
78. Rim, K. (2017) 'A book review ; "Rare earth elements in human and environmental health ; at the crossroads between toxicity and safety"', 60.

79. Rim, K. T., Koo, K. H. and Park, J. S. (2013) 'Toxicological evaluations of rare earths and their health impacts to workers : a literature review', *Safety and health at work*, 4(1), pp. 12–26. doi: 10.5491/SHAW.2013.4.1.12.
80. Riordan, K. O. and Lee, J. C. (2004) '*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides', 17(1), pp. 218–234. doi: 10.1128/CMR.17.1.218.
81. Rodrigues, R. C. L. B. *et al.* (2006) 'Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate', 53, pp. 53–59. doi: 10.1007/s00284-005-0242-4.
82. Rooijackers, S. H. M. *et al.* (2005) 'Anti-opsonic properties of staphylokinase', 7, pp. 476–484. doi: 10.1016/j.micinf.2004.12.014.
83. Rooijackers, S. H. M. (2014) 'Bacteria under stress by complement and coagulation', 38, pp. 1146–1171. doi: 10.1111/1574-6976.12080.
84. Sabbioni, E. *et al.* (1982) 'Long-term occupational risk of rare-earth pneumoconiosis a case report as investigated by neutron activation analysis', 26, pp. 19–32.
85. Sachivkina, N., Podoprigora, I. and Bokov, D. (2021) '*Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms , and response to farnesol', 14, pp. 1608–1614.
86. Savini, V., Catavitello, C., Di, I., *et al.* (2010) 'Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient ' s silent funguria', pp. 457–459. doi: 10.1007/s11046-010-9278-5.
87. Savini, V., Catavitello, C., Onofrillo, D., *et al.* (2010) 'Past and current literature about this emerging yeast', pp. 434–441. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01960.x.
88. Schirmer-michel, C. *et al.* (2008) 'Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075', 99, pp. 2898–2904. doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.042.
89. Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1972) 'Peptidoglycan. Types of bacterial cell walls and their taxonomic implications', 36(4), pp. 407–477.
90. Schwan, W. R. *et al.* (2016) 'HHS public access', 6(2), pp. 22–27. doi: 10.5495/wjcid.v6.i2.22.Osmolyte.
91. Shavlovskii, G. M. *et al.* (1979) 'Genetic classification of riboflavin-dependent mutants of *Pichia guilliermondii* yeasts', *Genetika*, 15(9), p. 1561—1568. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/488712>.
92. Sibirny, A. A. and Boretsky, Y. R. (2009) '*Pichia guilliermondii*', pp. 113–134. doi:

10.1007/978-1-4020-8292-4.

93. Smith, E. J. *et al.* (2011) 'The sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*', 79(9), pp. 3801–3809. doi: 10.1128/IAI.05075-11.
94. Sparks, D. L. (2005) 'In the environment : the role of surfaces', pp. 193–198.
95. Storz, G. and Imlay, J. A. (1999) 'Oxidative stress', *current opinion in microbiology*. 2(2), pp. 188–194.
96. Swindell, W. R., Huebner, M. and Weber, A. P. (2007) 'Non-heat stress response pathways', 15, pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-8-125.
97. Šimonis, P. (2021) *Investigation of yeast cell responses to pulsed electric field treatment*.
98. Tanner, F. J., Vojnovich, C. and Lanen, J. Van (1944) 'Riboflavin production by *Candida* Species', 101(2616), pp. 1944–1945.
99. Teissie, J. *et al.* (2002) 'Recent biotechnological developments of electropulsation . A prospective review', 55, pp. 107–112.
100. Terasaki, M. *et al.* (2018) 'Acetic acid oxidative stressor in gastric cancer cells', 63(1), pp. 36–41. doi: 10.3164/jcfn.17.
101. Trziszka, T. (2007) 'Evaluation of the use of pulsed electrical field as a factor with antimicrobial activity', 78, pp. 1320–1325. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.01.002.
102. Tsong, T. Y. (1991) 'Electroporation of cell membranes i', *Biophysical Journal*, 60(2), pp. 297–306. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82054-9.
103. Tyler, G. (2004) 'Rare earth elements in soil and plant systems – A review', pp. 191–206.
104. Vijaranakul, U. *et al.* (1995) 'Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine', 177(17), pp. 5116–5121.
105. Vysetti, B. (2016) 'Current advances in the miniaturization of analytical instruments — applications in cosmochemistry, geochemistry, exploration, and environmental sciences', pp. 1–12.
106. Wah, T. T. *et al.* (2013) 'International journal of food microbiology co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation', *International Journal of food microbiology*, 160(3), pp. 282–289. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.022.

107. Wakabayashi, T. *et al.* (2016) 'Antibacterial , antifungal and nematicidal activities of rare earth ions', *biological trace element research*, pp. 464–470. doi: 10.1007/s12011-016-0727-y.
108. Wang, Z. *et al.* (2015) 'Chemosphere Biochar produced from oak sawdust by Lanthanum ( La ) involved pyrolysis for adsorption of ammonium (NH<sup>+</sup> 4), nitrate (NO<sub>3</sub>), and', *Chemosphere*, 119, pp. 646–653. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.084.
109. Wang, Z. *et al.* (2016) 'Chemosphere Phosphate adsorption on lanthanum loaded biochar', *Chemosphere*, 150, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.004.
110. Ward, J. B. (1981) 'Teichoic and teichuronic acids : biosynthesis , assembly , and location', 45(2), pp. 211–243.
111. Wenzel, R. P. and Gennings, C. (2005) 'Bloodstream Infections Due to Candida Species in the intensive care unit : identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies', 41(Suppl 6), pp. 389–394.
112. Wilkinson, B. J. (1997) 'The *Staphylococci* in human diseases', in Crossley KB, A. G. (ed.) *Biology*. Churchill Livingstone, New York, pp. 1–38.
113. Wingard, J. R., Marrow, B. and Program, T. (1995) 'Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients author (s): John R . Wingard published by : Oxford University press stable URL : <https://www.jstor.org/stable/4458280> Importance of *Candida* Species Other than *C. albicans* as Pathog Oncology Patients', 20(1), pp. 115–125.
114. Xie, J., Wang, Z., Fang, D., *et al.* (2014) 'Journal of Colloid and interface science green synthesis of a novel hybrid sorbent of zeolite / lanthanum hydroxide and its application in the removal and recovery of phosphate from water', *journal of colloid and interface science*, 423, pp. 13–19. doi: 10.1016/j.jcis.2014.02.020.
115. Xie, J., Wang, Z., Lu, S., *et al.* (2014) 'Removal and recovery of phosphate from water by lanthanum hydroxide materials', *Chemical engineering journal*, 254, pp. 163–170. doi: 10.1016/j.cej.2014.05.113.
116. Yoon, H. K. *et al.* (2005) 'Dendriiform pulmonary ossification in patient with rare earth pneumoconiosis', pp. 701–703. doi: 10.1136/thx.2003.006270.
117. Zepf, V. (2013) 'Rare earth elements : what and where they are', pp. 11–39. doi: 10.1007/978-3642-35458-8.
118. Zhang, H. *et al.* (1999) 'Bacteriostatic effects of Cerium – humic acid complex an experimental study', 73.

119. Zimmermann, U. (1982) 'Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena', 694, pp. 227–277.