

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
Gyvybės mokslų centras  
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Bernadeta ŽUDYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

**Fotosensibilizacija ir fotokatalizė: palyginamieji antimikrobinio efektyvumo, poveikio mechanizmo ir daigintų grūdų mikrobiologinės kontrolės tyrimai**

Darbo vadovė:  
Prof. habil. dr. Ž. Lukšienė

Vilnius 2019

**Fotosensibilizacija ir fotokatalizė: palyginamieji antimikrobinio efektyvumo, poveikio mechanizmo ir daigintų grūdų mikrobiologinės kontrolės tyrimai**

Darbas atliktas

Vilniaus Universiteto Fizikos fakultete, Fotonikos ir nanotechnologijų institute.

Bernadeta ŽUDYTĖ



Darbo vadovė:

Prof. habil. dr. Ž. LUKŠIENĖ



## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1. Grūdų mikrobiologija.....	8
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.1.2. <i>Fusarium</i> genties mikromicetai.....	10
1.2. Grūdų ir jų produktų mikrobiologinės saugos gerinimo būdai .....	11
1.2.1. Fotosensibilizacija.....	13
1.2.1.1. Chlorofilinas.....	16
1.2.2. Fotokatalizė .....	17
1.2.2.1. ZnO nanodalelės.....	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	21
2.1. Medžiagos ir prietaisai .....	21
2.1.1. Bakterijų kamienai .....	21
2.1.2. Terpės ir reagentai.....	21
2.1.2.1. Tirpalų paruošimas.....	22
2.1.2.2. Sidabro nanodalelių SERS paruošimas .....	22
2.1.3. Prietaisai .....	22
2.1.3.1. Šviesos šaltinio prototipas .....	23
2.2. Metodai .....	23
2.2.1. Tiriamųjų medžiagų šviesos sugertiems, fluorescencijos intensyvumo ir dalelių dydžio nustatymas.....	23
2.2.2. <i>F. oxysporum</i> augimo inhibicija.....	24
2.2.3. Bakterijų kultūros auginimas.....	24
2.2.4. <i>E. coli</i> veikimas chlorofilinu indukuota fotosensibilizacija (Chl-photo) ir fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis .....	25
2.2.5. Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antibakterinio poveikio ir reaktyvių deguonies rūšių (ROS) įtakos jam įvertinimas .....	25
2.2.6. Paveiktų <i>E. coli</i> ląstelių fluorescentinė mikroskopija .....	26
2.2.7. <i>E. coli</i> ataugimo po poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis įvertinimas .....	26
2.2.8. Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos antibakterinio poveikio priklausomybės nuo Chl koncentracijos įvertinimas.....	26
2.2.9. <i>E. coli</i> sąveikos su Chl įvertinimas, priklausomai nuo inkubacijos laiko .....	27

2.2.10.	<i>E. coli</i> pažaidų po chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis nustatymas paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu	27
2.2.11.	Grūdų mikrobiologinės kokybės gerinimas panaudojant chlorofilinu indukuotą fotosensibilizaciją ir fotoaktyvuotas ZnO nanodaleles, poveikio daigumui įvertinimas.....	28
2.2.11.1.	<i>E. coli</i> inokuliavimas ant grūdų.....	28
2.2.11.2.	Antimikrobinį chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių savybių įvertinimas grūduose .....	28
2.2.11.3.	Grūdų daigumo įvertinimas.....	29
2.3.	Statistinė analizė.....	29
3.	REZULTATAI.....	30
3.1.	Fiziko-cheminės tiriamųjų medžiagų savybės .....	30
3.2.	Antigrybelinis chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių poveikis prieš <i>Fusarium oxysporum</i> .....	32
3.3.	Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antibakterinis poveikis prieš <i>Escherichia coli</i> ir veikimo mechanizmas .....	33
3.4.	Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių taikymas daigintų grūdų mikrobiologinei saugai .....	38
4.	REZULTATŲ APTARIMAS .....	41
5.	IŠVADOS .....	47
6.	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	48
	SANTRAUKA.....	58
	SUMMARY.....	60
<b>1 priedas.</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> inhibicijos blokuotų duomenų dispersinės analizės rezultatai .....	62
<b>2 priedas.</b>	Naudojamų metodų antibakterinio poveikio prieš <i>E. coli</i> palyginimas.....	64
<b>3 priedas.</b>	ROS įtakos <i>E. coli</i> kiekiui statistinė analizė.....	65
<b>4 priedas.</b>	Chlorofilino koncentracijos įtakos chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos antimikrobiniam poveikiui statistinė analizė.....	66
<b>5 priedas.</b>	Chlorofilino fluorescencijos kalibracinė kreivė.....	67
<b>6 priedas.</b>	Apdorojimo būdo įtakos prieš grūdų mikroorganizmus statistinė analizė.....	68
<b>7 priedas.</b>	Apdorojimo būdo įtakos sudygsių grūdų kiekiui statistinė analizė .....	71
<b>8 priedas.</b>	Apdorojimo būdo įtakos daigų ir šaknų ilgiui statistinė analizė.....	72
<b>9 priedas.</b>	Stendinis pranešimas konferencijoje „Open Readings 2018“ .....	74
<b>10 priedas.</b>	Stendinis pranešimas konferencijoje „Open Readings 2019“ .....	75
<b>11 priedas.</b>	Stendinis pranešimas konferencijoje „Open Readings 2019“ .....	76
<b>12 priedas.</b>	Publikacija žurnale „Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology“ .....	77
<b>13 priedas.</b>	Publikacija žurnale „Food Technology and Biotechnology“ .....	78

## SANTRUMPOS

apm – apsisukimai per minutę

CB – laidumo juosta (angl. *conduction band*)

Chl – chlorofilinas

Chl-photo – chlorofilinu indukuota fotosensibilizacija

DON – deoksinivalenolis

EPEC – enteropatogeninė *E. coli* (angl. *enteropathogenic E. coli*)

ETEC – enterotoksigeninė *E. coli* (angl. *enterotoxigenic E. coli*)

FDA – Jungtinių Amerikos Valstijų maisto ir vaistų administracija (angl. *U.S Food & Drug Administration*)

FT – Furje transformacija

GRAS – įprastai laikomas saugiu (angl. *Generally Recognized as Safe*)

HUS – hemolizinis ureminis sindromas (angl. *hemolytic-uremic syndrome*)

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

ksv – kolonijas sudarantys vienetai

LB – Luria-Bertani terpė

LBA – Luria-Bertani agaras

NaCl – natrio chloridas

OT. – optinis tankis

o.v. – optiniai vienetai

PGA – bulvių gliukozės agaras (angl. *potato glucose agar*)

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization (WHO)*)

ROS – reaktyvios deguonies rūšys

SERS – sustiprinto paviršiaus Raman spektroskopija (angl. *Surface enhanced Raman spectroscopy*)

STEC - šiga toksiną produkuojanti *E. coli* (angl. *Shiga toxin-producing Escherichia coli*), dar vadinama enterohemoragine *E. coli* (angl. *enterohemorrhagic E. coli (EHEC)*)

UV – ultravioletiniai spinduliai

VB – valentingumo juosta (angl. *valence band*)

ZEA - zearalenonas

ZnO – cinko oksidas

## IVADAS

Maistas yra neatsiejama visuomenės gyvenimo dalis, todėl nenuostabu, kad nuolat ieškoma naujovių: kuriami ne tik nauji patiekalai, bet ir ieškoma kitokių maisto apdorojimo, paruošimo būdų, kurie išsaugotų naudingas maisto medžiagas ir padėtų išvengti cheminių, fizinių bei biologinių teršalų maiste. Ne mažiau aktualu ir kokią maistą reikėtų rinktis, kas sveika, o kas sukelia ligas. Ne veltui jau senų senovėje garsiausias Antikos laikų gydytojas Hipokratas yra pasakęs: „Jūsų maistas turi būti Jūsų vaistas“.

Šiuo metu grūdai turi dvigubą vertę – jie yra naudojami kaip žaliava miltų gamybai bei gali būti daiginami ir naudojami kaip vertingas funkcinis maisto produktas (Gan et al., 2017). Grūdai yra maistinga, daug energijos suteikianti medžiaga, turinti baltymų bei reikalingų mikroelementų. Pasaulyje yra nusistovėjusi nuomonė, kad grūdai yra pagrindinis angliavandenių ir skaidulų šaltinis žmonių mityboje (Singh et al., 2015). Vien 2015–2016 m. grūdų produkcija siekė 735 000 000 tonų, kurių vertė ~145 milijardai JAV dolerių (Figueroa et al., 2018). Indijoje 60 proc. žmonių kiekvieną dieną išgyvena tik grūdų dėka (Bramhanwade et al., 2016). Daiginimo metu grūdai kaupia bioaktyvias medžiagas, gerėja jų antioksidacinės savybės (Gan et al., 2017), padidėja bendras fenolių (9,9 proc.), flavanoidų (30,7 proc.), ferulino rūgšties (21,6 proc.) kiekis (Žilić et al., 2014). Daigintuose kviečiuose randama net iki 3,6 kartų daugiau tokoferolių (vitamino E), o niacino (vitamino B3) padaugėja 1,2 karto (Žilić et al., 2014). Ypač padaugėja būtinųjų ir funkcinųjų aminorūgščių (izoleucino, leucino, fenilalanino, valino ir gama-amino sviesto rūgšties (GABA)). Jų kiekis padidėja 3–10 kartų (Van Hung et al., 2015).

Nepaisant gerųjų savybių didelis grūdų trūkumas – mikrobiologinė tarša. Kasmet dėl jos netenkama apie 15 proc. pasaulyje auginamų grūdų (Schmidt et al., 2018), o net 25 proc. grūdų, naudojamų gyvūnų pašarams ir žmonių maistui, yra užkrėsti mikotoksinais (Cheli et al., 2017). Tarp visų su maistu susijusių susirgimų JAV net 38 proc. siejami su daigintų grūdų vartojimu (LPC, 2014). Šie faktai rodo, kad naudojami mikrobiologinės taršos mažinimo būdai nėra pakankamai efektyvūs, todėl reikia tęsti naujų antimikrobinių technologijų paieškas.

Dvi naujos neterminės antimikrobiškai veikiančios technologijos (chlorofilinu indukuota fotosensibilizacija bei fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės) kelia didelį susidomėjimą maisto pramonėje, tačiau dar trūksta duomenų norint šiuos metodus pradėti naudoti praktikoje. Pirmiausia reikėtų nustatyti, kuris iš jų ne tik efektyvesnis prieš bakterijas ir mikromicetus, bet ir nepakenkia grūdų struktūrai ir daigumui.

**Darbo tikslas:**

Palyginti chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos (Chl-photo) ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antimikrobinio poveikio efektyvumą, jų poveikio mechanizmą ir paveiktų grūdų kokybę.

**Uždaviniai:**

- 1) įvertinti Chl-photo ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antigrybelinio (prieš augalų patogeną *Fusarium oxysporum*) ir antibakterinio (prieš *Escherichia coli*) poveikio efektyvumą;
- 2) išsiaiškinti šių metodų veikimo mechanizmą, panaudojant ROS gesiklį L-histidiną, sustiprinto paviršiaus Raman spektroskopiją (SERS);
- 3) nustatyti Chl-photo ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių veiksmingumą gerinant kviečių mikrobiologinę kokybę, poveikį grūdų daigumui, šaknų ir daigų ilgiui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Grūdų mikrobiologija

Grūdai, kaip ir kiti maisto produktai, mikroorganizmais gali būti užkrečiami bet kuriame apdorojimo etape: derliaus nuėmimo, transportavimo ar laikymo (Hu et al., 2016).

Pagrindiniai grūdų „užteršėjai“ yra mikroskopiniai grybai, kurie ne tik sumažina mitybinę vertę, bet ir slopina daigumą, suteikia blogą kvapą, skatina sausosios masės sumažėjimą, o blogiausiu atveju išskiria antrinius metabolitus – mikotoksinus bei alergizuojančias sporas (Hu et al., 2016). Per metus dėl grybelių sukeltų ligų netenkama apie 15–20 proc. grūdų derliaus, o nuostoliai įvertinami keliais milijardais JAV dolerių (Figueroa et al., 2018). Brazilijoje atliktas tyrimas parodė, kad grūduose dominuoja *Fusarium* sp. ir *Alternaria* sp. Taip pat aptikta *Epicoccum nigrum*, *Microdochium nivale*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium* sp., *Drechslera avenae*, *Chaetomium globosum*, *Cochliobolus sativus*, *Aspergillus* sp. ir *Phoma* sp. Tačiau grūduose vyraujančios rūšys itin smarkiai varijavo, priklausomai nuo regiono (Tralamazza et al., 2016). Kinijoje atlikto tyrimo metu nustatytos visiškai kitokios kviečiuose vyraujančios mikromicetų gentys (*Emericella*, *Aspergillus*). Juose nerasta *Fusarium* genties grybų (Huang et al., 2016). Tai patvirtina faktą, kad užterštumas ir vyraujančios mikroorganizmų rūšys itin smarkiai priklauso nuo grūdų auginimo vietos.

Nepaisant to, kad grūdai dažniau asocijuojasi su mikroskopiniais grybais, ne mažesnę grėsmę kelia ir bakterijos. Pienarūgštės ir koliforminės bakterijos, vykdydamos rūgštinę fermentaciją, grūdus paverčia drėgna misa (Laca et al., 2006), o *Bacillus* genties bakterijos, gebančios formuoti sporas, gali išgyventi ir grūdus laikant itin vėsiose patalpose (Iurlina et al., 2006). Atlikus genomų analizę paaiškėjo, kad dažniausiai kviečiuose aptinkamos *Caulobacter*, *Desulfovibrio*, *Shewanella*, *Escherichia*, *Comamonas*, *Cetobacterium*, *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Devosia*, *Polymorphium*, *Methylobacterium* ir *Acinetobacter* gentys (Huang et al., 2016). Nors dažniausi su maistu susijusių ligų sukėlėjai (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*) grūduose randami tik nedideliais kiekiais (Los et al., 2018), tačiau to užtenka masiniams ligų protrūkiams sukelti. Ne veltui tarp didžiausių riziką keliančių produktų 9-oje vietoje FDA išskiria daigintus grūdus, dėl kurių įvyko 31 protrūkis, apimantis 2022 praneštus ligos atvejus, tarp kurių net 6 susiję su *E. coli* (Klein et al., 2009).

FDA yra sudariusi maisto produktų mikrobiologinės kokybės gaires, kuriose nustatytos įvairių maisto produktų, tarp jų ir grūdų, didžiausios leistinos mikrobiologinės



taršos ribos (FDA, 2013). Pagal šias gaires didžiausias leistinas bendras mikroorganizmų skaičius grūduose –  $10^6$  ksv/g, *E. coli*, koliforminių bakterijų, pelėsinių grybų ir mielių gali būti ne daugiau nei  $10^4$  ksv/g. Europos Sąjungoje taip pat yra nustatyti maisto mikrobiologiniai kriterijai (Europos Bendrijų Komisija, 2007). 2007 m. gruodžio 5 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1441/2007, iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 2073/2005 dėl maisto produktų mikrobiologinių kriterijų, nurodo, kad paruoštose vartojimui daigintose sėklose (25 g) negali būti *Salmonella* bakterijų.

### 1.1.1. *Escherichia coli*

*E. coli* yra normalios žmogaus mikrobiotos dalis, daugiausiai randama virškinamajame trakte. Šios gramneigiamos lazdelės formos bakterijos yra fakultatyvūs anaerobai. 2–6  $\mu\text{m}$  ilgio ir 1,1–1,5  $\mu\text{m}$  pločio bakterijos turi žiuželį, kuris padeda joms judėti ir fermentuodamos angliavandenius gamina dujas. Bakterijų genomo G+C kiekis yra 49–59 proc. Šios bakterijos gerai ištirtos ir dažnai naudojamos kaip modeliniai organizmai moksliniuose eksperimentuose bei biotechnologijoje. Nors dažniausiai bakterija nėra patogeninė, tačiau kai kurie kamienai yra oportunistiniai patogenai arba tiesiog patogenai (Leung ir Gallant, 2014). Pagal virulentiškumo mechanizmus yra išskiriami mažiausiai 8 patotipai: enteropatogeninė (EPEC), enterotoksigeninė (ETEC), enterohemoraginė (STEC), enteroinvazinė (EIEC), enteroagregacinė (EAEC arba EaggEC), uropatogeninė (UPEC), septicemiją sukelianti (SEPEC) ir meningitą sukelianti (MENEC) (Bekal et al., 2003).

2015 metais PSO nustatė pagrindinius visuotinius su maistu susijusių ligų sukėlėjus. Tarp pagrindinių enterinių ligų sukėlėjų – net 3 *E. coli*: EPEC, ETEC ir STEC. Tai didelės nuostabos nekelia, nes vien dėl EPEC ir ETEC 2010 metais mirė daugiau nei 63 000 žmonių (WHO, 2015).

2003–2012 metais vien JAV įvyko 390 protrūkiai (4928 ligos, 1272 hospitalizacijos, 33 mirtys), kurių sukėlėjas STEC. Daugiausiai jų – 255 – įvyko suvartojus užkrėsto maisto (Heiman et al., 2015). Tai kasmet šaliai kainavo daugiau kaip 405 JAV dolerių (Frenzen et al., 2005).

Vienas baisiausių STEC proveržių įvyko Vokietijoje 2011 metais. Su ožragės daigais pasklidusi bakterija užkrėtė 3816 žmones, iš kurių 855 pasireiškė hemolizinis ureminis sindromas (HUS). 54 žmonės mirė (Uphoff et al., 2014). 2014 m. JAV buvo užfiksuota 19 atvejų, pasklidusių po 6 valstijas, kuomet žmonės užsikrėtė STEC nuo gvazdikėlių daigų (CDC, 2014).

### 1.1.2. *Fusarium* genties mikromicetai

*Fusarium* genties mikromicetai yra dirvožemio saprofitai ir svarbūs augalų patogenai, sukeliantys įvairias ligas žmogui, pvz.: mikotoksikozę. *Fusarium* spp. hifai primena *Aspergillus*, filamentai yra stikliški, su pertvaromis, 3–8 µm skermens. Tipinis genties bruožas – tiek makrokonidijų, tiek mikrokonidijų produkavimas (Nucci ir Anaissie, 2009).

*Fusarium oxysporum* yra plačiausiai išplitusi *Fusarium* genties rūšis. Tai daugiausiai dirvožemyje randamas grybelis, produkuojantis 3 rūšių sporas: makrokonidijas, mikrokonidijas ir chlamidosporas. Į augalus patenka per micelį ar dygstančias sporas prasiskverbdamas per šaknų viršūnėles, žaizdas arba šonines šaknis (Banerjee ir Mittra, 2018). *F. oxysporum* sukelia ~20 proc. visų *Fusarium* genties ligų ir dažnumu nusileidžia tik *F. solani* (Kosmidis ir Denning, 2017).

Pati pavojingiausia kviečių liga – fuzariozė (angl. *Fusarium head blight* (FHB), kurios pagrindinis sukėlėjas askomicetas *Fusarium graminearum*. JAV, Kinijoje, Europos Sąjungoje, Afrikoje, Brazilijoje ir kitur bent kelios fuzariozės epidemijos pasireiškia kas 4–5 metus (Figueroa et al., 2018). Vien tik Europoje dėl FHB yra prarandama 10–30 proc. kviečių derliaus (Baffoni et al., 2015). Nuo 1990 m. iki 2006 m. kasmet JAV ši liga kainuodavo 3 milijardus JAV dolerių (Schumann ir D'Arcy, 2006).

Nepaisant paties mikromiceto pridaromo nuostolio, didžiausią pavojų kelia *Fusarium* genties antriniai metabolitai – mikotoksinais, ypač trichotecenais, iš kurių geriausiai žinomi deoksinivalenolis (DON) ir zearalenonas (ZEA). DON yra labai stabilus, atsparus aukštai temperatūrai ir išlieka maiste viso technologinio apdorojimo metu. Suvalgius didesnę kiekį maisto, turinčio DON, pasireiškia mitybos sutrikimai, svorio netekimas, anoreksija, vėmimas (Tralamazza et al., 2016). Kitas svarbus mikotoksinas – ZEA, susijęs su esminiais reprodukcinę organų pakitimais, lemiančiais nevaisingumą (Zinedine et al., 2007). Atliktas tyrimas parodė, kad visgi DON yra dažnesnis (ištyrus 150 mėginių jo aptikta net 147) nei ZEA (rastas 48 mėginiuose iš 150), tačiau aptinkamumas gana smarkiai susijęs su mėginių auginimo vieta. Be to, DON koncentracijos kur kas didesnės nei ZEA: DON 183–2150 µg/kg, ZEA 20,4–233 µg/kg (Tralamazza et al., 2016). Visgi skirtingose šalyse atliktų tyrimų suvestinė rodo, kad lyginant su kitomis Europos šalimis Lietuvoje išaugintuose grūduose randami itin dideli kiekiai ZEA (Brodal et al., 2016).

Didelė bėda – didėjantis *Fusarium* genties atsparumas įprastiems antigrybeliniams preparatams, tokiems kaip azolai, echinokandinai ir polienai (Al-Hatmi et al., 2016). Įdomu

tai, kad pirminis atsparumas yra išsivystęs natūraliai, prieš tai nepaveikus grybelio vaistais (Al-Hatmi et al., 2014).

## 1.2. Grūdų ir jų produktų mikrobiologinės saugos gerinimo būdai

Siekiant sumažinti grūdų užterštumą taikomi metodai yra skirstomi į 2 pagrindines rūšis: prieš derliaus nuėmimą (angl. *pre-harvest*) ir po derliaus nuėmimo (angl. *post-harvest*).

Prieš derliaus nuėmimą taikoma geros agrokultūros praktika – grūdų selekcija, sėjomaina, žemės dirbimas, drėkinimas ir tinkamas cheminių medžiagų naudojimas (Wegulo et al., 2015). Vieni efektyviausių sintetinių fungicidų – azolai. Tiesa, jų efektyvumas yra sąlyginis ir priklauso nuo veislės, fungicido naudojimo sąlygų, augalų auginimo sąlygų ir pačių patogenų (Cheli et al., 2017). Be to, jų naudojimas tapo problematiškas dėl vis didėjančio mikroorganizmų atsparumo ir rizikos vartotojams (Mikaberidze et al., 2017; Lozowicka et al., 2016). Dėl šių priežasčių vis daugiau dėmesio sulaukia natūralios antimikrobiškai veikiančios medžiagos, pvz. eteriniai aliejai, kurie yra bioskaidūs ir mažai toksiški (Sivakumar et al., 2014). Vis dėlto eterinių aliejų naudojimas taip pat yra ribotas, nes efektyviai antimikrobiškai veikiančios koncentracijos efektyviai sustabdo ir grūdų daigumą (Karaca et al., 2017).

Biologiniai kontrolės metodai, pvz. bakterijų ir mikromicetų antagonistai, tiriami kaip alternatyvūs grūdų mikrobiologinės saugos metodai. Ypač jais susidomėta ekologiškuose ūkiuose, kuriuose negalima naudoti cheminių fungicidų. Biologiniai antagonistai purškiami tiesiai ant kviečių (Wegulo et al., 2015). Baffoni ir kitų (2015) atliktame tyrime kaip antagonistai buvo naudotos dvi bakterijų rūšys: *Lactobacillus plantarum* SLG17 ir *Bacillus amyloliquefaciens* FLN13. *In vitro* atlikto tyrimo metu geresnėmis inhibitorinėmis savybėmis prieš skirtingas *Fusarium* rūšis pasižymėjo *L. plantarum*, kurio slopinimo diametras svyravo nuo 12,67 mm iki 17,33 mm, kai *B. amyloliquefaciens* *Fusarium* augimą stabdė 10,43–10,87 mm.

Po derliaus nuėmimo ypač svarbios grūdų laikymo sąlygos: temperatūra, drėgmės kiekis, vandens aktyvumas ( $A_w$ ), laikymo laikas, deguonies lygis, tarša kenkėjais ir pan. (Cheli et al., 2017). Mikrobiologinės taršos mažinimui naudojami fizikiniai, cheminiai ir biologiniai grūdų dezaktyvavimo metodai. Apdorojimo metodams taikomi pagrindiniai reikalavimai:

- 1) taikymo metu negali susidaryti toksiniai produktai;
- 2) po apdorojimo turi išlikti produkto maistinė vertė;

3) antimikrobinis metodas negali turėti neigiamos įtakos tolimesniems produkto perdirbimo procesams (Jard et al., 2011).

Šiuo metu dėl nedidelės kainos plačiausiai naudojami chlorino ir hipochlorito junginiai pasižymi stipriomis oksidacinėmis savybėmis. Visgi dėl didėjančio susirūpinimo, kad naudojimo metu susidaro toksiniai šalutiniai produktai, išlieka pašalinis skonis ir kvapas, o antimikrobinis efektyvumas nedidelis (esant didesniai nei 4 log ksv/g grūdų užterštumui grybų sporos inaktyvuojamos tik < 20 proc.), ieškoma alternatyvių grūdų nukenksminimo būdų (Los et al., 2018).

Nuo 1997 m. ozonui buvo suteiktas GRAS statusas (Graham, 1997), o po ketverių metų FDA patvirtino kaip maisto priedą ir antimikrobinę medžiagą, tinkančią visoms maisto produktų rūšims (O'Donnell et al., 2012). Taip ozonavimas pradėtas plačiai taikyti ir grūdų apdorojimui. Ozonas gaunamas prie molekulinės deguonies prijungus laisvąjį deguonies radikalą. Jį galima naudoti skystoje ar dujinėje fazėje, o po panaudojimo maiste nepastebima jokių pavojingų likučių (Los et al., 2018). Žinomi 2 pagrindiniai ozono veikimo mechanizmai – sulfhidrilinių grupių ir aminorūgščių oksidacija bei polinesočiųjų amino rūgščių oksidacija iki rūgščių peroksidų. Dėl šių priešasčių pažeidžiamas ląstelės apvalkalas, dėl to įvyksta ląstelių lizė ir mikroorganizmai inaktyvuojami (Greene et al., 2012). Nepaisant to, Dodd ir kiti (2011) nustatė, kad ozonavimas nepadeda sumažinti aerobinių mikroorganizmų skaičiaus maltuose miežiuose, nors mielės ir pelėsiai buvo inaktyvuoti 1,5 log ksv/g ir salyklo kokybei pakenkta nebuvo. Be to, grūdų nukenksminimui naudojant ozonuotą vandenį padidėja grūdų drėgnis (Dhillon et al., 2010).

Dar vienas šiuo metu naudojamas grūdų mikrobiologinės kokybės gerinimo būdas – jonizuojanti spinduliuotė – pradėtas naudoti dar 1950 m. 1963 m. FDA patvirtino JAV 0,5 kGy apšvitą kaip grūdų mikrobiologinės kontrolės metodą (Lung et al., 2015). Šiuo metu Ukrainoje ir Rusijoje leidžiama naudoti 0,7 kGy, Kanadoje – 0,75 kGy, Čilėje, Kosta Rikoje, Indijoje ir Tailande – 1 kGy apšvitos dozę (Freita-Silva et al., 2015). Išskiriami 3 pagrindiniai šios technologijos tipai:

- 1)  $\gamma$ -spinduliai, generuojami radioaktyvių kobalto ( $^{60}\text{Co}$ ) arba cezio ( $^{137}\text{Cs}$ ) izotopų;
- 2) elektronų pluoštas;
- 3) elektronų greitintuvu sukuriama rentgeno spinduliai (Los et al., 2018).

Švitinant jonizuojančia spinduliuote tiesiogiai pažeidžiama bakterinė DNR ir susidaro reaktyvios deguonies rūšys (ROS), kurios pažeidžia ląstelių metabolinius kelius ir skatina viduląstelinę oksidaciją, dėl ko ląstelės žūsta (Lung et al., 2015). Deja, nors didelės dozės padeda visiškai sunaikinti mikroorganizmus, tačiau naudojant didesnes nei 1,5–2,5 kGy neigiamai paveikiama ir kviečių kokybė (Salem et al., 2016).

Nejonizuojančiai spinduliuotei priskiriamos mikrobangos, ultragarsas ir UV šviesa. Pastaroji kaip antimikrobinis metodas žinoma jau daugelį metų. Visgi UV šviesos (>180 nm) naudojimas ribotas, kadangi dėl DNR pažeidimų suprastėja produktų kokybė, priklausomai nuo vandens kiekio kyla mėginio temperatūra. Siekiant sumažinti šiuos šalutinius efektus dabar pradedama taikyti impulsinė UV šviesa (Schmidt et al., 2018). Šio metodo naudojimą grūdų mikrobiologinės kokybės gerinimui riboja grublėtas ir nelygus grūdų paviršius (Oms-Oliu et al., 2010). Ir nors galima gauti net 4 log ksv/g mikroorganizmų žūtį, tačiau kartu sumažėja ir daigumas (Maftei et al., 2014). Mikrobangos (300 MHz – 300 GHz) turi daug privalumų: metodas saugus, efektyvus ir draugiškas aplinkai, deja, dažniausiai paveikia maisto kokybę. Veikiant mikrobangomis dėl molekulių judėjimo impulsiniame elektromagnetiniame lauke produktas pradeda šilti iš vidaus, dėl to denatūruoja baltymai, fermentai ir nukleorūgštys – prastėja produkto kokybė (Schmidt et al., 2018). Po apdorojimo sumažėja grūdų daigumas, o ir antimikrobinio poveikio efektyvumui pagerinti geriau šį metodą derinti su kitais mikroorganizmų streso faktoriais, pvz. rūgštiniu pH (Los et al., 2018). Maisto pramonėje vienas iš mikroorganizmų dezaktyvavimo būdų – ultragarsas. Jis skirstomas į 2 kategorijas: aukšto dažnio (2–20 MHz ir žemo garso intensyvumo – 0,1–1 W/cm<sup>2</sup>) ir aukšto intensyvumo (10–1000 W/cm<sup>2</sup>, kurio dažnis žemas (2–20 MHz) (Bilek ir Turantaş, 2013). Metodo efektyvumas priklauso nuo garso galios – esant pakankamai didelei ir vieno ultragarso pakanka mikroorganizmams sunaikinti, tačiau dažniau ultragarsas derinamas su kitais antimikrobiniais metodais – karščiu ar dezinfekciniais agentais. Taikyti šį metodą grūdų mikrobiologinei kontrolei sudėtinga, nes mėginys turi būti vandenyje, be to, nevienodas grūdų dydis, kuris šiuo atveju yra sąlyginai didelis, trukdo užtikrinti vienodą kavitaciją, kuri yra būtina (Schmidt et al., 2018).

Naujausias ir vienas labiausiai tiriamų metodų – šalta plazma. Taikant šį metodą mikroorganizmai naikinami ne dėl karščio, o dėl susidariusių ROS ir reaktyvių azoto rūšių (Scholtz et al., 2015). Kol kas nėra nusistovėjusios geriausios apdorojimo sąlygos ir ieškoma efektyviausių variantų. Atlikti tyrimai rodo, kad sąlygos, lemiančios geriausią daigumo lygį, skiriasi nuo geriausiai veikiančių antimikrobiškai (Butscher et al., 2016), be to, po poveikio gali sumažėti grūdų vandens kiekis, sausasis svoris ir daigumas (Butscher et al., 2016; Zahoranová et al., 2016).

### 1.2.1. Fotosensibilizacija

Nuo senų laikų yra žinoma, kad ultravioletinė spinduliuotė gali sukelti dideles pažaidas ląstelėms, o regimoji šviesa yra saugi biologinėse sistemose ir tiesioginių pažeidimų

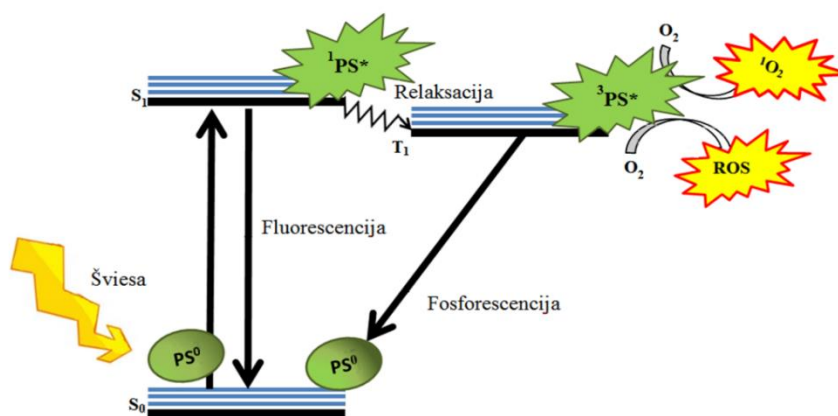
nesukelia. Tačiau egzistuoja medžiagos – fotosensibilizatoriai, kurie, sužadinti regimosios šviesos, geba produkuoti ROS ir pažeisti akceptorines molekules (Hamblin, 2017). Pagrindinės šių medžiagų savybės: gebėjimas efektyviai sugerti fotonus, didelis energijos pernašos į tripletinę būseną našumas ir ilgas tripletinės būsenos gyvavimo laikas (Luksiene ir Brovko, 2013).

Fotosensibilizacijos metu vyksta dvi pagrindinės reakcijos, kurias atvaizduoja Jablonskio diagrama (1.1 pav.). Sužadinus elektroną šis patenka į labai nepastovų aukštesnį energijos lygmenį, todėl stengiasi grįžti į pradinę padėtį. Tai trunka mažiau nei  $10^{-13}$  s. Sužadintas elektronas turi 3 kelius, kuriais vykdo relaksaciją:

- 1) vidinė konversija, kurios metu energija į aplinką išleidžiama šilumos pavidalu;
- 2) interkombinacinė konversija, kai elektronas persoka į tripletinę energinę būseną;
- 3) fluorescencija, kurios metu išspinduliuavusi fluorescencijos fotoną molekulė grįžta į pradinę padėtį (Hamblin, 2017).

Patekęs į tripletinę būseną sensibilizatorius inicijuoja dviejų pagrindinių tipų reakcijas (Hamblin, 2016).

Pirmo tipo reakcijos metu fotosensibilizatorius tiesiogiai sąveikauja su šalia esančiomis molekulėmis, paimdamas ar atiduodamas elektroną – taip susidaro chemiškai labai aktyvūs radikalai, kurie reaguodami su deguonimi sudaro radikalus ar radikalų jonus (superoksianijono radikalą  $\bullet\text{O}_2^-$  arba peroksidaradikalą  $\bullet\text{HO}_2$ ). Visiškai redukuotam fotosensibilizatoriui reaguojant su deguonimi susidaro vandenilio peroksidas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Šio tipo reakcijos vyksta efektyviausiai aplinkoje esant nedaug deguonies (Baptista et al., 2017).



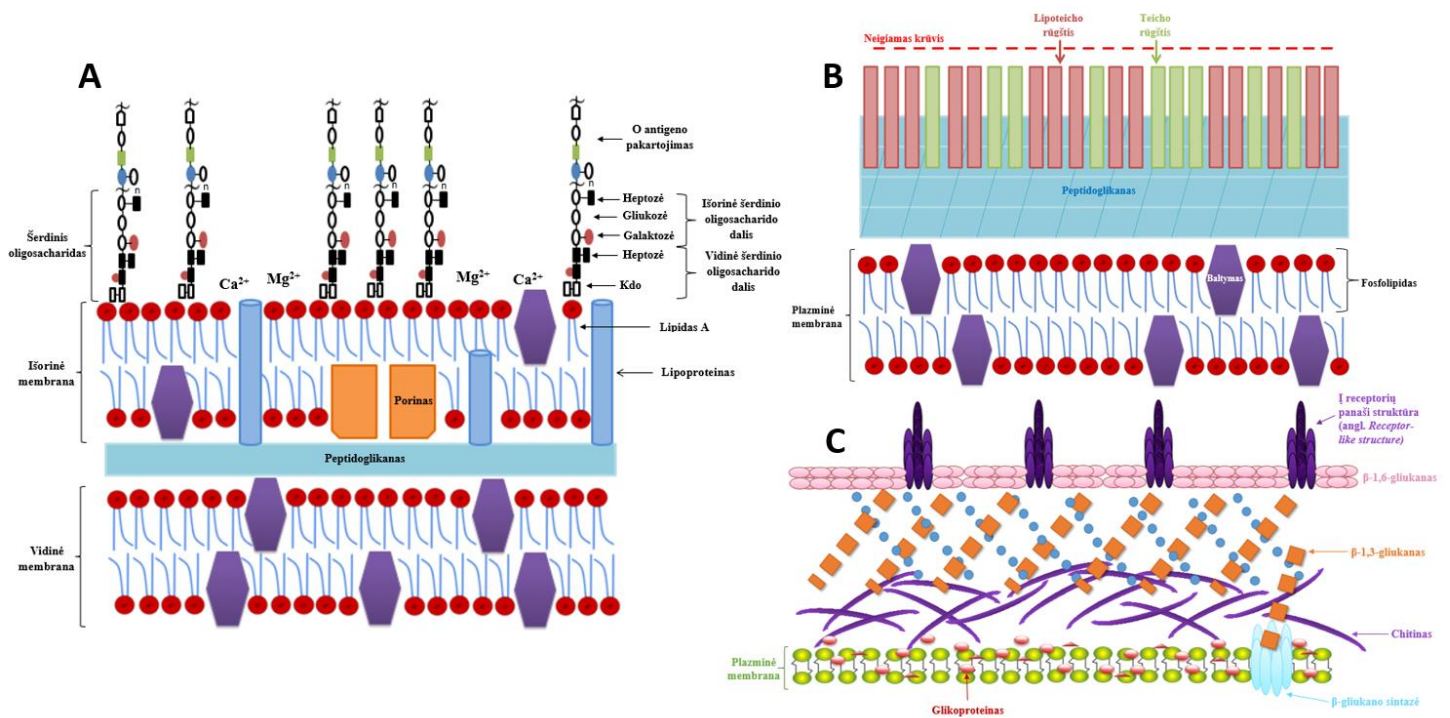
1.1 pav. Jablonskio diagrama (pagal Tegos et al., 2012)

Antro tipo reakcijoje dalyvauja singuletinis deguonis, atsakingas už ląstelėms sukeltus citotoksinius procesus. Pagrindinės singuletinio deguonies reakcijos vyksta su:

- 1) nesočiosiomis riebalų rūgštimis, cholesteroliu, susidarant hidroperoksidams;

- 2) heterocikliniais junginiais, pvz.: histidinu, susidarant endoperoksidams;
- 3) organiniais sulfidais, pvz.: metioninu, susidarant sulfoksidams (Baptista et al., 2017).

Fotosensibilizacija gali būti taikoma tiek mikrobu sukeliams ligoms gydyti (fotosensibilizuota antimikrobinė chemoterapija), tiek ir maistui apsaugoti nuo žalingų mikroorganizmų (Luksiene ir Brovko, 2013). Fotosensibilizatoriams, naudojamiems antimikrobiniais tikslais, yra taikomi papildomi reikalavimai – jie turi gebėti pasiekti ir įsiskverbti į bakterijų plazminę membraną, taip pat norima, kad jie veiktų platų bakterijų spektrą bei nesukeltų atsparumo (Alves et al., 2014).



**1.2 pav.** Gramneigiamos bakterijos (A), gramteigiamos bakterijos (B) ir mikroskopinio grybo (C) ląstelės sienelės schema (pagal Vatansver et al., 2013; Raetz ir Whitfield, 2002)

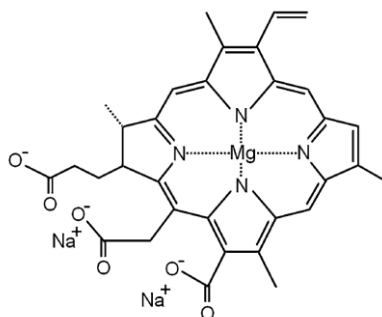
Bakterijos skirstomos į gramteigiamas ir gramneigiamas. Vienas pagrindinių šių dviejų grupių skirtumų – sienelė (1.2 pav.), todėl bakterijos nevienodai jautrios fotosensibilizacijai (Alves et al., 2014). Gramteigiamos bakterijos turi iš lipoteicho ir teicho rūgščių, inkorporuotų į kelis peptidoglikano sluoksnius (30–100 nm), sienelę, pro kurią dėl porų gali praeiti ir didelės molekulės. Tuo tarpu gramneigiamos bakterijos turi papildomą 10–15 nm storio išorinę membraną, sudarančią sandarų barjerą antimikrobinėms medžiagoms. Jos išorinėje dalyje yra tankiai išsidėsčiusios molekulių funkcinės grupės – lipopolisacharidai, lipoproteinai ir β-statinės formos (angl. *β-barrel*) baltymai, suteikiantys ląstelei neigiamą krūvį (Silhavy et al., 2010). Dėl šios priežasties gramteigiamos bakterijos yra daug jautresnės

fotosensibilizacijai nei gramneigiamos bakterijos, tačiau kovojant su gramneigiamomis bakterijomis naudojami katijoninis polipeptidas polimiksinas B arba cheminiai junginiai, surišantys magnio ir kalcio jonus, neutralizuojantys ląstelės paviršiaus neigiamus krūvius ir padedančius fotosensibilizatoriams prasiskverbti pro bakterijų išorinę membraną (Alves et al., 2014). Nors mielės ir mikroskopiniai grybai taip pat turi tankią periplazminę ertmę tarp ląstelės sienelės ir plazminės membranos, tačiau fotosensibilizatoriui ji nesukelia tiek problemų, kiek gramneigiamų bakterijų išorinė membrana, nors ir nėra tokia pralaidi kaip gramteigiamų bakterijų membrana (Sperandio et al., 2013).

Nepaisant naudojamo fotosensibilizatoriaus, nustatyta, kad po 5–10 min inkubacijos tamsoje jie pirmiausia prisitvirtina prie lipopolisacharidų, baltymų ar fosfolipidų (priklausomai nuo afiniškumo) veikiant elektrostatinėms jėgoms. Gramneigiamose bakterijose lokalizacijos vieta – išorinė membrana (tarp išorinės ir periplazminės erdvių), o gramteigiamose bakterijose – plazminė membrana. Apšvitinus prasideda ROS gamyba ir pirmieji jų taikiniai gramneigiamose bakterijose yra lipopolisacharidai ir baltymai, o gramteigiamose bakterijose – baltymai ir fosfolipidai (Alves et al., 2014).

#### 1.2.1.1. Chlorofilinas

Chlorofilinas yra pusiau sintetinis porfirinas, išgautas iš chlorofilo šarminės hidrolizės būdu. Savo sudėtyje chlorofilinas turi 4 pirolo žiedus, sudėtyje turinčius azoto, surištus su centriniu magnio atomu (1.3 pav.). Pagrindinis skirtumas lyginant su chlorofilo molekule yra tas, kad čia fitolio uodegos yra pakeistos natriu. Būtent šios uodegos chlorofilui suteikia hidrofobiškumą ir mažina susirišimo su kancerogenais ir mutagenais efektyvumą. Chlorofilinas yra puikus antioksidantas, pasižymintis antigenotoksiniu ir antikancerogeniniu efektu (Nagini et al., 2015).



**1.3 pav.** Chlorofilino cheminė struktūra (pagal Luksiene ir Brovko, 2013)

Chlorofilai, bakteriochlorofilai ir jų dariniai yra plačiai naudojami kaip fotosensibilizatoriai fotodinaminėje terapijoje (Luksiene ir Paskeviciute, 2011). Šios



medžiagos gausiai paplitusios, lengvai išgaunamos ir dėl to vienos pigiausių (Krüger et al., 2019).

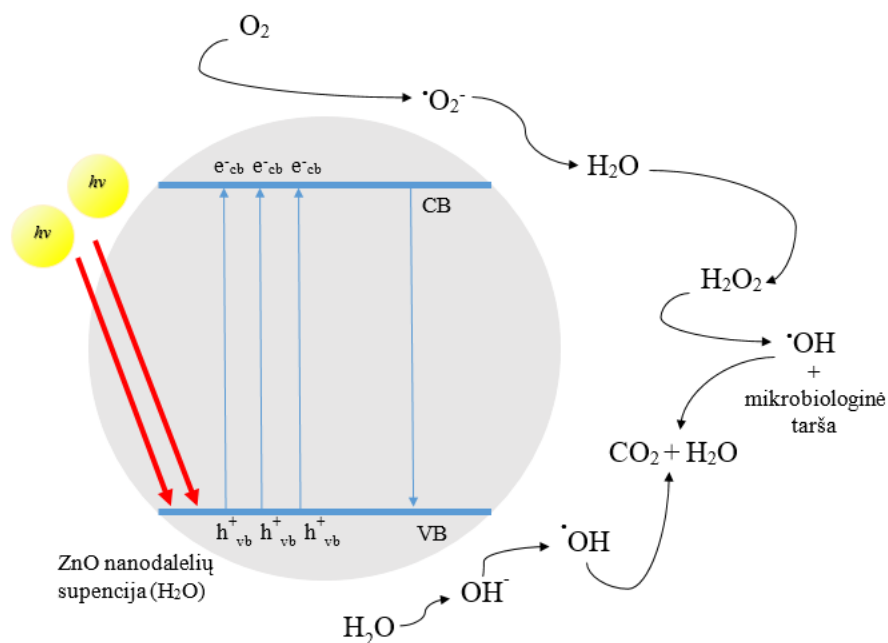
Maža to, chlorofilinas yra vandenyje tirpus maisto priedas (žymimas E 140ii), naudojamas kaip dažiklis tiek maisto, tiek kosmetikos pramonėje (López-Carballo et al., 2008). Pats savaime chlorofilinas yra netoksiškas – tik aktyvuotas šviesoje pradeda generuoti singletinį deguonį ir ROS, pasižyminčius antimikrobiniu poveikiu (López-Carballo et al., 2018). Chlorofilinas sulaukia ypač daug dėmesio, nes yra visiškai saugus ir nesukelia jokių neigiamų šalutinių efektų (Nagini et al., 2015).

Chlorofilino antimikrobinis poveikis įrodytas ne kartą tiek *in vitro* (Buchovec et al., 2017), tiek ir įvairiose maistinėse terpėse (Paskeviciute et al., 2019; Paskeviciute et al., 2018) ir net inkorporavus jį į maisto pakuotes (López-Carballo et al., 2018). Deja, chlorofilinas itin efektyvus tik prieš gramteigiamas bakterijas, tuo tarpu gramneigiamos bakterijos jam labiau atsparios dėl savo išorinės membranos (1.2 pav.). Kad būtent išorinė membrana trukdo chlorofilinui pilnai sunaikinti gramneigiamas bakterijas, buvo įrodyta panaudojant *E. coli* mutantą NR698, neturintį išorinės membranos, kurį pavyko inaktyvuoti beveik taip pat kaip gramteigiamą *Bacillus subtilis* (Krüger et al., 2019).

### 1.2.2. Fotokatalizė

Fotokatalize paremtos technologijos šiuo metu yra ypač populiarios dėl savo sugebėjimo veikiant šviesai suskaidyti įvairias toksines medžiagas. Tai gali padėti spręsti aplinkos taršos problemą. Fotokatalizė yra cheminė reakcija, indukuota šviesą sugeriančios kietosios medžiagos, kuri reakcijų metu ir po to lieka chemiškai nepakitusi. Nuo tradicinės katalizės fotokatalizė skiriasi savo termodinamika – katalizę riboja termodinamiškai galimos reakcijos, o fotokatalizės reakcijos kaupia energiją (Ohtani, 2013).

Reakcijų principas parodytas 1.4 pav. Elektronai, esantys elektronų pripildytoje valentingumo juostoje (VB; angl. *valence band*), sužadunami šviesa pereina į laisvą laidumo juostą (CB; angl. *conduction band*), palikdami teigiamas „skylės“ ( $h^+$ ) VB. Šios „skylės“ atsakingos už fotokatalizatoriaus paviršiuje adsorbuotų medžiagų oksidacijos-redukcijos reakcijas (Ohtani, 2013).



**1.4 pav.** Bendras fotokatalizės mechanizmas (pagal Lee et al., 2016)

Idealiomis sąlygomis organiniai taršos šaltiniai mineralizuojami į anglies dioksidą (CO<sub>2</sub>), vandenį (H<sub>2</sub>O) ir mineralines rūgštis (Lee et al., 2016), tačiau pirmiausia tarpinių reakcijų metu susidaro ROS. ZnO nanodalelių suspensijoje esančios vandens molekulės reaguoja su elektronų „skylėmis“ (h<sup>+</sup>), dėl ko vandens molekulė skyla į •OH ir H<sup>+</sup>. Tuo pat metu O<sub>2</sub> molekulės, ištirpusios terpėje, paverčiamos superoksido radikalais (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>), kuris reaguodamas su H<sup>+</sup> virsta •HO<sub>2</sub>. Šioms reaktyvioms deguonies rūšims susidūrus su elektronais gaunamas vandenilio peroksido anijonas (HO<sub>2</sub><sup>-</sup>), kuriam reaguojant su vandenilio jonais susidaro vandeninio peroksidas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Gordon et al., 2011). Dėl neigiamo krūvio hidroksilo radikalas ir superoksidas negali pereiti ląstelių membranų, todėl tiesiogiai kontaktuoja su bakterijos išoriniu paviršiumi, o į ląstelės vidų patenka tik vandenilio peroksidas (Jalal et al., 2010). Visos reakcijos gali būti pavaizduojamos taip:

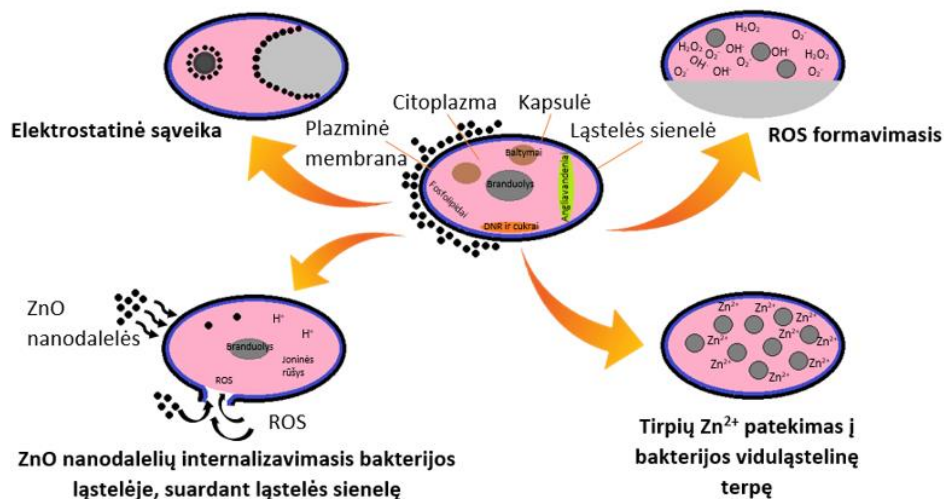
- 1)  $ZnO + hv \rightarrow ZnO + e^-_{cb} + h^+_{vb}$
- 2)  $e^-_{cb} + O_2 \rightarrow (\bullet O_2^-)$
- 3)  $h^+_{vb} + H_2O \rightarrow \bullet OH + H^+$
- 4)  $\bullet O_2^- + H^+ \rightarrow \bullet HO_2$
- 5)  $\bullet HO_2 + H^+ \rightarrow e^- \rightarrow H_2O_2$  (Espitia et al., 2012).

Dažniausiai fotokatalizei naudojami puslaidininkiai, tokie kaip titano dioksidas (TiO<sub>2</sub>), cinko oksidas (ZnO), geležies (III) oksidas (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), cirkonis (ZrO<sub>2</sub>), vanadžio oksidas (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), niobio pentoksidas (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ir volframo trioksidas (WO<sub>3</sub>) (Lee et al., 2016). Kol kas vienintelis komerciškai naudojamas fotokatalizatorius yra TiO<sub>2</sub> (Nosaka ir Nosaka, 2017).

### 1.2.2.1. ZnO nanodalelės

ZnO yra perspektyvi ir universali neorganinė medžiaga, galinti būti panaudojama daugybėje įvairių sričių. Žinomas kaip puikus II-VI puslaidininkis, turintis n tipo elektros laidumą ir pjezoelektrines savybes bei pasižymintis aukšta eksitonine surišimo energija (60 meV) kambario temperatūroje ir tiesioginiu plataus diapazono tarpu 3,3 eV, netoli UV spektro. Zn-O turi labai stiprų joninį ryšį, pasižymi katalitinėmis ir fotocheminėmis savybėmis (Sirelkhatim et al., 2015).

Esminės savybės, kuriomis apibūdinamos metalų, tarp jų ir ZnO, nanodalelės, yra dydis, sudėtis, kristališkumas ir morfologija. Nustatyta, kad kuo mažesnis ZnO nanodalelių dydis, tuo jos aktyviau veikia antimikrobiškai, kadangi tuo lengviau joms patekti į ląsteles ir „ardyti“ jas iš vidaus (Sirelkhatim et al., 2015). Be to, dėl didesnio paviršiaus ploto, taigi ir daugiau deguonies, reaguojančios su vandeniliu, susidaro daugiau vandenilio peroksido ir kitų ROS, pereinančių ląstelės sienelę ir sukeliančių ląstelių mirtį (Janaki et al., 2015). Įdomu tai, kad nustatyta, jog ZnO nanodalelės nėra kenksmingos žmogui (Colon et al., 2006). Šiuo metu ZnO yra vienas iš 5 cinko junginių, turinčių GRAS statusą (Espitia et al., 2012). Dažniausiai ZnO nanodalelės kaip antimikrobinis agentas naudojamas maisto pakuotėse (Espitia et al., 2012).



**1.5 pav.** Labiausiai tikėtini ZnO nanodalelių antimikrobinio poveikio mechanizmai (pagal Sirelkhatim et al., 2015)

Nėra nustatyto bendro ZnO nanodalelių veikimo mechanizmo, mokslininkai vis dar aiškinasi, koks jis. Pavyzdžiui, su 2 skirtingais mikromicetais atliktas tyrimas parodė, kad ZnO nanodalelės gali pasižymėti skirtingu antimikrobinio poveikiu: *Botrytis cinerea* hifai

deformavosi dėl paveiktų ląstelės funkcijų, tuo tarpu *Pencillium expansum* hifų žūtį sukėlė sustabdytas konidioporų ir konidijų vystymasis (Król et al., 2017). Kol kas nustatyti 2 labiausiai tikėtini antimikrobinio poveikio mechanizmai (1.5 pav.):

- 1) antimikrobinis cinko jonų poveikis;
- 2) ROS produkavimas, pažeidžiantis DNR, ląstelės sluoksnius ir baltymus, dėl to sutrukdomas mikroorganizmų vystymasis ir jie žūsta (Anitha et al., 2018).

Jau gana seniai žinoma, kad metalų jonai patys (*per se*) pasižymi antimikrobinio poveikiu (Seil ir Webster, 2012). Pasquet ir kiti (2014) parodė, kad už cinko antimikrobinį poveikį atsakingos beveik vien tik tirpios cinko rūšys. Li ir kiti (2017) nustatė, kad tiek jonai ( $ZnCl_2$ ), tiek nanodalelės ( $ZnO$ ) reikšmingai stabdo *Sclerotinia homoeocarpa* micelio augimą. Taip pat atlikti bandymai parodė, kad iš  $ZnO$  nanodalelių gauti cinko jonai gali paveikti įvairias bakterijų ląstelių veiklas, pvz.: glikolizę, transmembraninį protonų judėjimą ar toleranciją rūgštims, o cinko jonai ne iš nanodalelių pasižymi vien tik bakteriostatiniu poveikiu, nes sustabdo ląstelių proliferaciją (Seil ir Webster, 2012). Manoma, kad tai susiję su kitais  $ZnO$  nanodalelių antimikrobinio veikimo mechanizmais, kaip, pvz., ROS produkcija. Daugelio autorių teigimu, ROS generavimas yra pagrindinis  $ZnO$  antimikrobinio poveikio mechanizmas, susijęs su puslaidininkio savybėmis (reakcijos parodytos 1.2.2 skyriuje).

Buvo įrodyta, kad pirmiausia  $ZnO$  nanodalelės tiesiogiai prisiriša prie ląstelių, pažeidžia jų sienelę, sukeldamos citoplazmos turinio ištekėjimą. Tuo tarpu pačios  $ZnO$  nanodalelės, patekusios į ląstelės vidų, inhibuoja dehidrogenazes, ATPazių kompleksą, elektronų pernašos sistemą ir DNR replikaciją, suardo fermentus ir pažeidžia mitochondrijas. Ląstelės viduje vykstanti ROS produkcija sukelia oksidacinį stresą, pažeidžia DNR ir kitus ląstelių komponentus (Singh et al., 2018).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos ir prietaisai

#### 2.1.1. Bakterijų kamienai

Darbe naudotos bakterijų ir mikroskopinių grybų rūšys pateiktos 2.1 lentelėje.

**2.1 lentelė.** Tyrimams naudotos bakterijos ir pelėsiniai grybai

Rūšis	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> B	Laboratorijos kolekcija
<i>Fusarium oxysporum</i> (šeima <i>Nectriaceae</i> )	Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolekcija

#### 2.1.2. Terpės ir reagentai

Bakterijos augintos skystoje ir agarizuotoje Luria-Bertani (LB) terpėje, mikroskopiniai grybai – bulvių gliukozės agare (PGA). Informacija apie terpes pateikta 2.2 lentelėje.

**2.2 lentelė.** Terpių sudėtis

Terpė	Sudėtis (1 litro terpės)	Gamintojas
Agarizuota Luria-Bertani	Triptonas – 10,0 g, mielių ekstraktas – 5,0 g, natrio chloridas – 5,0 g + agaras – 15,0 g. pH – 7,0 ± 0,2	Liofilchem, Italija
Skysta Luria-Bertani	Triptonas – 10,0 g, mielių ekstraktas – 5,0 g, natrio chloridas – 5,0 g. pH – 7,0 ± 0,2	Liofilchem, Italija
Bulvių gliukozės agaras	Bulvių ekstraktas – 4,0 g, dekstrozė – 20,0 g, agaras – 15,0 g. pH – 5,6 ± 0,2 (25 °C temperatūroje)	Sigma-Aldrich, Vokietija

Eksperimentuose taip pat naudota vandenyje tirpi chlorofilino natrio druska (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), ZnO nanodalelių suspensija vandenyje (Sigma-Aldrich, Vokietija), natrio chloridas (NaCl, ≥99,5 proc.; Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), L-histidinas (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, ≥99,5 proc.; Sigma-Aldrich, Vokietija), tritonas X-100 (Sigma-Aldrich, Vokietija), PBS tabletės (Oxoid, Jungtinė Karalystė). SERS tyrimui naudotos sidabro nanodalelės, paruoštos naudojant trinatrio citratą (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 99 proc.; Merck-Chemicals, Vokietija) ir sidabro nitratą (AgNO<sub>3</sub>, 99 proc.; Merck-Chemicals, Vokietija).

Eksperimentuose naudotas bakterijų gyvybingumo rinkinys LIVE/DEAD® BacLight™ (Thermo Fisher Scientific, JAV).

Visi reagentai laikomi ir naudojami pagal gamintojų nurodymus. Prieš eksperimentus terpės sterilinamos autoklavuojant.

#### 2.1.2.1. Tirpalų paruošimas

**NaCl:** eksperimentuose naudojamas 0,9 proc. NaCl tirpalas ruošiamas 9 g NaCl druskos ištirpinant 1 l vandens. Gautas tirpalas autoklavuojamas tolimesniam naudojimui.

**ZnO nanodalelių:** pirmiausia pasirošiamas pradinės koncentracijos (10 mM) ZnO tirpalas, kuris nedelsiant ultragarsinamas 5 min. Paskui šį tirpalą skiedžiant steriliu distiliuotu vandeniu ruošiamas reikiamos koncentracijos tirpalas.

**PBS:** 1 PBS tabletė ištirpinama 100 ml vandens. Gautas tirpalas autoklavuojamas.

**Chlorofilino:** reikiamos koncentracijos chlorofilino tirpalas ruošiamas autoklavuotame 0,9 proc. NaCl tirpale.

**L-histidino:** reikiamas kiekis medžiagos ištirpinamas steriliame vandenyje.

#### 2.1.2.2. Sidabro nanodalelių SERS paruošimas

Koloidinės sidabro nanodalelės ruošiamos pagal Lee ir Meisel (1982) metodiką: 50 ml 1 mM sidabro nitrato vandeninio tirpalo šildoma iki virimo temperatūros, tuomet įpilama 1 ml 1 proc. natrio citrato tirpalo ir visas mišinys laikomas prie virimo temperatūros dar valandą. Tuomet tirpalas greitai atvėsinaamas kambario temperatūroje. Viso paruošimo metu tirpalas intensyviai maišomas, kad būtų gautos sferinės formos nanodalelės, kurių dydis 60–80 nm.

Siekiant gauti geresnį nanodalelių sustiprinimą, koloidinis nanodalelių tirpalas centrifuguojamas (10 min, 500×g). Po to supernatantas nupilamas.

#### 2.1.3. Prietaisai

Eksperimentuose naudoti prietaisai: inkubatorius ES-20 (Biosan, Latvija), termostatas (Mammert, Vokietija), spektrofotometras UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, Vokietija), fluorescencinis spektrofotometras LS 55 (Perkin Elmer, Vokietija), centrifuga MPW-260R (MPW Med. Instruments, Lenkija), autoklavas (Systec VE-55, Vokietija), analitinės svarstyklės ABJ 220-4M (Kern & Sohn, Vokietija), distiliatorius (GFL, Vokietija), laboratorinė purtyklė BagMixer (Interscience, Prancūzija), maišeliai BagPage (Interscience,

Prancūzija), Furje transformuotas Raman spektrometras MultiRAM (Bruker Optik GmbH, Vokietija) su Nd:YAG lazeriu (sužadavimo bangos ilgis 1064 nm) ir skystu azotu aušinamu Ge diodo detektoriumi, dinaminė šviesos sklaidos sistema Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical, Jungtinė Karalystė), ultragarso vonelė EMMI<sup>®</sup> 20 HC (EMAG AG, Vokietija), fluorescencinis mikroskopas Olympus BX-51 (Olympus Corporation, Japonija).

### 2.1.3.1. Šviesos šaltinio prototipas

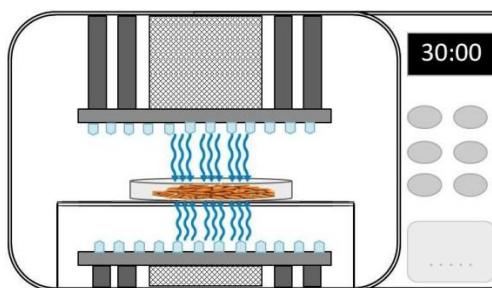
Šviesos šaltinio prototipas sukonstruotas Vilniaus Universiteto Fotonikos ir nanotechnologijų institute (2.1 pav.). Prototipo viduje sumontuota vėsinimo sistema, kuri neleidžia mėginiams įkaisti, nes eliminuoja švitinant susidariusią šilumą. Kaip šviesos šaltinis naudojami indžio galio nitrido (InGaN) diodai (LED) (LED Engine Inc., JAV). Maksimalus spinduliuojamos šviesos intensyvumas pasiekiamas ties 405 nm bangos ilgiu. Mėginiams tenka 9,6 mW/cm<sup>2</sup> intensyvumo šviesa (šviesos intensyvumas išmatuotas 3 Sigma galios ir energijos matuokliu su piroelektriniu detektoriumi J25LP04, Coherent (Sigma, JAV). Mėginiui tenkanti šviesos dozė apskaičiuojama pagal formulę:

$$D = P \times t,$$

kur: D – šviesos dozė (J/cm<sup>2</sup>),

P – galia (W/cm<sup>2</sup>),

t – švitinimo laikas (s).



2.1 pav. Šviesos šaltinio prototipo schema

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Tiriamųjų medžiagų šviesos sugerties, fluorescencijos intensyvumo ir dalelių dydžio nustatymas

Šviesos sugerties ir fluorescencijos (žadinimas 405 nm bangos ilgiu, skenavimo greitis 200 nm/min, ex Slit – 10 nm, em Slit – 4 nm) spektrai matuojami naudojant 9,99 mm

kvarcines kiuvetes (spindulio kelio ilgis 1 cm), įpylus 3,5 ml tiriamojo tirpalo. Fluorescencijos intensyvumas nustatinėjamas tiek gryname chlorofilino tirpale, tiek įlašinus 20 µl detergento – tritono X-100, kuris išardo agregatus.

Dalelių dydis matuojamas dinamine šviesos sklaidos sistema Zetasizer Nano S.  $10^{-7}$ – $5 \times 10^{-6}$  M Chl mėginiai matuojami iškart po paruošimo,  $5 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-3}$  M ZnO nanodalelių pirmiausiai palaikomi 5 min ultragarso vonelėje. Priklausomybės nuo ultragarsinimo laiko nustatymui matuojami neultragarsintas, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min ir 15 min ultragarsinti  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių mėginiai. Visi ZnO nanodalelių mėginiai matuojami tiek iš karto po ultragarsinimo, tiek po 24 val.

### 2.2.2. *F. oxysporum* augimo inhibicija

Eksperimentui naudojama agarizuota PGA terpė, pasiruošta su  $5 \times 10^{-4}$  M arba  $5 \times 10^{-3}$  M Chl, arba su  $10^{-3}$  M ar  $5 \times 10^{-3}$  M ZnO nanodalelių priedu. Pagal gamintojo instrukciją pasiruošta PGA terpė sterilinama autoklavuojant, atvėsinama iki 50 °C temperatūros. Tuomet į ją įdedamas reikalingas kiekis Chl miltelių arba ZnO nanodalelių suspensijos. Pasiruošta terpė išpilstoma į Petri lėkštes.

Prieš eksperimentą 0,5 cm savaitę auginto *Fusarium oxysporum* micelio persėjama ant šviežios agarizuotos PGA terpės (kontrolė) ir PGA terpės su Chl arba ZnO nanodalelių priedu (tiriamieji ir tamsinės kontrolės mėginiai), inkubuojama 24 val. 25 °C temperatūroje.

Po 24 val. tiriamosios lėkštelės švitinamos iš viršaus ir apačios 30 min  $9,6 \text{ mW/cm}^2$  intensyvumo 405 nm šviesa (mėginiui tenkanti dozė –  $18 \text{ J/cm}^2$ ). Kontrolės nešvitinamos. Po to Petri lėkštelės su *F. oxysporum* gražinamos į termostatą, kur auginamos kiekvieną dieną matuojant micelio skersmenį kol kontrolinėse lėkštelėse (be tiriamųjų medžiagų) micelis pasiekia kraštus. Gauti rezultatai perskaičiuojami procentais.

### 2.2.3. Bakterijų kultūros auginimas

Ruošiantis eksperimentui *E. coli* kolonijos nuo agarizuotos LB terpės perkeliama į šviežią skystą LB terpę. Inkubuojama 37 °C temperatūroje 24 val. Po to išaugusi kultūra persėjama į 20 ml skystos LB terpės ir laikoma per naktį (apie 16 val.) 37 °C temperatūroje, aeruojant 120 apm greičiu. Bakterijų koncentracija nustatoma matuojant optinį tankį ties 540 nm bangos ilgiu kvarcinėse kiuvetėse. Naktinė kultūra praskiedžiama šviežia LB terpe apie 20 kartų, kad optinis tankis būtų 0,164 o.v. Persėta kultūra auginama inkubatoriuje tomis



pačiomis sąlygomis apie 2 val., kol bakterijos pasiekia eksponentinio augimo fazę ( $10^8$  ksv/ml, OT - 0,9).

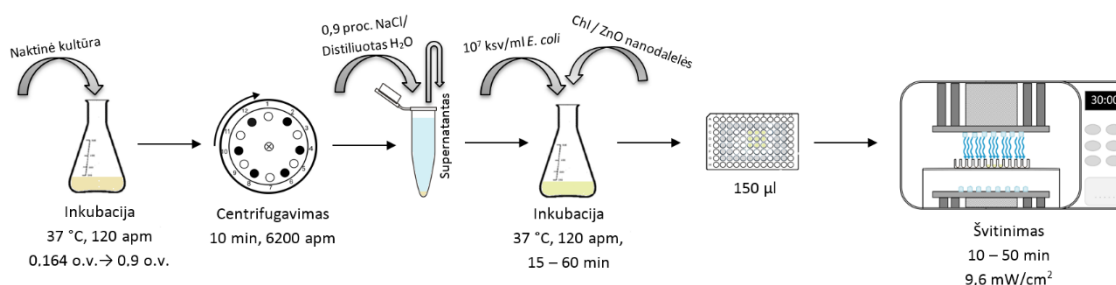
Bakterijų suspensija centrifuguojama 10 min 6200 apm greičiu. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 0,9 proc. NaCl tirpale (eksperimentams su Chl) arba distiliuotame vandenyje (eksperimentams su ZnO nanodalelėmis) iki  $10^7$  ksv/ml – koncentracijos, kurią naudojame eksperimentuose.

#### 2.2.4. *E. coli* veikimas chlorofilinu indukuota fotosensibilizacija (Chl-photo) ir fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis

Pirmiausia pasiruošta kaip aprašyta 2.2.3. skyriuje  $10^7$  ksv/ml *E. coli* suspensija nustatytą laiką inkubuojama tamsoje su tiriamosios koncentracijos Chl arba ZnO nanodalelių tirpalu (37 °C temperatūroje, aeruojant 120 apm greičiu). Tokiomis pačiomis sąlygomis laikomas ir kontrolinis mėginys, kuriame vietoj tiriamosios medžiagos naudojamas sterilus 0,9 proc. NaCl arba distiliuotas vanduo.

Po inkubacijos mėginiai išpilstomi po 150  $\mu$ l į plokščiadugnius šulinėlius ir švitinami nustatytą laiką. Kontroliniai mėginiai nešvitinami.

Bendra eksperimento schema pateikta 2.2 pav.



2.2 pav. *E. coli* dezaktyvacijos schema

#### 2.2.5. Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antibakterinio poveikio ir reaktyvių deguonies rūšių (ROS) įtakos jam įvertinimas

Tyrimui *E. coli* veikiama pagal 2.2.4. skyriaus schemą. Antimikrobinio efektyvumo nustatymui naudojamos  $1,5 \times 10^{-5}$  M Chl (inkubacija: 1 h) ir  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių (inkubacija: 30 min) koncentracijos. Siekiant įvertinti ROS įtaką tiriamųjų medžiagų antimikrobiniam efektyvumui po inkubacijos į pusę šulinėlių su tiriamaisiais įpilama 3 mM L-

histidino (ROS gesiklio). Mėginiai švitinami 10, 20, 30, 40 arba 50 min (dozės: 6, 12, 18, 24, 30 J/cm<sup>2</sup>). Po to atliekami dešimtkarčiai praskiedimai ir sėjimai paviršiniu būdu ant agarizuotos LB terpės. Lėkštelės su bakterijomis inkubuojamos 24 val. 37 °C temperatūroje. Paskui suskaičiuojami ksv kiekvienoje lėkštelėje, rezultatai išreiškiami dešimtainiu logaritmu.

#### 2.2.6. Paveiktų *E. coli* ląstelių fluorescentinė mikroskopija

Ląstelės paruošiamos kaip 2.2.4. skyriuje. Naudojama  $5 \times 10^{-4}$  M Chl tirpalas (inkubacijos laikas: 1 h) ir  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių suspensija (inkubacija: 30 min). Mėginiai su abiem medžiagomis švitinimi 50 min. Po to ląstelės 10 min centrifuguojamos 6200 apm greičiu, sukonzentruojamos ~10 kartų ir dažomos naudojant bakterijų gyvybingumo nustatymo rinkinį LIVE/DEAD® BacLight™. Rinkinį sudaro 2 tipų dažai – propidžio jodidas (ląstelių su pažeistomis membranomis nudažymui raudona spalva) ir SYTO 9, kurie gyvas ląsteles nudažo žaliai. Dažai sužadunami 450–490 nm bangos ilgio šviesa. Mikroskopavimui naudojamas fluorescentinis mikroskopas naudojant violetinės šviesos filtrą.

#### 2.2.7. *E. coli* ataugimo po poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis įvertinimas

*E. coli* augimo kreivės buvo matuotos turbidometrinio metodu. Kaip 2.2.4. skyriuje paruoštos ląstelės, inkubuotos 30 min su  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelėmis ir švitintos 30 min arba 50 min, grąžinamos į šviežią LB terpę ir laikomos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje (120 apm). Tamsinės kontrolės (su ZnO nanodalelėmis, bet nešvitintos) ir kontrolinės (inkubuotos distiliuotame vandenyje ir nešvitintos) ląstelės taip pat perkeliamos į šviežią LB terpę inkubavimui tomis pačiomis sąlygomis. Kas valandą matuojamas visų mėginių optinis tankis prie 540 nm bangos ilgio. Matavimas trunka 26 val.

#### 2.2.8. Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos antibakterinio poveikio priklausomybės nuo Chl koncentracijos įvertinimas

Eksperimentas vykdomas kaip aprašyta 2.2.4. skyriuje. Iš viso tiriami 5 mėginiai: kontrolinis (be Chl, inkubuotas 0,9 proc. NaCl tirpale ir nešvitintas) bei 4 skirtingų Chl koncentracijų:  $1,5 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $1,5 \times 10^{-4}$  M ir  $5 \times 10^{-4}$  M tirpalai, inkubuoti 1 valandą ir švitinti 30 min. Po poveikio atlikti dešimtkarčiai praskiedimai ir 100 μl praskiestų bakterijų suspensijos išsėta į Petri lėkšteles su LBA terpe paviršiniu būdu. Lėkštelės inkubuotos 24 val.

37 °C temperatūroje. Po to išaugusios bakterijų kolonijos suskaičiuotos ir išreikštos dešimtainiu logaritmu – log ksv/g.

#### 2.2.9. *E. coli* sąveikos su Chl įvertinimas, priklausomai nuo inkubacijos laiko

*E. coli* ir Chl tarpusavio sąveika buvo įvertinta fluorimetriškai. Bakterijų ląstelės, paruoštos kaip 2.2.3. skyriuje, inkubuojamos (37 °C, 120 apm) su  $1,5 \times 10^{-5}$  M Chl tirpalu 15 min arba 60 min. Po inkubacijos laiko ląstelės nucentrifuguojamos (10 min, 6200 apm) ir resuspenduojamos 0,9 proc. NaCl tirpale. Fluorescencijos intensyvumas matuojamas bendrame tirpale, supernatante ir resuspenduotose ląstelėse. Prisikabinęs prie ląstelių kiekis įvertinamas naudojant kalibracinę kreivę, pasidarytą naudojant skirtingas Chl koncentracijas:  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M,  $6 \times 10^{-6}$  M,  $7,5 \times 10^{-6}$  M,  $8 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M, ir apskaičiuojamas pritaikant lygtį:

$$y = a + b \times x,$$

kur: a – atidėjimas koordinatinių ašyje (taškas, kuriame linija kirs y ašį pagal esamas x ir y reikšmes) (angl. *intercept*), šiuo atveju  $a = 12,35647$ ;

b – nuolydis (regresijos linijos pokyčio koeficientas) (angl. *slope*), šiuo atveju  $b = 104,14105$ ;

y – fluorescencijos intensyvumo maksimumas;

x – Chl molekulių kiekis pasiruoštoje suspensijoje, supernatante arba prisikabinęs prie ląstelių.

#### 2.2.10. *E. coli* pažaidų po chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis nustatymas paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu

*E. coli* ląstelės tyrimui paruošiamos taip pat kaip 2.2.4. skyriuje. Paruošta suspensija su  $10^7$  ksv/ml bakterijų inkubuojama su  $5 \times 10^{-4}$  M Chl tirpalu 1 val. arba su  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių suspensija 30 min. Švitinamos – 50 min (dozė:  $30 \text{ J/cm}^2$ ), kontrolinės bakterijos nešvitinamos.

5 kartus koncentruotos bakterijos sumaišomos su koloidiniu nanodalelių tirpalu (2.1.2.2. skyrius) santykiu 1:1 ir pernešamos ant aliuminio folijos kaip vienas 25 µl lašas. Mėginiai matuojami 2 būdais – tiek tirpalo pavidalu, tiek išdžiovinti, FT-Raman spektrometru MultiRAM. Spektras registruojamas Ramano poslinkio regione  $200\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ .

Ėminio švitinimas ir išsklaidytos šviesos surinkimas atliekamas 90° kampu su auksu padengtu 90° kampiniu veidrodžiu, kurio židinio nuotolis yra 33 mm. Koncentruoto lazerio taško skersmuo – 100 μm. Lazerio galia, suteikianti geriausią signalo ir triukšmo santykį bei mažiausiai šildanti mėginį, naudota visiems matavimams – 100 mW. Raman spektrometro spektrinė skiriamoji geba nustatyta ties 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 2.2.11. Grūdų mikrobiologinės kokybės gerinimas panaudojant chlorofilinu indukuotą fotosensibilizaciją ir fotoaktyvuotas ZnO nanodaleles, poveikio daigumui įvertinimas

##### 2.2.11.1. *E. coli* inokuliacija ant grūdų

10<sup>7</sup> ksv/ml *E. coli* suspensija paruošiama taip pat kaip aprašyta 2.2.3. skyriuje. Naudojami grūdai, įsigyti iš Anykščių rajono ūkininko. Grūdai (6 grupės po 100 grūdų) panardinami į pasiruoštą suspensiją ir laikomi 30 min kambario temperatūroje, kad bakterijos prisitvirtintų.

##### 2.2.11.2. Antimikrobinė chlorofilinu indukuota fotosensibilizacija ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių savybių įvertinimas grūduose

Vykdomi 3 atskiri eksperimentai: 1 – su mezofilinėmis bakterijomis, natūraliai esančiomis grūdų paviršiuje, 2 – su *E. coli*, inokuliuota ant grūdų (2.2.11.1. skyrius), 3 – su mikroskopiniais grybais, natūraliai esančiais grūduose. Visi eksperimentai vykdomi pagal vienodą schemą.

Grūdai suskirstomi į grupes (100 grūdų kiekvienoje grupėje): 1 grupė: kontrolė, 2 grupė: šviesos kontrolė, 3 grupė: tamsinė kontrolė, 4 grupė: tiriamoji (veikiama Chl-photo arba fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis). 1 ir 2 grupės grūdai panardinami į 0,9 proc. NaCl tirpalą arba distiliuotą vandenį, 3 ir 4 grupės – į 5×10<sup>-4</sup> M Chl tirpalą 1 val. arba 10<sup>-3</sup> M ZnO nanodalelių tirpalą 30 min. Inkubacija vykdoma tamsoje. Po to grūdai 20 min džiovunami kambario temperatūroje, tamsoje. Po džiovinimo tiriamoji grupė (4) ir šviesos kontrolė (2) švitinama 30 min 405 nm bangos ilgio šviesa (dozė: 18 J/cm<sup>2</sup>). Kontrolinės grupės (1 ir 3) nešvitinamos. Po apdorojimo iš kiekvienos grupės atsveriami 1 g grūdų, jie užpilami 9 ml steriliu 0,9 proc. NaCl tirpalu arba distiliuotu vandeniu (priklausomai nuo tiriamosios medžiagos) ir susmulkinami 1 min homogenizuojant BagMixer specialiuose steriliuose BagPage maišeliuose. Atliekami dešimtkarčiai praskiedimai, sėjama paviršiniu būdu po 100

μl. Bakterijos sėjamos ant LBA terpės, mikromicetai – ant PGA terpės. Bakterijos inkubuojamos 24 val. 37 °C temperatūroje, mikromicetai – 5 paras 25 °C temperatūroje. Po to visose lėkštelėse suskaičiuojamas mikroorganizmų kiekis, jis išreiškiamas log ksv/g.

#### 2.2.11.3. Grūdų daigumo įvertinimas

Grūdai suskirstomi į 4 grupes (kiekvienoje grupėje 100 grūdų). Kontrolinė grupė (neveikiama) – pamerkiama į PBS tirpalą santykiu 1:4 (masės dalimis) ir inkubuojama 25 °C temperatūroje 12 val. 2 grupės grūdai (šviesinė kontrolė) 30 min mirkomi PBS, tuomet 25 min švitinami 405 nm bangos ilgio šviesa, po to 11,5 val. grąžinami į PBS. 3 grupės grūdai (veikiami Chl arba ZnO nanodalelių tirpalu, bet nešvitinami) – 30 min mirkomi  $5 \times 10^{-4}$  M Chl arba  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių tirpale, po to perkeliama į švarų PBS tirpalą ir ten laikomi dar 11,5 val. 25 °C temperatūroje. Paskutinės grupės grūdai 30 min mirkomi  $5 \times 10^{-4}$  M Chl arba  $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių tirpale, po to 30 min švitinami (šviesos dozė 18 J/cm<sup>2</sup>) ir perkeliama į švarų PBS tirpalą dar 11,5 val. Po inkubacijos PBS visi grūdai perkeliama į atskiras Petri lėkšteles ant sudrėkintos vatos. Daigumas vertinamas kasdien skaičiuojant sudygusius grūdus. Po 5 d. išmatuojamas visų sudygusių grūdų šaknelės ir stiebelio ilgis.

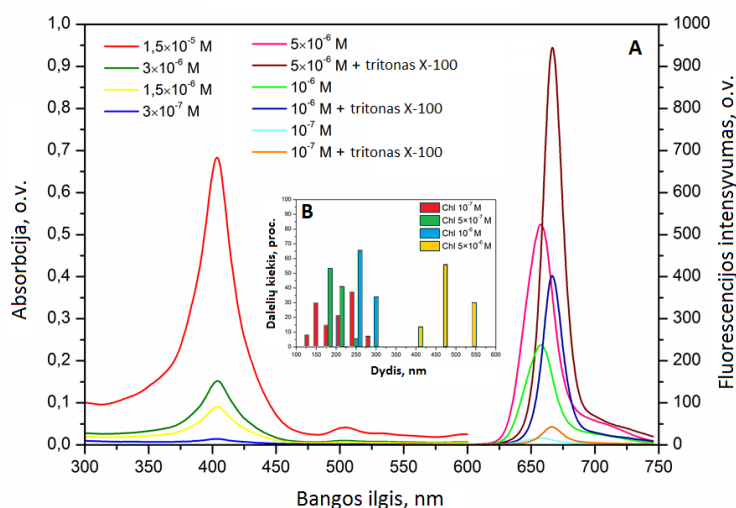
#### 2.3. Statistinė analizė

Visi eksperimentai kartoti bent po 3 kartus. Duomenų apdorojimui naudotos Microsoft Excel, Origin Pro 8.5 ir IBM SPSS Statistics 21 programos. Grafikuose pateikti rezultatų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai. Naudojant Kolmogorov-Smirnov testą nustatyta, kad skirstiniai normalieji ( $p > 0,05$ ). Duomenų reikšmingumas nustatytas naudojant 95 proc. pasikliautinąjį intervalą ( $p < 0,05$ ). Antigrybelinio poveikio įvertinimui ir apdorojimo metodo grūdų daigumui įtakos nustatymui naudota blokuotų duomenų dispersinė analizė. Antibakterinio poveikio, ROS įtakos jam, Chl-photo antibakterinio poveikio priklausomybės nuo Chl koncentracijos ir antimikrobinio poveikio grūduose (*in vivo*) įvertinimui bei daigų ir šaknų ilgio priklausomybės nuo apdorojimo būdo nustatymui buvo naudota vienfaktorinė ANOVA.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Fiziko-cheminės tiriamųjų medžiagų savybės

Pirmiausia buvo nustatinėjama  $3 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$  M Chl šviesos sugertis ir  $10^{-7}$ – $5 \times 10^{-6}$  M Chl fluorescencijos intensyvumas. 3.1 A pav. matyti, kad Chl šviesos sugerties maksimumas yra ties 405 nm šviesos bangos ilgiu. Būtent dėl šios priežasties tolimesniuose eksperimentuose naudojamas šviesos šaltinio prototipas, kurio maksimalus spinduliuojamos šviesos intensyvumas pasiekiamas ties tokiu pačiu bangos ilgiu (2.1.3.1. skyrius).

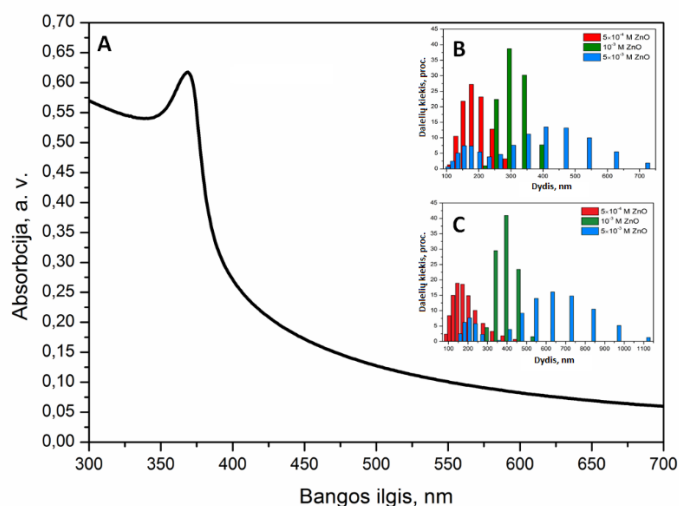


**3.1 pav. A** - Chl sugerties (kairėje) ir fluorescencijos intensyvumo (dešinėje) spektrai; **B** – Chl dalelių dydis, priklausomai nuo koncentracijos

Taip pat matyti, kad Chl yra fluorescuojanti medžiaga, linkusi agreguotis. Fluorescencijos intensyvumo maksimumas pasiekiamas ties 660 nm bangos ilgiu ir priklauso nuo koncentracijos. Įdėjus detergento tritono X-100 fluorescencijos pikas šiek tiek pasislenka į raudonos šviesos pusę ir smarkiai išauga dėl iširusių agregatų. Kuo didesnė koncentracija – tuo didesnė dalelių agregacija dėl Chl molekulėse esančių tetrapiroolinių struktūrų  $\pi$ - $\pi$  sąveikų. Tai patvirtinta ir 3.1 B pav., kuriame matome  $10^{-7}$ – $5 \times 10^{-6}$  M Chl dalelių dydžius. Mažiausioje tirtoje koncentracijoje ( $10^{-7}$  M) dalelių agregatai mažesni (125–280 nm), o didesnėse koncentracijose agregatų dydis išauga iki 550 nm.

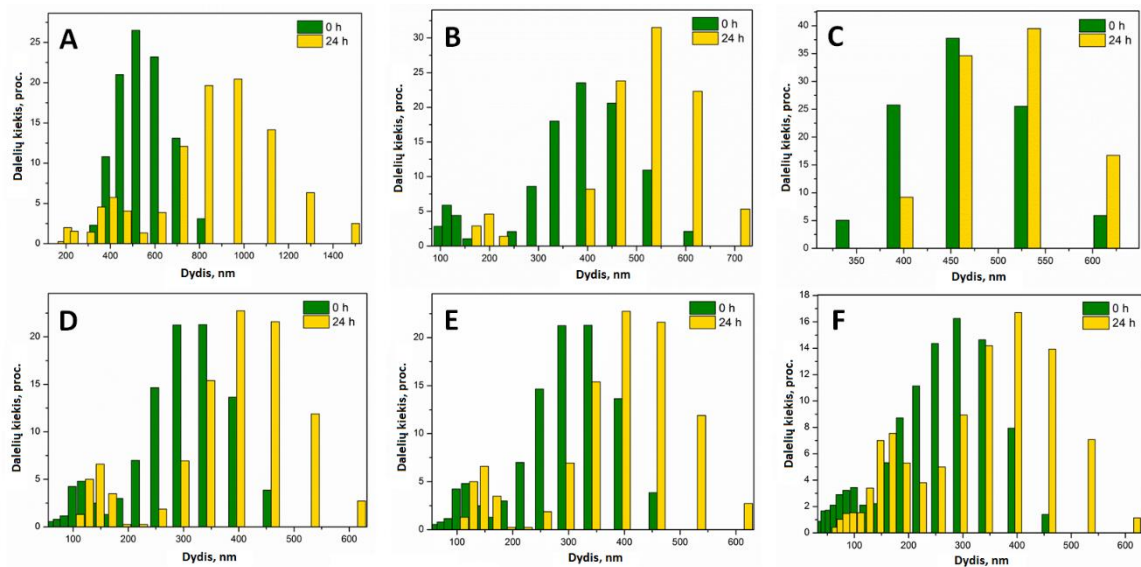
3.2 A pav. pavaizduota ZnO nanodalelių šviesos sugertis, kurios maksimumas yra ties 375 nm. Gautas tik vienas pikas rodo, kad medžiaga yra gryna, be priemaišų. 3.2 B pav. matyti ZnO nanodalelių dydžio priklausomybė nuo koncentracijos. Kaip ir tikėtasi,

mažiausios dalelės gautos esant mažiausiai tirtai koncentracijai ( $5 \times 10^{-4}$  M) – 100–280 nm, o padidinus koncentraciją 10 kartų ( $5 \times 10^{-3}$  M) dalelių dydis išauga iki 725 nm. 3.2 C pav. matyti ZnO dalelių dydis po 24 val. laikymo kambario temperatūroje. Akivaizdu, kad laikant nanodalelės agreguojasi –  $5 \times 10^{-3}$  M ZnO nanodalelių dydis po 24 val. išaugo iki 1125 nm.



**3.2 pav.** A – ZnO nanodalelių sugerties spektras ir įvairių koncentracijų dydis B – iškart; C – po 24 val. priklausomai nuo koncentracijos

Ultragarsinimo įtaka ZnO nanodalelių dydžiui parodyta 3.3 pav. Neultragarsintų nanodalelių dydis (3.3 A pav.) svyruoja nuo 300 nm iki 800 nm, po 24 val. dalelės agreguojasi ir pasiekia 1500 nm dydį. Vos 1 min ultragarsinimo (3.3 B pav.) išskaido agregatus ir dydžio maksimumas sumažėja iki 600 nm. Be to, ultragarsas net ir po 24 val. turi teigiamą efektą – agregatų dydis sumažėja per pusę lyginant su neultragarsintu mėginiu palaikius 24 val. kambario temperatūroje. 3 min ultragarsu veikiant ZnO nanodaleles (3.3 C pav.) jų dydis svyruoja nuo 335 nm iki 615 nm. 5–15 min ultragarso (3.3 D–F pav.) padeda sumažinti agregatus dar labiau – mažiausios dalelės tesiekia 25–50 nm, didžiausi agregatai – 450 nm. Tiesa, agregacija laikant kambario temperatūroje išlieka panaši – susidaro iki 625 nm dydžio agregatai.

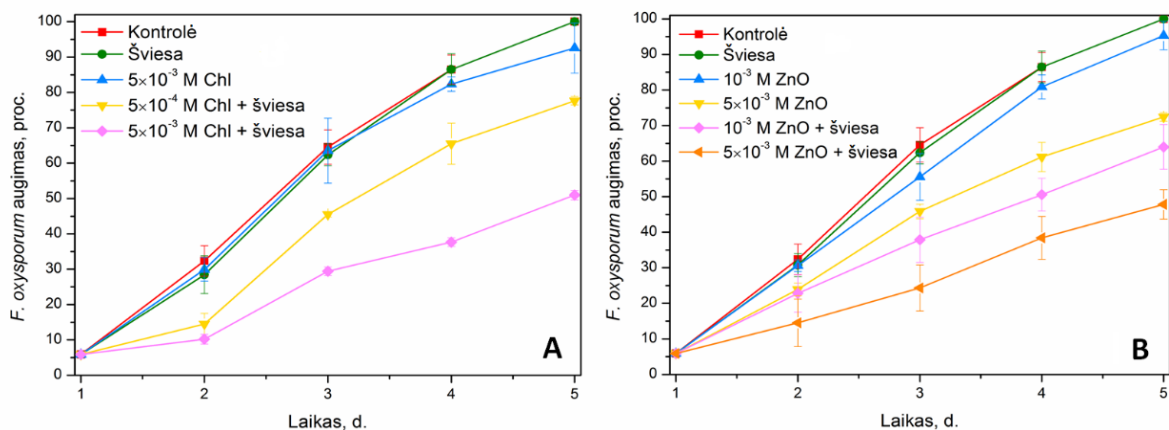


**3.3 pav.** ZnO nanodalelių dydžiai iškart ir po 24 val. **A** – neultragarsinus; **B** – po 1 min ultragarso; **C** – po 3 min ultragarso; **D** – po 5 min ultragarso; **E** – po 10 min ultragarso; **F** – po 15 min ultragarso

Atsižvelgiant į gautus rezultatus tolimesniuose eksperimentuose naudotos ZnO nanodalelės iškart po 5 min ultragarsinimo.

### 3.2. Antigrybelinis chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių poveikis prieš *Fusarium oxysporum*

Siekiant išsiaiškinti, ar tiriamosios medžiagos yra efektyvios prieš mikromicetus, atliktas tyrimas stebint augalų patogeno *Fusarium oxysporum* augimo inhibiciją. Gauti rezultatai pateikti 3.4 pav.



**3.4 pav.** *Fusarium oxysporum* inhibicija **A** – Chl-photo; **B** – fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis



Pateiktuose paveiksluose matyti, kad *F. oxysporum* augimas įprastomis sąlygomis trunka 5 dienas, kol apima visą Petri lėkštelės plotą. Vien 405 nm šviesa nekeičia augimo greičio ( $p=1,000$ ). Eksperimento su Chl-photo metu buvo tirtos 2 Chl koncentracijos:  $5 \times 10^{-4}$  M ir  $5 \times 10^{-3}$  M. Siekiant įsitinti, kad antimikrobiniam poveikiui neužtenka vien tiriamosios medžiagos, didesnė koncentracija testuota nešvitinant. 4–5 dienomis matomas šioks toks mikromiceto augimo inhibavimas, bet nereikšmingas ( $p=1,000$ ). Kitokie rezultatai gauti po fotosensibilizacijos. Po 5 dienų fotosensibilizacija su mažesne Chl koncentracija *F. oxysporum* augimą stabdė 32,4 proc. ( $p=0,000$ ), o su didesne koncentracija – net 50 proc. ( $p=0,000$ ). Lyginant abi koncentracijas tarpusavyje gauti statistiškai reikšmingi rezultatai ( $p=0,000$ ). Matyti, kad augimas tik pristabdomas ir mikromicetas nėra pilnai sunaikinamas.

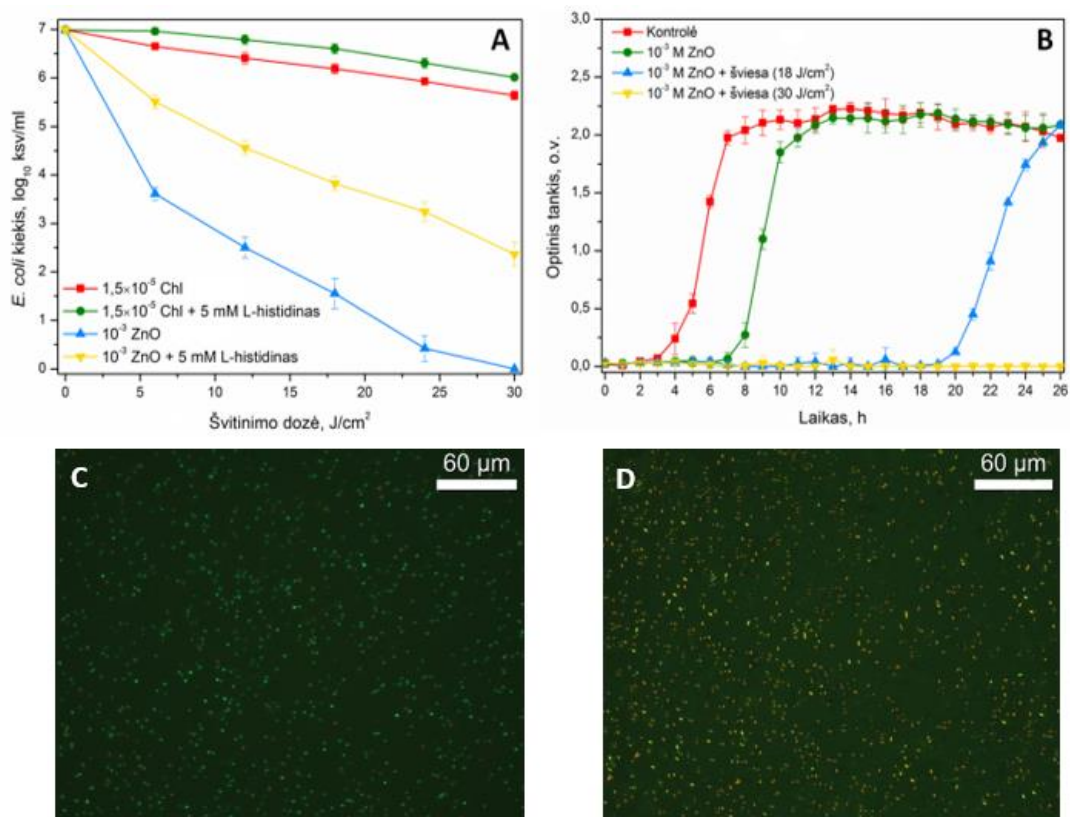
Panašūs rezultatai gauti ir su ZnO nanodalelėmis (3.4 B pav.). Tiesa, net ir nešvitintos ZnO nanodalelės ( $5 \times 10^{-3}$  M) sumažino *F. oxysporum* augimą 27,6 proc. ( $p=0,000$ ), o ir mažesnė koncentracija ( $10^{-3}$  M) statistiškai reikšmingai pristabdė mikromiceto vystymąsi ( $p=0,040$ ). Skirtumas tarp abiejų koncentracijų taip pat statistiškai reikšmingas ( $p=0,000$ ). Po 30 min švitinimo gauti dar geresni rezultatai – mažesnė ZnO nanodalelių koncentracija pristabdė mikroskopinio grybelio augimą 36 proc. ( $p=0,000$ ), didesnė – 52,2 proc. ( $p=0,000$ ). Skirtumas tarp koncentracijų taip pat statistiškai reikšmingas ( $p=0,000$ ).

Lyginant Chl-photo ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių poveikio rezultatus nustatyta, kad mažesnės naudotos fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių koncentracijos ( $10^{-3}$  M) sukelta grybo augimo inhibicija reikšmingai skyrėsi nuo fotosensibilizacija (su abiem Chl koncentracijomis) paveiktų *F. oxysporum* augimo ( $p=0,000$  ir  $p=0,002$ ). Visgi lyginant  $5 \times 10^{-3}$  M fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antigrybelinį poveikį su  $5 \times 10^{-3}$  M Chl-photo poveikiu skirtumas statistiškai nereikšmingas ( $p=1,000$ ), nors naudojant mažesnę Chl koncentraciją ( $5 \times 10^{-4}$  M) skirtumas reikšmingas ( $p=0,000$ ). Statistinė analizė pateikta 1 priede.

### 3.3. Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių antibakterinis poveikis prieš *Escherichia coli* ir veikimo mechanizmas

Siekiant įvertinti antibakterinį tiriamųjų medžiagų poveikį, buvo pasirinktos optimalios koncentracijos: Chl –  $1,5 \times 10^{-5}$  M ir ZnO nanodalelių –  $10^{-3}$  M. 3.5 A pav. matyti, kad fotoaktyvuotų ZnO antibakterinis poveikis stipresnis – 50 min švitinimas (šviesos dozė:  $30 \text{ J/cm}^2$ ) leidžia visiškai sunaikinti *E. coli* ( $p=1,000$ ), o Chl-photo tik nežymiai ( $1,35 \text{ log ksv/ml}$ ), tačiau statistiškai reikšmingai ( $p=1,000$ ) sumažina šių bakterijų skaičių (statistinis palyginimas pateiktas 2 priede). Bakteriocidinį fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių poveikį patvirtina ir fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos, kuriose matome, kad kontrolinės

bakterijos (3.5 C pav.) yra gyvos (žalios), o po sąveikos su fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis (3.5 D pav.) vyrauja raudonai (propidžio jodidu) nusidažiusios bakterijos.

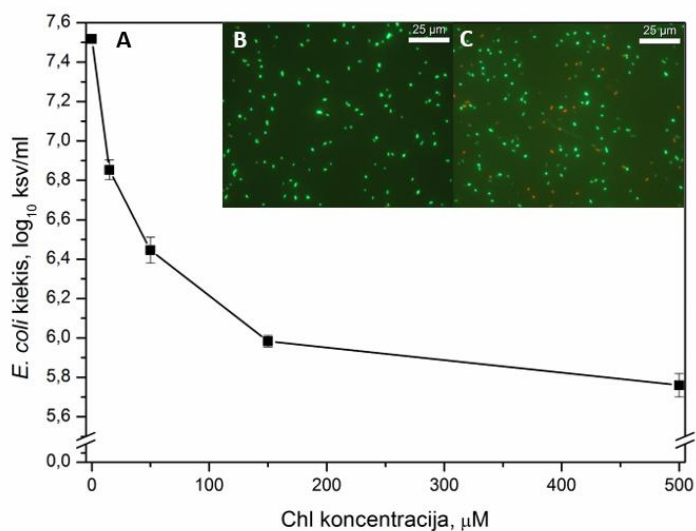


**3.5 pav. A** – antibakterinis tiriamųjų medžiagų poveikis prieš *E. coli* ir ROS įtaka jo veikimo mechanizmui; **B** – bakterijų ataugimas po poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis; *E. coli* fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos: **C** – nepaveiktų (kontrolinių); **D** – paveiktų fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis

Norint įvertinti antibakterinio poveikio efektyvumą buvo nustatinėjamas *E. coli* ataugimas skystoje terpėje po poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis turbidometriiniu metodu. 3.5 B pav. matyti, kad kontrolinės ląstelės jau po 3 val. pereina iš lag fazės į log fazę, o po 8 val. pasiekia stacionarią augimo fazę. Vien ZnO nanodalelės be šviesos pratęsia lag fazę dar 4 val., tačiau tolesnis fazių kitimas išlieka toks pats. *E. coli* augimas itin pakinta paveikus jas fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis (šviesos dozė: 18 J/cm<sup>2</sup>) – ląstelių lag fazė pailgėja iki 19 val., stacionari fazė pasiekama tik po 26 val. Įdomu tai, kad pailgėja log fazė – kontroliniame ir tamsiniame mėginiuose ji tęsdavosi 5 val., o paveiktame fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis (šviesos dozė: 18 J/cm<sup>2</sup>) pailgėjo iki 7 val. Stipresnė šviesos dozė (30 J/cm<sup>2</sup>) sulaukė ląstelių ataugimą mažiausiai 26 val. (vėliau matavimai nebeatlikti), tai gali reikšti, kad po tokio poveikio bakterijos buvo visiškai sunaikintos.

Remiantis jau aprašytais duomenimis, tiek fotosensibilizacijos, tiek fotokatalizės procese antibakteriniam poveikiui itin svarbios reaktyvios deguonies rūšys (ROS). Siekiant įvertinti jų poveikį atliktas tyrimas naudojant ROS gesiklį – L-histidiną. 3.5 A pav. gauti rezultatai rodo, kad iš tiesų ROS įtaka šiems antimikrobiniais metodams yra svarbi ( $p=0,000$ ; statistinė analizė pateikta 3 priede), tačiau tai ne vieninteliai jų veikimo mechanizmai. Vykdamt fotokatalizę, surišus ROS apsaugomi 1,91 – 2,82 log ksv/ml *E. coli*, o fotosensibilizacijos metu  $\sim 0,37$  log ksv/ml. Tačiau vertinant šiuos rezultatus reiktų atkreipti dėmesį, kad fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės sunaikina 7 log ksv/ml, o Chl-photo tik 1,35 log ksv/ml bakterijų.

Kito eksperimento metu buvo nustatinėjama, ar įmanoma pasiekti geresnį Chl-photo antibakterinį poveikį didinant Chl koncentraciją. Rezultatai, pateikti 3.6 A pav. įrodo, kad antimikrobinio poveikio efektyvumas priklauso nuo fotosensibilizatoriaus koncentracijos ( $p=0,000$ ), tačiau iki tam tikros ribos. Iš pradžių, padidinus Chl koncentraciją nuo  $1,5 \times 10^{-5}$  M iki  $5 \times 10^{-5}$  M sunaikinama 0,41 log ksv/ml daugiau bakterijų. Toliau didinant koncentraciją iki  $1,5 \times 10^{-4}$  M antimikrobinio poveikio efektyvumas padidėja dar 0,46 log ksv/ml ir galiausiai  $5 \times 10^{-4}$  M koncentracija leidžia sunaikinti 1,76 log ksv/ml *E. coli* bakterijų. Akivaizdu, kad skirtumas tarp  $1,5 \times 10^{-4}$  M ir  $5 \times 10^{-4}$  M yra vos 0,22 log ksv/ml, todėl dar labiau didinant koncentraciją tikėtina, kad antimikrobinio poveikio pagerinti nepavyktų. Tai matyti ir statistinėje analizėje, pateiktoje 4 priede.

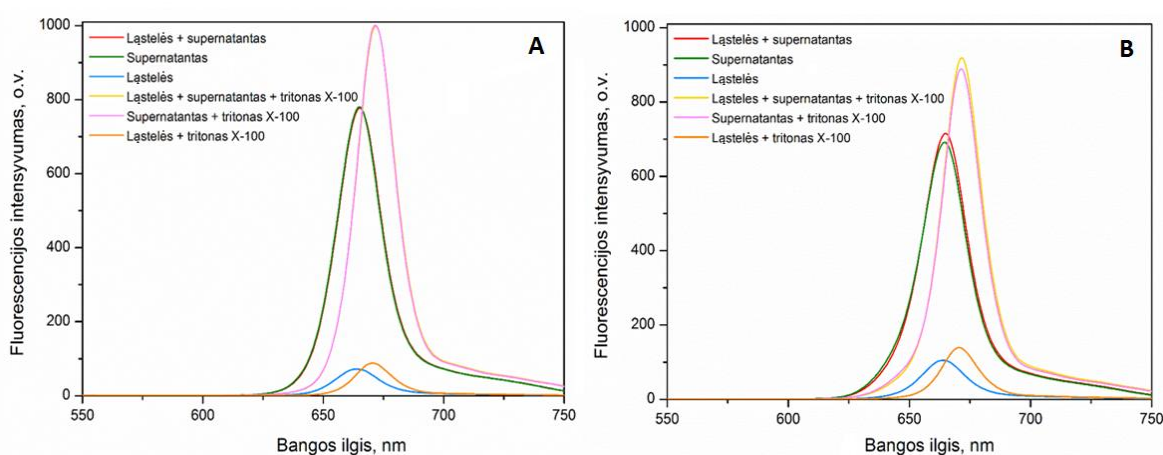


**3.6 pav. A** – Chl-photo antibakterinio poveikio prieš *E. coli* priklausomybė nuo Chl koncentracijos; *E. coli* fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos: **B** – nepaveiktų (kontrolinių); **C** – paveiktų Chl-photo

3.6 B–C pav. matome, kad po poveikio Chl-photo didžioji *E. coli* dalis išgyvena.

Kitas Chl-photo antimikrobinio poveikio pagerinimo būdas – inkubacijos laiko pailginimas siekiant, kad kuo daugiau Chl molekulių sąveikautų su bakterijų paviršiumi. Eksperimento metu tirti 2 inkubacijos laikai – 15 min ir 60 min. Sąveikaujančių molekulių kiekis įvertintas fluorimetriškai ir apskaičiuotas matematiškai, naudojant prieš tai pasidarytą kalibracinę kreivę (5 priedas).

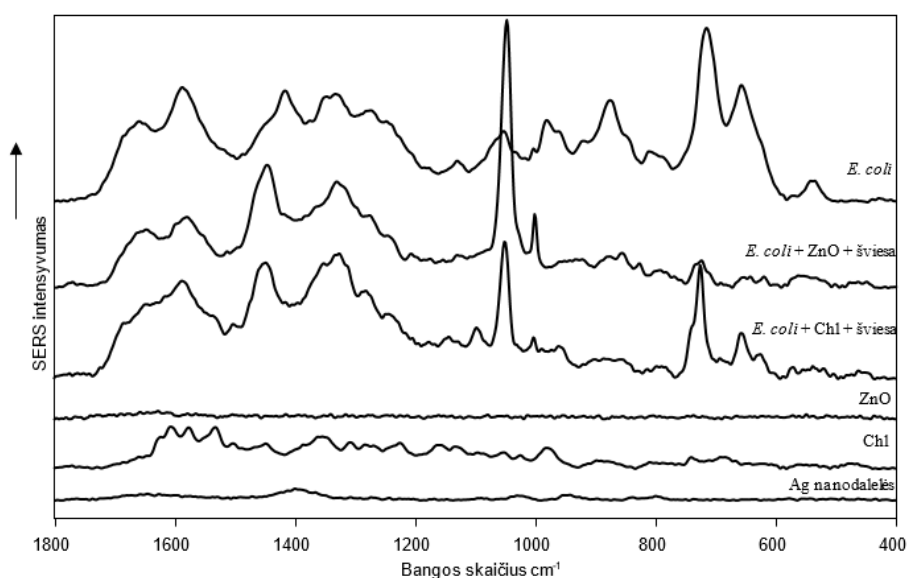
3.7 pav. matome, kad tik nedidelė Chl molekulių dalis sąveikauja su ląstelėmis, o dauguma Chl lieka supernatante. Pagal kalibracinę kreivę apskaičiuota, kad po 15 min tik  $\sim 0,73 \pm 0,03 \mu\text{M}$  ( $\sim 7,1$  proc.) Chl sąveikauja su *E. coli*. Atlikus sėjimus nustatyta, kad tiriamajame mėginyje yra  $10^7$  bakterijų, todėl perskaičiavus gauta, kad viena ląstelė sąveikauja tik su  $\sim 5 \times 10^{-11}$  g Chl. Supernatante likę  $\sim 9,49 \pm 0,45 \mu\text{M}$  ( $\sim 92,9$  proc.) Chl. Ne itin smarkiai rezultatai skiriasi ir po 60 min inkubacijos. Apskaičiuota, kad  $\sim 1,22 \pm 0,06 \mu\text{M}$  ( $\sim 12,7$  proc.) Chl sąveikauja su ląstelėmis (t.y.  $8,3 \times 10^{-11}$  g su viena ląstele) ir  $\sim 8,42 \pm 0,4 \mu\text{M}$  ( $\sim 87,3$  proc.) Chl molekulių likusios supernatante.



**3.7 pav.** *E. coli* ląstelių ir supernatanto fluorescencijos intensyvumo spektrai: **A** – po 15 min inkubacijos su Chl; **B** – po 60 min inkubacijos su Chl

Atsižvelgus į gautus rezultatus eksperimentuose naudota 60 min inkubacija su Chl. Nuspręsta, kad dar labiau ilginti inkubacijos laiką nėra prasmės, nes 45 min ilgesnė inkubacija nedavė didelio skirtumo.

Norint tiksliau nustatyti bakterijoms padaromos žalos pobūdį, pasitelktas SERS metodas, leidžiantis vandeninėje terpėje įvertinti molekulių struktūrą. Eksperimento metu buvo užrašomi nepaveiktų *E. coli* (kontrolės), paveiktų Chl-photo arba paveiktų fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis *E. coli* spektrai. Siekiant įvertinti tiriamųjų medžiagų įtaką spektrams, buvo užrašomi ir Chl bei ZnO nanodalelių spektrai, be to, paviršiaus sustiprinimui naudojamų Ag nanodalelių spektras. Visi rezultatai pateikti 3.8 pav.



**3.8 pav.** *E. coli*, Chl-photo ir fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis paveiktų *E. coli*, ZnO nanodalelių, Chl ir Ag nanodalelių SERS spektrai

Matyti, kad nei Ag, nei ZnO nanodalelės neturi juostų, galinčių turėti įtakos tiriamųjų mėginių spektrams. Chl turi savo spektrą, kadangi tai didelė molekulė, tačiau dėl eksperimentų metu naudojamos itin nedidelės koncentracijos, gaunamas mažas SERS spektro intensyvumas, todėl ląstelių, paveiktų Chl-photo spektras nėra iškreipiamas, nes jį užgožia bakterijų biomolekulės. Bakterijų spektre esantys amido pikai uždengia didžiausius Chl pikus.

Su baltymų molekulių vibravimu susijusios amido juostos matomos ties  $1658\text{ cm}^{-1}$ ,  $1587\text{ cm}^{-1}$ ,  $1282\text{ cm}^{-1}$ ,  $1247\text{ cm}^{-1}$ . Dar keletas baltymų spektrinių juostų, susijusių su jų struktūriniais elementais, matomos ties  $1417\text{ cm}^{-1}$ ,  $1349\text{ cm}^{-1}$ ,  $1030\text{ cm}^{-1}$ ,  $1002\text{ cm}^{-1}$ ,  $960\text{ cm}^{-1}$ . Daugiausiai ląstelių sienelėse esančių angliavandenių ir lipidų spektrinės juostos matomos ties  $1330\text{ cm}^{-1}$ ,  $978\text{ cm}^{-1}$ ,  $921\text{ cm}^{-1}$ ,  $875\text{ cm}^{-1}$  ir  $534\text{ cm}^{-1}$ . Taip pat keletas spektrinių juostų priklauso nukleorūgštims ir aminorūgštims, aptinkamoms bakterijų ląstelėse –  $1176\text{ cm}^{-1}$ ,  $1129\text{ cm}^{-1}$ ,  $808\text{ cm}^{-1}$ ,  $725\text{ cm}^{-1}$ ,  $715\text{ cm}^{-1}$ ,  $656\text{ cm}^{-1}$  (Liu et al., 2017; Walter et al., 2011; Sengupta et al., 2005).

Nors bakterijas paveikus fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis ar Chl-photo pagrindinės vibracinės juostos liko toks pačios, tačiau galime matyti ir žymių skirtumų. Vienas didžiausių pasikeitimų po poveikio – intensyvaus piko atsiradimas ties  $1050\text{ cm}^{-1}$ . Tiesa, akivaizdu, kad po poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis šis pikas intensyvesnis. Tai galėjo nulemti 2 dalykai: visų pirma, po poveikio Chl-photo nemaža dalis bakterijų lieka gyvų (3.5 A, 3.6 C pav.), taigi, paveiktų ląstelių kiekis mėginyje mažesnis, be to, galima įtarti, kad fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių bakterijoms padaromos pažeidos yra didesnės. Literatūros duomenimis, ši vibracinė juosta gali būti priskiriama  $\text{CH}_2\text{OH}$  esančios

C-O jungties deformacijos tipui – išsitempimui (angl. *stretching*) ląstelės sienelės lipiduose (Jia et al., 2015). Toks juostos atsiradimas nesunkiai paaiškinamas – nepaveiktose bakterijose membranos yra glaudžiai „supakuotos“, tačiau po poveikio, jas pažeidus ir dezintegravus, sienelės lipidų fragmentai yra lengviau pasiekiami signalą stiprinančioms Ag nanodalelėms. Dar vienas lipidams priskiriamas pikas, atsiradęs po poveikio, yra ties  $1448\text{ cm}^{-1}$  (Jia et al., 2015). Taip pat po poveikio tiek su viena, tiek su kita tiriamąja medžiaga išnyko 2 su angliavandeniais susiję pikai – ties  $875\text{ cm}^{-1}$  ir  $534\text{ cm}^{-1}$  (Ivleva et al., 2009). Tai rodo, kad gali būti pažeisti ir išorinėje *E. coli* sienelių pusėje esantys lipopolisacharidai (1.2 pav.).

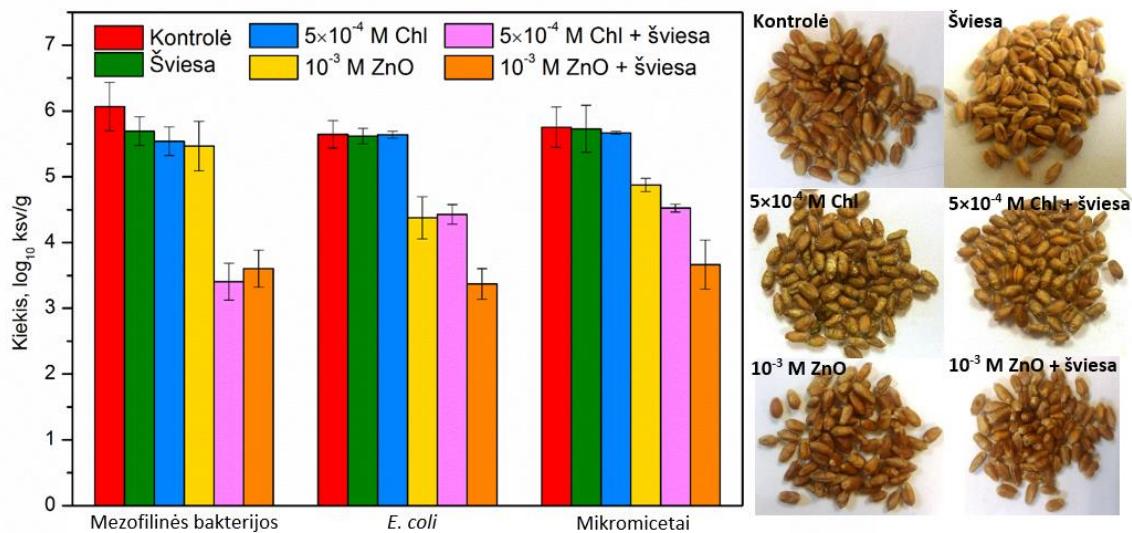
Nepaisant to, kad kai kurie ląstelėse įvykę pokyčiai tiek po fotosensibilizacijos, tiek po fotokatalizės yra vienodi, netrūksta ir skirtumų tarp jų. Vienas ryškiausių – po poveikio fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis išnykę pikai ties  $715\text{ cm}^{-1}$  ir  $656\text{ cm}^{-1}$ , kurie po fotosensibilizacijos tik sumažėjo. Pirmasis priskiriamas membranos lipidų C-N ryšiui, antrasis – aminorūgštims ( $\text{COO}^-$ ) (Liu et al., 2017; Walter et al., 2011; Sengupta et al., 2005). Įdomu tai, kad po fotokatalizės nebeliko ir ties  $1129\text{ cm}^{-1}$  buvusio piko, siejamo su nukleorūgštimis (Liu et al., 2017). Taip pat išnyko pikai, esantys ties  $978\text{ cm}^{-1}$  (lipidai) ir  $960\text{ cm}^{-1}$  (baltymai), o itin išaugo ties  $1002\text{ cm}^{-1}$  esantis pikas, priklausantis fenilalaninui (Walter et al., 2011; Liu et al., 2009).

Po fotosensibilizacijos bakterijų SERS spektre sumažėjo su baltymų vibracijomis susijusi juosta ties  $657\text{ cm}^{-1}$ , be to, į raudonos spalvos pusę (link  $1647\text{ cm}^{-1}$ ) pasislinko amidui priskiriama juosta, buvusi ties  $1658\text{ cm}^{-1}$  (Walter et al., 2011). Tai rodo, kad ląstelėse vykstantys pokyčiai yra susiję su baltymų struktūros pasikeitimais. Nepaisant prieš tai minėtų pikų, susijusių su lipidais, po Chl-photo atsirado dar vienas, ties  $1098\text{ cm}^{-1}$  esantis pikas, rodantis O-P-O jungties deformaciją (Ivleva et al., 2009).

Šie pokyčiai leidžia suprasti, kad fotokatalizės ir fotosensibilizacijos sukeltos bakterijų pažaidos yra panašios, tačiau tikrai ne tokios pat, nes pažeidžiamos skirtingos ląstelių biomolekulės.

#### 3.4. Chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių taikymas daigintų grūdų mikrobiologinei saugai

Norint įvertinti metodų efektyvumą *in vivo* buvo eksperimentuojama su grūdais. Po poveikio grūdai įvertinti vizualiai (3.9 pav. dešinėje). Kaip matome, ZnO nanodalelės neturi jokio poveikio grūdų spalvai ar struktūrai, o Chl suteikia tik nežymų, vos pastebimą žalsvą atspalvį. Tiesa, dėl to negalima naudoti itin didelių Chl koncentracijų.



**3.9 pav.** Antimikrobinis Chl-photo ir fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių poveikis prieš natūraliai daigintuose grūduose esančias mezofilines bakterijas ir mikromicetus bei inokuliuotą *E. coli*; dešinėje – vizualinis grūdų įvertinimas po apdorojimo

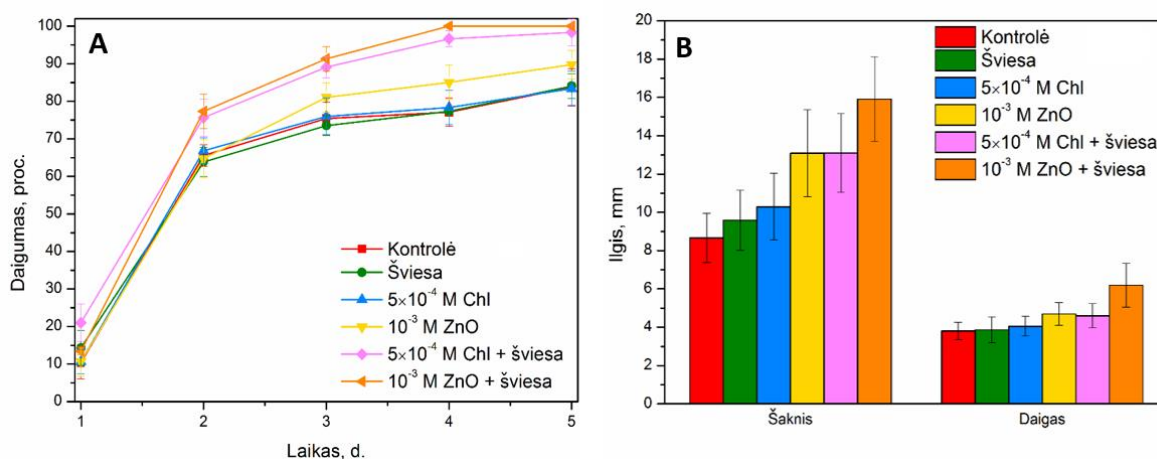
Tiek Chl-photo, tiek veikimas fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis reikšmingai sumažina natūraliai grūduose esančių mezofilinių bakterijų kiekį 2,47–2,66 log ksv/g ( $p=0,000$ ). Nei ZnO nanodalelės, nei Chl be šviesos nepasižymi tokiu dideliu antimikrobinu efektu. Mezofilų kiekis apdorojus grūdus Chl-photo arba fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis skiriasi nereikšmingai ( $p=1,000$ ).

*E. coli* buvo inokuliuota ant kviečių ir kontroliniame mėginyje jų kiekis siekė 5,65 log ksv/g. Nei vienas Chl, nei vien šviesa neturėjo jokio poveikio *E. coli* ( $p=1,000$ ). Nešvitintos ZnO nanodalelės sunaikino 1,27 log ksv/g bakterijų. Jų antibakterinis poveikis prieš *E. coli* statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinio, šviesos ir Chl ( $p=0,000$ ). Kaip ir *in vitro* mėginiuose, fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės sunaikino daug daugiau bakterijų (2,28 log ksv/g) nei Chl-photo (1,22 log ksv/g).

Taip pat fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės pasižymėjo ir geresniu antigrybeliniu poveikiu – mikromicetų kiekį sumažino 2,09 log ksv/g ( $p=0,000$ ), kai Chl-photo poveikis – tik 1,23 log ksv/g ( $p=0,001$ ). Tarpusavyje lyginant šiuos 2 poveikius statistiškai reikšmingo skirtumo nėra ( $p=1,000$ ). Nefotoaktyvuotos ZnO nanodalelės mikromicetų kiekį sumažino 0,88 log ksv/g ( $p=0,000$ ), o Chl (tamsinė kontrolė) ir tik šviesa neturėjo jokio poveikio mikroskopinių grybų skaičiui ( $p=1,000$ ). Bendra statistinė analizė pateikta 6 priede.

Toliau, siekiant išsiaiškinti antimikrobinų metodų įtaką grūdų daigumui, 5 dienas po apdorojimo buvo registruoti sudygę grūdai (3.10 A pav.). Kontrolinių grūdų daigumas po 5 dienų buvo 83,8 proc. Panaši situacija buvo ir su šviesine bei Chl tamsine kontrolėmis ( $p=1,000$  lyginant su kontrole). Jų daigumas buvo 84 proc. ir 83,4 proc. Šiek tiek geriau dygo

vien ZnO nanodalelėmis apdoroti grūdai – po 5 d. buvo sudygę 89,7 proc. ( $p=0,589$  lyginant su kontrole). Pirmąją dieną ypač dideliu daigumu pasižymėjo Chl-photo apdoroti grūdai ir siekė 21 proc., kai kitose grupėse daigumas svyravo nuo 10,4 proc. iki 14,3 proc. Tačiau jau antrąją dieną fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis apdoroti grūdai pasirodė esantys daigesni ir jau ketvirtąją dieną jų daigumas pasiekė 100 proc. ( $p=0,000$  lyginant su kontrole), o Chl-photo apdorotų grūdų daigumas po 5 dienų buvo 98,3 proc. ( $p=0,001$  lyginant su kontrole). Tarpusavyje lyginant fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių ir Chl-photo poveikį daigumui reikšmingo skirtumo nėra ( $p=1,000$ ). Statistinė analizė pateikta 7 priede.



**3.10 pav. A** – sudygusių grūdų kiekis; **B** – šaknies ir daigo ilgiai po apdoravimo

Kontrolinėje (nepaveiktoje) grupėje grūdų šaknies ir daigo ilgiai buvo 8,7 cm ir 3,8 cm (3.10 B pav.). Tik šviesa (405 nm) nežymiai pailgino šaknies ilgį (9,6 cm) ( $p=1,000$ ), o daigo ilgis liko beveik toks pat (3,9 cm) ( $p=1,000$ ). Dar ilgesnės buvo Chl tamsinės kontrolės grūdų šaknys ir daigai (10,3 cm ir 4,1 cm) ( $p=0,638$  ir  $p=1,000$ ). Tamsinės ZnO nanodalelių ir Chl-photo apdorotų grūdų šaknų ilgiai buvo vienodi (13,1 cm) ( $p=0,000$  lyginant su kontrole), o daigų skyrėsi vos 0,1 cm, tačiau lyginant su kontrole ZnO apdorotų daigų ilgių skirtumas statistiškai reikšmingas ( $p=0,005$ ), o Chl-photo – ne ( $p=0,078$ ). Ilgiausios šaknys ir daigai buvo sudygusių grūdų, paveiktų fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis (15,9 cm ir 6,2 cm), kurie nuo kontrolinių grūdų skyrėsi reikšmingai ( $p=0,000$ ). Bendra statistinė analizė pateikta 8 priede.

Šie rezultatai rodo, kad tyrime naudoti antimikrobiniai metodai ne tik nekenkia, bet net skatina grūdų daigumą. Be to, fotosensibilizacijos ir fotokatalizės poveikis skatina grūdų šaknų ir daigų augimą.



#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Grūdai yra labai svarbus angliavandenių ir skaidulų šaltinis mūsų mityboje (Singh et al., 2015), o daiginti grūdai turi dar daugiau bioaktyvių žmogui naudingų medžiagų (Gan et al., 2017). Visgi mikrobiologinė jų kontrolė yra ypač svarbi, nes didelė dalis kviečių yra užkrėsta mikroskopiniais grybais (Figueroa et al., 2018) ir bakterijomis (Huang et al., 2016), o grūdų daiginimo sąlygos yra ypač palankios mikroorganizmų dauginimuisi (Kince et al., 2017).

Svarbu rasti metodus, efektyviai mažinančius mikroorganizmų kiekius grūduose, bet nekeičiančius grūdų fiziologinių savybių. Tiesa, dar viena didelė problema – rasti antibakterinį metodą, kuriam, priešingai nei antibiotikams, bakterijos negalėtų įgauti atsparumo. Šias savybes tenkinantys metodai – Chl-photo ir fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės. Kol kas nėra duomenų dėl mikroorganizmų atsparumo Chl-photo. Kadangi dauguma ligų sukėlėjų turi daugiau nei vieną hemo įsisavinimo kelią, atsparumo įgijimas porfirinams (tokiems kaip Chl) yra mažai tikėtinas (Krüger et al., 2019). Zhang ir kiti (2018) atliko tyrimą, kurio metu nustatinėjo, ar *E. coli* įgyja atsparumą nanodalelėms. Gauti rezultatai rodo, kad, nors kiekvieną dieną turėdama kontaktą su nanodalelėmis, *E. coli* įgauna atsparumą dėl pasikeitusios bakterijos formos ir membraninių baltymų ekspresijos, tačiau atsparumas neilgalaikis ir po kelių dienų išnyksta. Taigi, kol kas turimais duomenimis, mikroorganizmai neturi ir mažai tikėtina, kad gali įgauti atsparumą tyrime naudotoms medžiagoms.

Norint gauti geriausią rezultatą, labai svarbu įsivertinti savo naudojamų medžiagų fiziko-chemines savybes. Dirbant su nanodalelėmis, viena svarbiausių savybių, galinčių turėti įtakos antimikrobiniam poveikiui, yra dalelių dydis, kadangi įrodyta, kad kuo mažesnės dalelės, tuo didesnis antimikrobinis efektyvumas (Sirelkhatim et al., 2015). Eksperimentų metu nustatyta, kad turimų dalelių dydis tiesiogiai priklauso ir nuo jų koncentracijos (3.2 B pav.) bei nuo laikymo laiko (3.2 C pav.). Gauti rezultatai parodė, kad dalelės vandeninėje suspensijoje itin linkusios agreguotis, todėl buvo svarbu atrasti būdą, kaip išardyti susidariusius agregatus nepakeičiant ZnO nanodalelių savybių. Vienas dažniausiai naudojamų būdų – ultragarsas (Sun et al., 2008). Visgi 3.3 pav. pavaizduoti rezultatai rodo, kad ilgesnis nei 5 min ultragarsinimas nebeturi esminio skirtumo – rezultatai, gauti po 5 min, 10 min ir 15 min ultragarsinimo, yra labai panašūs. Be to, taikant šviesines technologijas, svarbu žinoti, kokią šviesą geriausiai absorbuoja tiriamoji medžiaga. Nustatyta, kad ZnO nanodalelės geriausiai sugeria 375 nm šviesą. Tokius pat rezultatus gavo ir anksčiau tyrimus atlikę mokslininkai (Kairyte et al., 2013).

Kita tiriamoji medžiaga – Chl, taip pat linkusi agreguotis naudojant didesnes koncentracijas (3.1 B pav.). Tai matyti ir fluorescencijos intensyvumo spektruose, nes įdėjus detergento tritono X-100 pikas šiek tiek pasislenka į raudoną spektro pusę bei padidėja fluorescencijos intensyvumo maksimumas – agreguotos Chl molekulės tampa monomerinėmis (Garab, 1998). Kaip ir ankstesniuose tyrimuose, 3.1 A pav. pateikti rezultatai rodo, kad nepriklausomai nuo koncentracijos Chl šviesos absorbcijos pikas yra ties 405 nm (Paskeviciute et al., 2019), o fluorescencija intensyviausia ties 660 nm (Buchovec et al., 2017).

Vienas didžiausių pavojų, susijusių su grūdais, yra jų užkrėstumas mikroskopiniais grybais, ypač *Fusarium* spp. (Tralamazza et al., 2016). Todėl itin svarbu, kad antimikrobiniai metodai, naudojami grūdų kokybės gerinimui, pasižymėtų ir antigrybeliniu veikimu. Nors nėra daug informacijos apie Chl-photo antigrybelinį mechanizmą, tačiau nustatyta, kad fotosensibilizacija – efektyvus metodas mikromicetų naikinimui (Luksiene ir Brovko, 2013). Tai matyti ir 3.4 A pav. Naudojant  $5 \times 10^{-4}$  M Chl koncentraciją ir apšvitinus *F. oxysporum* augimas pristabdomas 32,4 proc., o  $5 \times 10^{-3}$  M Chl koncentracija su šviesa – net 50 proc. Naudojant kitokius fotosensibilizatorius galima gauti daug didesnę efektyvumą – naudojant  $5,1 \times 10^{-3}$  M hematoporfirino dimetilo eterį (HPde) buvo pilnai sustabdyta *Alternaria alternata* sporuliacija, o naudojant didesnę koncentraciją ( $7,1 \times 10^{-3}$  M) ir *Rhizopus oryzae* bei *Fusarium avenaceum* sporuliacija (Lukšiene et al., 2005).

Nors mokslininkai abejojo dėl ZnO nanodalelių antigrybelinio poveikio (Sawai ir Yoshikawa, 2004), tačiau 3.4 B pav. rodo, kad abejoti nėra ko –  $10^{-3}$  M ir  $5 \times 10^{-3}$  M fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės sustabdo *F. oxysporum* augimą 36 proc. ir 52,2 proc. He ir kiti (2011) nustatė, kad  $70 \pm 15$  nm dydžio ZnO nanodalelės (koncentracija:  $1,2 \times 10^{-2}$  M) sustabdo *Botrytis cinerea* augimą 80 proc., o *Penicillium expansum* 91 proc. Nors seniau gauti rezultatai geresni, tačiau reikia atsižvelgti, kad tirti skirtingi mikroorganizmai gali būti skirtingai jautrūs, be to, senesniame tyrime naudotos mažesnio dydžio nanodalelės ir didesnė jų koncentracija, dėl to gerėja antimikrobinis nanodalelių poveikis (Sirelkhatim et al., 2015).

Vertinant antibakterinį tiriamųjų metodų efektyvumą nustatyta, kad *E. coli* galima visiškai nužudyti fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis ( $10^{-3}$  M,  $30 \text{ J/cm}^2$ ), o tokia pat šviesos dozė naudojant  $1,5 \times 10^{-5}$  M Chl-photo sunaikina tik 1,35 log ksv/ml bakterijų (3.5 A pav.). Anksčiau atlikto tyrimo metu, prieš patogeninę *E. coli* O157:H7 naudojant fotoaktyvuotas ZnO nanodaleles, bakterijos buvo visiškai sunaikintos tik po 60 min inkubacijos, o sąlygos kaip atliekant šį tyrimą leido sunaikinti tik šiek tiek daugiau nei 4 log ksv/ml (Kairyte ir Luksiene, 2012). Visgi pastebėta, kad gramteigiamos bakterijos yra jautresnės ZnO nanodalelių poveikiui nei gramneigiamos bakterijos – buvo nustatyta, kad minimali

inhibitorinė koncentracija gramteigiamoms bakterijoms (*Staphylococcus aureus* ir *Bacillus subtilis*) yra ~64 µg/ml, o gramneigiamoms bakterijoms (*E. coli* ir *Klebsiella aerogenes*) – ~256 µg/ml (Kumar et al., 2017). Nors tikslus ZnO nanodalelių veikimo mechanizmas nėra aiškus, yra numanomi keli veikimo mechanizmai, padedantys sunaikinti mikroorganizmus: ROS produkavimas ir Zn<sup>2+</sup> jonai (1.5 pav.). Eksperimentų metu tirtas ROS poveikis, panaudojant L-histidiną, surišantį singletinį deguonį ir hidroksilo radikalą (Yu et al., 2003). 3.5 A pav. patvirtina ROS dalyvavimą antimikrobiniame procese, kadangi L-histidinui juos surišus išsaugoti 1,91 – 2,82 log ksv/ml *E. coli* (3.5 A pav.). Singletinis deguonis gali susidaryti netiesiogiai iš vandeninių reakcijų ir sukelti membranos oksidaciją ir degradaciją, o hidroksilo radikalas yra reaktyviausias deguonies darinys (ROS), nes geba greitai reaguoti su organinėmis biomolekulėmis, įskaitant nukleorūgštis, lipidus, angliavandenius, baltymus, DNR ir aminorūgštis (Qi et al., 2017). Dėl tokių pažeidimų *E. coli* buvo visiškai sunaikinta ir nebeataugo ilgiau nei parą. Mažesnė šviesos dozė (18 J/cm<sup>2</sup>) nesunaikino visų bakterijų (liko 1,55 log ksv/ml), o sukeltos pažeidimos bakterijų ataugimą pristabdė 18 val. (3.5 A–B pav.)

Nedidelis Chl-photo antimikrobinis poveikis nestebina, nes *E. coli* yra gramneigiama bakterija, kurios paviršių supa tanki išorinė membrana, nepraleidžianti antimikrobinių medžiagų (Silhavy et al., 2010). Nors šio darbo metu pavyko sunaikinti vos 1,35 log ksv/ml *E. coli*, tačiau prieš gramteigiamą bakteriją *Listeria monocytogenes* Chl-photo poveikis yra itin efektyvus ir sunaikina net 7 log ksv/ml bakterijų (Luksiene et al., 2010). Kaip jau minėta anksčiau, fotosensibilizacijos antimikrobinis poveikis pagrįstas susidariusiomis ROS (Baptista et al., 2017). 3.5 A pav. matyti, kad panaudojus L-histidiną dalis bakterijų apsaugoma nuo žūties. Kadangi L-histinas suriša tiek singletinį deguonį, tiek hidroksilo radikalą, galima įtarti, kad paveikus Chl-photo bakterijose vyksta abiejų tipų reakcijos (1.1 pav.). Jau anksčiau patvirtintas faktas dėl 2 tipo reakcijų panaudojant singletinį deguonį, surišantį natrio azidą (Buchovec et al., 2017), tačiau pirmo tipo reakcijos dar nebuvo nustatytos.

Siekiant padidinti antibakterinį Chl-photo veikimą, buvo bandoma padidinti Chl koncentraciją. 3.6 pav. pateikti rezultatai rodo, kad antibakterinis Chl-photo priklauso nuo Chl koncentracijos ir naudojant 5×10<sup>-4</sup> M Chl galima pasiekti 1,76 log ksv/ml bakterijų dezaktyvaciją. Ankstesnių tyrimų metu buvo įrodyta, kad antibakterinis Chl-photo poveikis priklauso nuo šviesos dozės ir inkubacijos laiko (Buchovec et al., 2017), tačiau tik dabar nustatyta, kad įtakos turi ir Chl koncentracija.

Yra žinomi 3 pagrindiniai ląstelių ir fotosensibilizatorių sąveikos būdai: fotosensibilizatorius gali nesąveikauti su bakterijomis, sąveikauti su bakterijų ekstraląstelinėmis struktūromis arba patekti į bakterijų vidų ir po fotosensibilizacijos sukelti negrįžtamas pažeidas (Brovko, 2010). 3.7 pav. rezultatai rodo, kad vos 7,1–12,7 proc.

(priklausomai nuo inkubacijos laiko) viso Chl sąveikauja su ląstelėmis, o likęs lieka supernatante. Tai pagrindžia literatūros duomenys, nes anijoniniai fotosensibilizatoriai dažniausiai su bakterijomis sąveikauja elektrostatinėmis jėgomis, susidariusiomis tarp jų ir bakterijų ląstelių sienelių divalentinių katijonų ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), o ne patenka į ląstelių vidų (Alves et al., 2014). Dėl to pagerinti antimikrobinio Chl-photo veikimo ilginant inkubacijos laiką neįmanoma, nes Chl molekulėms nereikia daugiau laiko patekti į ląstelių vidų, kadangi sąveika vyksta iš išorės. Mažas sąveikaujantis su bakterijomis Chl molekulių kiekis paaiškina ir nedidelį antibakterinį Chl-photo poveikį (3.5 A pav.), kadangi įrodyta, jog norint sutrikdyti bakterijų membranos funkciją, būtinas sąlytis tarp fotosensibilizatoriaus ir bakterijos (Bacellar et al., 2018).

Tiriamųjų metodų padarytos pažaidos buvo nustatinėjamos SERS metodu (3.8 pav.). Nenuostabu, kad *E. coli* SERS spektro vibracinės juostos daugeliu atžvilgių sutampa su biologinių audinių ir ląstelių (Talari et al., 2015). Gauti spektrai rodo, kad nors kai kurie *E. coli* pažeidimai yra panašūs, tačiau tarp fotokatalizės ir fotosensibilizacijos yra nemažai skirtumų. Lyginant kontrolinių *E. coli* ir bakterijų po Chl-photo spektrus matyti, kad pagrindiniai skirtumai yra susiję su ląstelių sienelėse esančiomis biomolekulėmis – lipidais (pikai ties  $1448\text{ cm}^{-1}$ ,  $1098\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$ ) ir lipopolisacharidais (pikai ties  $875\text{ cm}^{-1}$  ir  $534\text{ cm}^{-1}$ ). Tai patvirtina teoriją, kad Chl su bakterijomis sąveikauja tik iš išorės ir nepatenka į ląstelių vidų. Tokios pat išvados buvo padarytos ir anksčiau nustačius ląstelių membranų pažaidas ir morfologijos pasikeitimus, kai po membranų dezintegracijos ir padidėjusio pralaidumo į išorę patenka viduląsteliniai ląstelių komponentai (Buchovec et al., 2017). Dar vienas įdomus pasikeitimas po Chl-photo – amido piko pasislinkimas nuo  $1658\text{ cm}^{-1}$  iki  $1647\text{ cm}^{-1}$ . Tai gali rodyti, kad pavykus pažeisti išorinę membraną Chl-photo paveikia amidines jungtis, esančias lipoproteinuose, prisijungusiuose prie peptidoglikano sluoksnio (Hantke ir Braun, 1973).

Daug įvairesni pokyčiai ląstelėse įvyko po bakterijų apdorojimo fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis. Po poveikio atsiranda tie patys (tačiau didesnio intensyvumo) pikai, susiję su ląstelės sienelės lipidais ( $1448\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$ ) ir lipopolisacharidais ( $875\text{ cm}^{-1}$  ir  $534\text{ cm}^{-1}$ ), kurie galimai susiję su ZnO nanodalelių sąveika su lipidais (Anitha et al., 2018) ir susidariusiu elektrostatinu ryšiu tarp bakterijų ir ZnO nanodalelių (Stoimenov et al., 2002). Be to, išnyksta 5 vibracinės juostos, priskiriamos lipidų C-N ryšiui ( $715\text{ cm}^{-1}$ ), lipidams ( $978\text{ cm}^{-1}$ ), baltymams ( $960\text{ cm}^{-1}$ ), aminorūgščių  $\text{COO}^-$  grupei ( $656\text{ cm}^{-1}$ ) ir nukleorūgštims ( $1129\text{ cm}^{-1}$ ), o suintensyvėja pikas, priskiriamas fenilalaninui ( $1002\text{ cm}^{-1}$ ) (Liu et al., 2017; Walter et al., 2011; Sengupta et al., 2005). Tai gali būti susiję su likusiais ZnO nanodalelių antimikrobinio veikimo mechanizmais: ląstelių internalizacija,  $\text{Zn}^{2+}$  jonų išlaisvinimu ir ROS produkavimu

(Sirelkhatim et al., 2015). Akivaizdu, kad pagrindinis skirtumas tarp Chl-photo ir ZnO nanodalelių indukuotos fotokatalizės antimikrobinio veikimo mechanizmų yra sąveikos su bakterija vieta: Chl bakterijas veikia tik išoriškai, pažeisdamas ląstelės membranos vientisumą, o ZnO bakterijas pažeidžia ne tik išoriškai, bet ir iš vidaus, todėl jo sukeltos pažeidimos didesnės ir antimikrobinis veikimas efektyvesnis.

Maisto pramonėje ir žemdirbystėje naudojami metodai turi būti itin gerai ištirti, nes svarbu ne tik sunaikinti žalą keliančius mikroorganizmus, bet ir nepažeisti pačių produktų, išsaugoti jų savybes. Įprastai maisto pramonėje naudojamas terminis apdorojimas netinka grūdų mikrobiologinei saugai užtikrinti, nes pakenkia grūdo dygimo procesams. Nepaisant to, bandoma ieškoti terminio apdorojimo alternatyvų. Vienas jų – pasterizavimas superkarštais garais (angl. *superheated steam pasteurization*), kurio metu garams kondensuojantis maisto paviršiuje daug šilumos perduodama maistui ir dėl to labai greitai pakyla paviršiaus temperatūra. Atlikto tyrimo metu buvo parodyta, kad 80 s kviečius veikiant 110 °C temperatūros garais bendrą bakterijų skaičių galima sumažinti ~3 log, pelėsinų grybų ~ 2 log ir *Bacillus* spp. ~0,3 log (Hu et al., 2016). Akivaizdu, kad metodas nėra labai efektyvus prieš sporinius mikroorganizmus. Be to, nebuvo tirta, kokią įtaką terminis apdorojimas turi grūdų technologinėms, fiziologinėms ir mitybinėms savybėms.

Inovatyvūs neterminio apdorojimo metodai – chlorofilino indukuota fotosensibilizacija ir fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės – panaudoti šiame darbe, žymiai efektyvesni: Chl-photo poveikis nuo grūdų paviršiaus sunaikino 2,66 log ksv/g mezofilinių bakterijų, 1,22 log ksv/g *E. coli* ir 1,23 log ksv/g mikromicetų, o fotoaktyvuotų ZnO nanodalelių poveikis buvo dar geresnis ir visų mikroorganizmų sumažino daugiau nei 2 log ksv/g (3.9 pav.). Apdorojimas neturėjo vizualiai matomo poveikio grūdų išvaizdai. Dar vienas neterminis apdorojimo metodas – šalta plazma, kuria 3 min ir 5 min apdorojus sėjamuosius avinžirnius, natūrali grūdų mikrobiota buvo sumažinta atitinkamai 1 log ksv/g ir 2 log ksv/g (Mitra et al., 2014). Gauti rezultatai ne tokie geri kaip šiame tyrime, be to, nebuvo įvertintas mikromicetų jautrumas šaltai plazmai, nors jie yra pagrindinis grūdų rizikos šaltinis.

Daug susidomėjimo kelia natūralūs grūdų apdorojimo metodai, kaip, pvz., eteriniai aliejai. Tiesioginis kviečių veikimas čiobrelių eteriniu aliejumi gali net iki 85 proc. sumažinti grūdų užterštumą mikroskopiniais grybais, tačiau tokia koncentracija stabdo grūdų dygimą. Vien 0,05 proc. eterinio aliejaus koncentracija sumažina daigumo lygį ~50 proc. (Anžlovar et al., 2017). Maža to, paveikus kviečius rozmarino ir raudonėlio eteriniais aliejais reikšmingai sutrumpėjo šaknies ir daigo ilgiai – kuo didesnė eterinio aliejaus koncentracija naudota, tuo stipresnis poveikis (Atak et al., 2016).

Tuo tarpu šalta plazma apdoroti sėjami avinžirniai net 89,2 proc. geriau ir 2,7 d. greičiau sudygo nei kontroliniai (Mitra et al., 2014). Lyginant su kontroliniais grūdais, Chl-photo apdorotų grūdų daigumas padidėjo 14,5 proc., o fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis – 16,2 proc. (3.10 A pav.). Be to, fotoaktyvuotomis ZnO nanodalelėmis apdoroti grūdai 100 proc. daigumą pasiekė jau 4 dieną, o likusių grupių grūdai daiginti 5 dienas. 5,9 proc. geresnis daigumas pastebėtas vien ZnO nanodalelėmis apdorojus grūdus. Geresnis grūdų daigumas gali būti susijęs su sumažėjusiu mikroorganizmų kiekiu po apdoravimo (Khanzada et al., 2002), kadangi visi 3 metodai, pagerinę grūdų daigumą, reikšmingai sumažino mikroorganizmų kiekį ant grūdų paviršiaus (3.9 pav.).

Panašūs rezultatai gauti ir lyginant sudygusių grūdų šaknų bei daigų ilgius. Vien šviesa apdorotų kviečių daigai ir šaknys buvo 0,3 mm ir 1,6 mm ilgesni lyginant su kontroline grupe. Šviesa padeda stimuliuoti fenolių produkciją, o pastarieji yra ypač svarbūs augalams (Xiang et al., 2017). Chl (be šviesos) apdorotų grūdų daigai ir šaknys taip pat buvo ilgesni nei kontroliniai (0,1 mm ir 0,9 mm). Toks efektas galėjo būti gautas dėl chlorofilo reikšmės grūdų brendimui (Rosidah ir Hilhorst, 2017), kadangi Chl yra chlorofilo darinys (Nagini et al., 2015). Kad ZnO nanodalelėmis (be ir su šviesa) apdorotų grūdų šaknys ir daigai buvo ilgiausi (15,9 mm ir 6,2 mm) nestebina, kadangi cinkas yra būtinas mikroelementas tiek žmonėms, tiek ir augalams. Anksčiau atlikto tyrimo metu taip pat pagerėjo ZnO junginiais (tarp jų ir nanodalelėmis) apdorotų žemės riešutų daigumas (iki 13,7 proc.), šaknies (6,79 cm) ir daigo (iki 5,6 cm) ilgiai (Prasad et al., 2012).

## 5. IŠVADOS

1. Tiek chlorofilinu indukuota fotosensibilizacija, tiek ZnO nanodalelių indukuota fotokatalizė pasižymi antimikrobinio poveikiu, nors prieš *Escherichia coli* efektyviau veikia fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės:
  - a)  $10^{-3}$  M fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės sunaikino 7 log ksv/ml *E. coli*, o  $1,5 \times 10^{-5}$  M Chl-photo – 1,35 log ksv/ml. Nedidelio Chl-photo antibakterinio veikimo prieš *E. coli* priežastis ta, kad Chl sąveika su ląstele neintensyvi ( $8,3 \times 10^{-11}$  g Chl/ląstelėje);
  - b) fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės *Fusarium oxysporum* augimą pristabdė 36 proc. ( $10^{-3}$  M) ir 52,2 proc. ( $5 \times 10^{-3}$  M), o po fotosensibilizacijos pasiekta 32,4 proc. ( $5 \times 10^{-4}$  M) ir 50 proc. ( $5 \times 10^{-3}$  M) inhibicija.
2. Fotosensibilizacijos ir fotokatalizės veikimo mechanizmai ir ląstelėms padaromos pažeidimos turi panašumų ir skirtumų:
  - a) abiejų poveikių atveju dalyvauja reaktyvios deguonies rūšys (ROS): naudojant ROS gesiklį L-histidiną antimikrobinis fotosensibilizacijos efektyvumas sumažėjo ~0,37 log ksv/ml, o fotokatalizės – 1,91–2,82 log ksv/ml;
  - b) po fotosensibilizacijos *E. coli* SERS spektre pakito su ląstelės sienelės lipidais ir lipopolisacharidais siejamos juostos, todėl galima daryti prielaidą, kad Chl su bakterijomis sąveikauja tik išoriškai, pažeisdamas membranų vientisumą. Po fotokatalizės SERS spektre pakito lipidų, lipopolisacharidų, baltymų, aminorūgščių ir nukleorūgščių juostos, todėl galimai jos bakterijas veikia ne tik išoriškai, bet ir pažeisdamas viduląstelines struktūras.
3. Abu metodai veiksmingai sumažino kviečiuose esančių mikroorganizmų kiekius bei pagerino jų daigumą bei augimą:
  - a) Fotosensibilizacijos poveikis sunaikino 2,66 log ksv/g mezofilinių bakterijų, 1,22 log ksv/g *E. coli* ir 1,23 log ksv/g mikroskopinių grybų, o fotokatalizės poveikis – 2,47 log ksv/g mezofilinių bakterijų, 2,28 log ksv/g *E. coli* ir 2,09 log ksv/g mikromicetų;
  - b) Po fotosensibilizacijos grūdų daigumas pagerėjo 14,5 proc., šaknų ir daigų augimas – 51 proc. ir 20,7 proc., o fotokatalizė dygimą pagerino 16,2 proc. o šaknų ir daigų ilgį – 83,5 proc. ir 62,5 proc.

## 6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. 2007 m. gruodžio 5 d. Komisijos Reglamentas (EB) Nr. 1441/2007, iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 2073/2005 dėl maisto produktų mikrobiologinių kriterijų.
2. Al-Hatmi, A. M., Meis, J. F., de Hoog, G. S. (2016). *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. PLoS pathogens, 12(4), e1005464..
3. Al-Hatmi, A. M., van Diepeningen, A. D., Curfs-Breuker, I., de Hoog, G. S., Meis, J. F. (2014). Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 70(4), 1068-1071
4. Alves, E., Faustino, M. A., Neves, M. G., Cunha, A., Tome, J., Almeida, A. (2014). An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. Future medicinal chemistry, 6(2), 141-164.
5. Anitha, R., Ramesh, K. V., Ravishankar, T. N., Kumar, K. S., Ramakrishnappa, T. (2018). Cytotoxicity, antibacterial and antifungal activities of ZnO nanoparticles prepared by the *Artocarpus gomezianus* fruit mediated facile green combustion method. Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 3(4), 440-451.
6. Anžlovar, S., Likar, M., Koce, J. D. (2017). Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. Acta Botanica Croatica, 76(1), 64-71.
7. Aron Maftai, N., Ramos-Villarroel, A. Y., Nicolau, A. I., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2014). Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on wheat grain. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(4), 721-726.
8. Atak, M., Mavi, K., Uremis, I. (2016). Bio-Herbicidal effects of Oregano and Rosemary essential oils on germination and seedling growth of bread wheat cultivars and weeds. Romanian Biotechnological Letters, 21(1), 11149-11159.
9. Bacellar, I. O., Oliveira, M. C., Dantas, L. S., Costa, E. B., Junqueira, H. C., Martins, W. K., et al. (2018). Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. Journal of the American Chemical Society, 140(30), 9606-9615.
10. Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., et al. (2015). Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in durum wheat. BMC microbiology, 15(1), 242.
11. Banerjee, A., Mitra, B. (2018). Morphological modification in wheat seedlings infected by *Fusarium oxysporum*. European Journal of Plant Pathology, 152(2), 521-524.



12. Baptista, M. S., Cadet, J., Di Mascio, P., Ghogare, A. A., Greer, A., Hamblin, M. R., et al. (2017). Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochemistry and photobiology*, 93(4), 912-919.
13. Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., Harel, J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2113-2125.
14. Bilek, S. E., Turantaş, F. (2013). Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International journal of food microbiology*, 166(1), 155-162.
15. Bramhanwade, K., Shende, S., Bonde, S., Gade, A., Rai, M. (2016). Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases. *Environmental chemistry letters*, 14(2), 229-235.
16. Brodal, G., Hofgaard, I. S., Eriksen, G. S., Bernhoft, A., Sundheim, L. (2016). Mycotoxins in organically versus conventionally produced cereal grains and some other crops in temperate regions. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 755-770.
17. Brovko, L. (2010). Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 61, pp. 119-147). Academic Press.
18. Buchovec, I., Lukševičiūtė, V., Kokštaite, R., Labeikyte, D., Kaziukonyte, L., Lukšiene, Z. (2017). Inactivation of Gram (-) bacteria *Salmonella enterica* by chlorophyllin-based photosensitization: Mechanism of action and new strategies to enhance the inactivation efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 172, 1-10.
19. Butscher, D., Van Loon, H., Waskow, A., von Rohr, P. R., Schuppler, M. (2016). Plasma inactivation of microorganisms on sprout seeds in a dielectric barrier discharge. *International journal of food microbiology*, 238, 222-232.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts (Final Update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2014/o121-05-14/index.html>
21. Cheli, F., Pinotti, L., Novacco, M., Ottoboni, M., Tretola, M., Dell'Orto, V. (2017). Mycotoxins in Wheat and Mitigation Measures. *Wheat Improvement, Management and Utilization*, 25, 227.
22. Colon, G., Ward, B. C., Webster, T. J. (2006). Increased osteoblast and decreased *Staphylococcus epidermidis* functions on nanophase ZnO and TiO<sub>2</sub>. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for*

- Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 78(3), 595-604.
23. Dhillon, B., Wiesenborn, D., Dhillon, H., Wolf-Hall, C. (2010). Development and evaluation of a fluidized bed system for wheat grain disinfection. *Journal of food science*, 75(6), E372-E378.
  24. Dodd, J. G., Vegi, A., Vashisht, A., Tobias, D., Schwarz, P., Wolf-Hall, C. E. (2011). Effect of ozone treatment on the safety and quality of malting barley. *Journal of food protection*, 74(12), 2134-2141.
  25. Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1447-1464.
  26. FDA, Food and Drug Administration Circular 2013. Revised guidelines for the assessment of microbiological quality of processed food. Filinvest Corporate city, Alabang, Muntinlupa, Philippines. <https://ww2.fda.gov.ph/attachments/article/17218/FC2013-010.pdf>
  27. Figueroa, M., Hammond-Kosack, K. E., Solomon, P. S. (2018). A review of wheat diseases—a field perspective. *Molecular plant pathology*, 19(6), 1523-1536.
  28. Freita-Silva, O., de Oliveira, P. S., Júnior, M. F. (2015). Potential of electron beams to control mycotoxigenic fungi in food. *Food engineering reviews*, 7(2), 160-170.
  29. Frenzen, P. D., Drake, A., Angulo, F. J., Emerging Infections Program FoodNet Working Group. (2005). Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *Journal of food protection*, 68(12), 2623-2630.
  30. Gan, R. Y., Lui, W. Y., Wu, K., Chan, C. L., Dai, S. H., Sui, Z. Q., Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1-14.
  31. Garab, G. (Ed.). (1998). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
  32. Gordon, T., Perlstein, B., Houbara, O., Felner, I., Banin, E., Margel, S. (2011). Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 374(1-3), 1-8.
  33. Graham, D. M. (1997). Use of ozone for food processing. *Food technology (USA)*.
  34. Greene, A. K., Guzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C. (2012). Chemical and physical properties of ozone. *Ozone in food processing*, 19-31.

35. Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current opinion in microbiology*, 33, 67-73.
36. Hamblin, M. R. (2017). Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation by inorganic salts. *Expert review of anti-infective therapy*, 15(11), 1059-1069.
37. Hantke, K., Braun, V. (1973). Covalent Binding of Lipid to Protein: Diglyceride and Amide-Linked Fatty Acid at the N-Terminal End of the Murein-Lipoprotein of the *Escherichia coli* Outer Membrane. *European Journal of Biochemistry*, 34(2), 284-296.
38. He, L., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M. (2011). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological research*, 166(3), 207-215.
39. Heiman, K. E., Mody, R. K., Johnson, S. D., Griffin, P. M., Gould, L. H. (2015). *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging infectious diseases*, 21(8), 1293.
40. Hu, Y., Nie, W., Hu, X., Li, Z. (2016). Microbial decontamination of wheat grain with superheated steam. *Food control*, 62, 264-269.
41. Huang, Y., Kuang, Z., Wang, W., Cao, L. (2016). Exploring potential bacterial and fungal biocontrol agents transmitted from seeds to sprouts of wheat. *Biological control*, 98, 27-33.
42. Yu, T., Bai, J., Hu, K., Wang, Z. (2003). The effect of free radical scavenger and antioxidant on the increase in intracellular adriamycin accumulation induced by ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 10(1), 33-35.
43. Iurlina, M. O., Saiz, A. I., Fuselli, S. R., Fritz, R. (2006). Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *LWT-Food Science and Technology*, 39(2), 105-110.
44. Ivleva, N. P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R., Haisch, C. (2009). Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(1), 197-206.
45. Jalal, R., Goharshadi, E. K., Abareshi, M., Moosavi, M., Yousefi, A., Nancarrow, P. (2010). ZnO nanofluids: green synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*, 121(1-2), 198-201.
46. Janaki, A. C., Sailatha, E., Gunasekaran, S. (2015). Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 144, 17-22.
47. Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by

- adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(11), 1590-1609.
48. Jia, H., Wang, W., Qiu, L., Zhang, N., Ge, H., Wang, J. (2015). Fabricating a long-range ordered 3D bimetallic nanoassembly with edge-on substrate for highly sensitive SERS sensing of *Escherichia coli* bacteria. *Plasmonics*, 10(6), 1889-1894.
  49. Kairyte, K., Luksiene, Z. (2012). Photoactivated ZnO nanoparticles destroy main food pathogens *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* ATCL3C 7644. *Chemical Technology*, 61(3), 32-36.
  50. Kairyte, K., Kadys, A., Luksiene, Z. (2013). Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 78-84.
  51. Karaca, G., Bilginturan, M., Olgunsoy, P. (2017). Effects of Some Plant Essential Oils against Fungi on Wheat Seeds. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 3, S385-S388.
  52. Khanzada, K. A., Rajput, M. A., Shah, G. S., Lodhi, A. M., Mehboob, F. (2002). Effect of seed dressing fungicides for the control of seed borne mycoflora of wheat. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1(4), 441-444.
  53. Kince, T., Galoburda, R., Klava, D., Tomsone, L., Senhofa, S., Straumite, E., et al. (2017). Breakfast cereals with germinated cereal flakes: changes in selected physical, microbiological, and sensory characteristics during storage. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1497-1506.
  54. Klein, S., Witmer, J., Tian, A., DeWaal, C. S. (2009). The ten riskiest foods regulated by the US Food and Drug Administration. Publication of the Center for Science in the Public Interest.
  55. Kosmidis, C., Denning, D. W. (2017). Opportunistic and Systemic Fungi. In *Infectious diseases* (pp. 1681-1709). Elsevier.
  56. Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Buszewski, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in colloid and interface science*, 249, 37-52.
  57. Krüger, M., Richter, P., Strauch, S. M., Nasir, A., Burkovski, A., Antunes, C. A., et al. (2019). What an *Escherichia coli* Mutant Can Teach Us About the Antibacterial Effect of Chlorophyllin. *Microorganisms*, 7(2), 59.
  58. Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., Nalwa, H. S. (2017). Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International*, 43(5), 3940-3961.

59. Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., Pandiella, S. S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 332-338.
60. Lee, K. M., Lai, C. W., Ngai, K. S., Juan, J. C. (2016). Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water treatment technology: a review. *Water research*, 88, 428-448.
61. Lee, P. C., Meisel, D. (1982). Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391-3395.
62. Leung, J. M., Gallant, C. V. (2014). Infections due to *Escherichia* and *Shigella*. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier.
63. Liu, Y., He, L., Mustapha, A., Li, H., Hu, Z. Q., Lin, M. (2009). Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1193-1201.
64. Liu, Y., Zhou, H., Hu, Z., Yu, G., Yang, D., Zhao, J. (2017). Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 131-140.
65. López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. (2018). Photoactivated Self-Sanitizing Chlorophyllin-Containing Coatings to Prevent Microbial Contamination in Packaged Food. *Coatings*, 8(9), 328.
66. López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., Ocio, M. J. (2008). Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. *International journal of food microbiology*, 126(1-2), 65-70.
67. Los, A., Ziuzina, D., Bourke, P. (2018). Current and future technologies for microbiological decontamination of cereal grains. *Journal of food science*, 83(6), 1484-1493.
68. Lozowicka, B., Hrynko, I., Kaczynski, P., Jankowska, M., Rutkowska, E. (2016). Long-Term Investigation and Health Risk Assessment of Multi-class Fungicide Residues in Fruits. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(2).
69. LPC – Centers for disease control and prevention, List of selected multistate foodborne outbreak investigations (2014). <http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>
70. Luksiene, Z., Brovko, L. (2013). Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 185-199.

71. Luksiene, Z., Paskeviciute, E. (2011). Microbial control of food-related surfaces: Na-Chlorophyllin-based photosensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 105(1), 69-74.
72. Luksiene, Z., Buchovec, I., Paskeviciute, E. (2010). Inactivation of several strains of *Listeria monocytogenes* attached to the surface of packaging material by Na-Chlorophyllin-based photosensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(3), 326-331.
73. Lukšienė, Ž., Pečiulytė, D., Jurkonienė, S., Puras, R. (2005). Inactivation of possible fungal food contaminants by photosensitization. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4), 335-341.
74. Lung, H. M., Cheng, Y. C., Chang, Y. H., Huang, H. W., Yang, B. B., Wang, C. Y. (2015). Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, 44(1), 66-78.
75. Mikaberidze, A., Paveley, N., Bonhoeffer, S., van den Bosch, F. (2017). Emergence of resistance to fungicides: The role of fungicide dose. *Phytopathology*, 107(5), 545-560.
76. Mitra, A., Li, Y. F., Klämpfl, T. G., Shimizu, T., Jeon, J., Morfill, G. E., Zimmermann, J. L. (2014). Inactivation of surface-borne microorganisms and increased germination of seed specimen by cold atmospheric plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 645-653.
77. Nagini, S., Palitti, F., Natarajan, A. T. (2015). Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. *Nutrition and cancer*, 67(2), 203-211.
78. Nosaka, Y., Nosaka, A. Y. (2017). Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis. *Chemical reviews*, 117(17), 11302-11336.
79. Nucci, M., Anaissie, E. J. (2009). Hyalohyphomycosis. In *Clinical Mycology* (pp. 309-327). Churchill Livingstone.
80. O'Donnell, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Rice, R. G. (Eds.). (2012). *Ozone in food processing*. John Wiley & Sons.
81. Ohtani, B. (2013). *New and Future Developments in Catalysis: Chapter 5. Principle of Photocatalysis and Design of Active Photocatalysts*. Elsevier Inc. Chapters.
82. Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2010). Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 13.
83. Paskeviciute, E., Zudyte, B., Luksiene, Z. (2018). Towards better microbial safety of fresh produce: Chlorophyllin-based photosensitization for microbial control of

- foodborne pathogens on cherry tomatoes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 182, 130-136.
84. Paskeviciute, E., Zudyte, B., Luksiene, Z. (2019). Innovative Nonthermal Technologies: Chlorophyllin and Visible Light Significantly Reduce Microbial Load on Basil. *Food Technology & Biotechnology*, 57 (1), 126-132.
  85. Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., Bolzinger, M. A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457(1), 263–274.
  86. Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., et al. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*, 35(6), 905-927.
  87. Qi, K., Cheng, B., Yu, J., Ho, W. (2017). Review on the improvement of the photocatalytic and antibacterial activities of ZnO. *Journal of Alloys and Compounds*, 727, 792-820.
  88. Raetz, C. R., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 635-700.
  89. Rosidah, S., Hilhorst, H. H. (2017). The Effect of Chlorophyll Retention on Seed Quality.
  90. Salem, E. A., Soliman, S. A., El-Karamany, A. M., El-Shafea, Y. A. (2016). Effect of Utilization of Gamma Radiation Treatment and Storage on Total Fungal Count, Chemical Composition and Technological Properties Wheat Grain. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(1), 163.
  91. Sawai, J., Yoshikawa, T. (2004). Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of applied microbiology*, 96(4), 803-809.
  92. Schmidt, M., Zannini, E., Arendt, E. (2018). Recent Advances in Physical Post-Harvest Treatments for Shelf-Life Extension of Cereal Crops. *Foods*, 7(4), 45.
  93. Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., Julak, J. (2015). Nonthermal plasma—a tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology advances*, 33(6), 1108-1119.
  94. Schumann, G. L., D'Arcy, C. J. (2006). *Essential plant pathology*. American Phytopathological Society (APS Press).
  95. Seil, J. T., Webster, T. J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767–2781.

96. Sengupta, A., Laucks, M. L., Davis, E. J. (2005). Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria and pollen. *Applied spectroscopy*, 59(8), 1016-1023.
97. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414.
98. Singh, A. K., Rehal, J., Kaur, A., Jyot, G. (2015). Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1575-1589.
99. Singh, A., Singh, N. B., Afzal, S., Singh, T., Hussain, I. (2018). Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *Journal of Materials Science*, 53(1), 185-201.
100. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., et al. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219-242.
101. Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37.
102. Sperandio, F. F., Huang, Y. Y., R Hamblin, M. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 8(2), 108-120.
103. Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679-6686.
104. Sun, Z., Ni, W., Yang, Z., Kou, X., Li, L., Wang, J. (2008). pH-controlled reversible assembly and disassembly of gold nanorods. *small*, 4(9), 1287-1292.
105. Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. U. (2015). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 50(1), 46-111.
106. Tegos, G., Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., et al. (2012). Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in microbiology*, 3, 120.
107. Tralamazza, S. M., Bemvenuti, R. H., Zorzete, P., de Souza Garcia, F., Corrêa, B. (2016). Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. *Food chemistry*, 196, 445-450.
108. Uphoff, H., Hedrich, B., Strotmann, I., Arvand, M., Bettge-Weller, G., Hauri, A. M. (2014). A prolonged investigation of an STEC-O104 cluster in Hesse, Germany, 2011 and implications for outbreak management. *Journal of Public Health*, 22(1), 41-48.



109. Van Hung, P., Maeda, T., Morita, N. (2015). Improvement of nutritional composition and antioxidant capacity of high-amylose wheat during germination. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6756-6762.
110. Vatansever, F., de Melo, W. C., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., et al. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species–bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS microbiology reviews*, 37(6), 955-989.
111. Walter, A., März, A., Schumacher, W., Rösch, P., Popp, J. (2011). Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 11(6), 1013-1021.
112. Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Nopsa, J. H., Bockus, W. W., Hallen-Adams, H. (2015). Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection*, 73, 100-107.
113. World Health Organization (WHO). (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015 (No. 9789241565165). World Health Organization.
114. Xiang, N., Guo, X., Liu, F., Li, Q., Hu, J., Brennan, C. S. (2017). Effect of light-and dark-germination on the phenolic biosynthesis, phytochemical profiles, and antioxidant activities in sweet corn (*Zea mays* L.) sprouts. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1246.
115. Zahoranová, A., Henselová, M., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., Černák, M. (2016). Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36(2), 397-414.
116. Zhang, R., Carlsson, F., Edman, M., Hummelgård, M., Jonsson, B. G., Bylund, D., Olin, H. (2018). *Escherichia coli* Bacteria Develop Adaptive Resistance to Antibacterial ZnO Nanoparticles. *Advanced Biosystems*, 2(5), 1800019.
117. Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C., Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology*, 45(1), 1-18.
118. Žilić, S., Basić, Z., Hadži-Tašković Šukalović, V., Maksimović, V., Janković, M., Filipović, M. (2014). Can the sprouting process applied to wheat improve the contents of vitamins and phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour?. *International journal of food science & technology*, 49(4), 1040-1047.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

Bernadeta Žudytė

Magistro baigiamasis darbas

**Fotosensibilizacija ir fotokatalizė: palyginamieji antimikrobinio efektyvumo, poveikio mechanizmo ir daigintų grūdų mikrobiologinės kontrolės tyrimai**

SANTRAUKA

Sunkiai kontroliuojama daigintų grūdų mikrobiologinė tarša yra aktuali problema visame pasaulyje. Šio darbo tikslas buvo palyginti dviejų inovatyvių neterminių mikrobiologinės kontrolės būdų – fotosensibilizacijos (su chlorofilinu) ir fotokatalizės (su ZnO nanodalelėmis) antimikrobinio efektyvumo rodiklius, poveikio mechanizmą bei galimybes pritaikyti šiuos metodus mikrobiologinei daigintų grūdų saugai padidinti.

Nustatyta, kad abu metodai efektyviai veikia prieš *Fusarium oxysporum* (augimo sulėtinimas iki 52,2 proc. priklausomai nuo koncentracijos), tuo tarpu *Escherichia coli* inaktyvacija daug efektyvesnė po fotokatalizės ( $10^{-3}$  M, 30 J/cm<sup>2</sup>; 7 log ksv/ml) nei po fotosensibilizacijos ( $1,5 \times 10^{-5}$  M, 30 J/cm<sup>2</sup>; 1,35 log ksv/ml). Antimikrobinio veikimo mechanizmas taip pat skirtingas: chlorofilinas su bakterijomis sąveikauja tik iš išorės, pažeisdamas ląstelių sienelę, o fotoaktyvuotos ZnO nanodalelės ne tik veikia išorinę bakterijų membraną, bet galimai ir prasiskverbia į vidų, internalizuojasi ląstelėse ir pažeidžia viduląstelines struktūras. Nepaisant to, abiejų poveikių atveju reaktyvūs deguonies dariniai ardo biomolekules. SERS spektrų analizė parodė, kad abiem atvejais *E. coli* pažeidžiami lipidai, angliavandeniai ir baltymai, tačiau tos pažaidos skirtingos.

Paveikus grūdus fotokatalize ( $10^{-3}$  M ZnO nanodalelių, 18 J/cm<sup>2</sup>), mezofilų populiacija grūdų paviršiuje sumažėjo 2,74 log ksv/g *E. coli* – 2,28 log ksv/g, mikromicetų – 2,09 log ksv/g. Po fotosensibilizacijos poveikio ( $5 \times 10^{-4}$  M Chl; 18 J/cm<sup>2</sup>) šių mikroorganizmų skaičius sumažėjo atitinkamai 2,66 log ksv/g, 1,22 log ksv/g ir 1,23 log ksv/g. Be to, abu metodai pagerino grūdų daigumą (14,5–16,2 proc. lyginant su kontrole), tačiau fotokatalizė

ryškiau skatino šaknų ir daigų augimą (lyginant su kontrole pailgėjo 83,5 proc. ir 62,5 proc.) negu fotosensibilizacija (51 proc. ir 20,7 proc.).

Nepaisant to, kad šis darbas yra pirmas, kuriame bandoma pritaikyti fotosensibilizaciją ir fotokatalizę daigintų grūdų mikrobiologinei kontrolei ir dar daug tyrimų turi būti atlikta ateityje, gauti rezultatai teikia vilčių, kad šie metodai galės konkuruoti su egzistuojančiais daigintų grūdų mikrobiologinės saugos metodais.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTRE  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Bernadeta Žudytė

Master thesis

**Photosensibilization and photocatalysis: comparative analysis of antimicrobial efficacy, mechanism and germinated seeds microbiological control**

SUMMARY

The microbiological contamination of germinated seeds is a serious problem worldwide. The aim of this work was to compare the two innovative non-thermal microbiological control methods (chlorophyllin based photosensitization and photocatalysis with ZnO nanoparticles), evaluating antimicrobial efficacy, the mechanism of action and possibilities to apply these methods to increase microbiological safety of germinated seeds.

Both methods have been shown to be effective against *Fusarium oxysporum* (growth delay up to 52.2% depending on concentration), whereas photocatalysis ( $10^{-3}$  M, 30 J/cm<sup>2</sup>; 7 log CFU/ml inactivation) is much more effective than photosensitization ( $1.5 \times 10^{-5}$  M, 30 J/cm<sup>2</sup>; 1.35 log CFU/ml inactivation) in inactivating *Escherichia coli*. The mechanism of antimicrobial action is also different: chlorophyllin with bacteria interacts only externally, violating the cell wall, and photoactivated ZnO nanoparticles not only affect the outer membrane of bacteria, but possibly penetrate inside, internalize cells and damage intracellular structures. Nonetheless, for both methods, reactive oxygen species are the main instruments to destroy biomolecules. The analysis of SERS spectra showed that in both cases, *E. coli* is affected by lipids, carbohydrates and proteins, but the damage is different.

After photocatalysis ( $10^{-3}$  M ZnO nanoparticles, 18 J/cm<sup>2</sup>), the mesophilic bacteria on the seeds surface decreased by 2.74 log CFU/g, *E. coli* - 2.28 log CFU/g, micromycetes - 2.09 log CFU/g. After photosensitization ( $5 \times 10^{-4}$  M Chl; 18 J/cm<sup>2</sup>), the number of these microorganisms decreased by 2.66 log CFU/g, 1.22 log CFU/g and 1.23 log CFU/g, respectively. In addition, both methods have improved seeds germination (14.5-16.2% compared to control), but photocatalysis has led to more pronounced growth of roots and

shoots (compared to control with 83.5% and 62.5%) than photosensitization (51% and 20.7%).

Despite the fact that this work is the first attempt to apply photosensitization and photocatalysis for microbiological control of germinated seeds and a lot of research must be done in the future, the results are promising. May be, these methods will be able to compete with existing microbiological methods for germinated cereals in the future.

**1 priedas.** *Fusarium oxysporum* inhibicijos blokuotų duomenų dispersinės analizės rezultatai

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Salygos	(J) Salygos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Light	.239	1.092	1.000	-3.707	4.185
	Chl (0,005 M)	2.486	1.092	1.000	-1.460	6.432
	Chl (0,0005 M) + light	15.529*	1.092	.000	11.584	19.475
	Chl (0,005 M) + light	30.510*	1.092	.000	26.564	34.456
	ZnO (0,001 M)	3.686*	.997	.040	.084	7.288
	ZnO (0,001 M) + light	21.098*	.935	.000	17.719	24.477
	ZnO (0,005 M)	15.478*	1.092	.000	11.533	19.424
	ZnO (0,005 M) + light	31.137*	1.092	.000	27.191	35.083
Light	Control	-.239	1.092	1.000	-4.185	3.707
	Chl (0,005 M)	2.247	1.261	1.000	-2.309	6.803
	Chl (0,0005 M) + light	15.290*	1.261	.000	10.734	19.846
	Chl (0,005 M) + light	30.271*	1.261	.000	25.714	34.827
	ZnO (0,001 M)	3.447	1.179	.268	-.815	7.709
	ZnO (0,001 M) + light	20.859*	1.128	.000	16.784	24.934
	ZnO (0,005 M)	15.239*	1.261	.000	10.683	19.796
	ZnO (0,005 M) + light	30.898*	1.261	.000	26.342	35.454
Chl (0,005 M)	Control	-2.486	1.092	1.000	-6.432	1.460
	Light	-2.247	1.261	1.000	-6.803	2.309
	Chl (0,0005 M) + light	13.043*	1.261	.000	8.487	17.599
	Chl (0,005 M) + light	28.024*	1.261	.000	23.467	32.580
	ZnO (0,001 M)	1.200	1.179	1.000	-3.062	5.462
	ZnO (0,001 M) + light	18.612*	1.128	.000	14.536	22.687
	ZnO (0,005 M)	12.992*	1.261	.000	8.436	17.548
	ZnO (0,005 M) + light	28.651*	1.261	.000	24.095	33.207
Chl (0,0005 M) + light	Control	-15.529*	1.092	.000	-19.475	-11.584
	Light	-15.290*	1.261	.000	-19.846	-10.734
	Chl (0,005 M)	-13.043*	1.261	.000	-17.599	-8.487
	Chl (0,005 M) + light	14.980*	1.261	.000	10.424	19.537
	ZnO (0,001 M)	-11.843*	1.179	.000	-16.105	-7.581
	ZnO (0,001 M) + light	5.569*	1.128	.002	1.493	9.644
	ZnO (0,005 M)	-.051	1.261	1.000	-4.607	4.505
	ZnO (0,005 M) + light	15.608*	1.261	.000	11.052	20.164
Chl (0,005 M) + light	Control	-30.510*	1.092	.000	-34.456	-26.564
	Light	-30.271*	1.261	.000	-34.827	-25.714
	Chl (0,005 M)	-28.024*	1.261	.000	-32.580	-23.467

	Chl (0,0005 M) + light	-14.980*	1.261	.000	-19.537	-10.424
	ZnO (0,001 M)	-26.824*	1.179	.000	-31.086	-22.561
	ZnO (0,001 M) + light	-9.412*	1.128	.000	-13.487	-5.336
	ZnO (0,005 M)	-15.031*	1.261	.000	-19.588	-10.475
	ZnO (0,005 M) + light	.627	1.261	1.000	-3.929	5.184
ZnO (0,001 M)	Control	-3.686*	.997	.040	-7.288	-.084
	Light	-3.447	1.179	.268	-7.709	.815
	Chl (0,005 M)	-1.200	1.179	1.000	-5.462	3.062
	Chl (0,0005 M) + light	11.843*	1.179	.000	7.581	16.105
	Chl (0,005 M) + light	26.824*	1.179	.000	22.561	31.086
	ZnO (0,001 M) + light	17.412*	1.036	.000	13.668	21.155
	ZnO (0,005 M)	11.792*	1.179	.000	7.530	16.054
	ZnO (0,005 M) + light	27.451*	1.179	.000	23.189	31.713
ZnO (0,001 M) + light	Control	-21.098*	.935	.000	-24.477	-17.719
	Light	-20.859*	1.128	.000	-24.934	-16.784
	Chl (0,005 M)	-18.612*	1.128	.000	-22.687	-14.536
	Chl (0,0005 M) + light	-5.569*	1.128	.002	-9.644	-1.493
	Chl (0,005 M) + light	9.412*	1.128	.000	5.336	13.487
	ZnO (0,001 M)	-17.412*	1.036	.000	-21.155	-13.668
	ZnO (0,005 M)	-5.620*	1.128	.002	-9.695	-1.544
	ZnO (0,005 M) + light	10.039*	1.128	.000	5.964	14.114
ZnO (0,005 M)	Control	-15.478*	1.092	.000	-19.424	-11.533
	Light	-15.239*	1.261	.000	-19.796	-10.683
	Chl (0,005 M)	-12.992*	1.261	.000	-17.548	-8.436
	Chl (0,0005 M) + light	.051	1.261	1.000	-4.505	4.607
	Chl (0,005 M) + light	15.031*	1.261	.000	10.475	19.588
	ZnO (0,001 M)	-11.792*	1.179	.000	-16.054	-7.530
	ZnO (0,001 M) + light	5.620*	1.128	.002	1.544	9.695
	ZnO (0,005 M) + light	15.659*	1.261	.000	11.103	20.215
ZnO (0,005 M) + light	Control	-31.137*	1.092	.000	-35.083	-27.191
	Light	-30.898*	1.261	.000	-35.454	-26.342
	Chl (0,005 M)	-28.651*	1.261	.000	-33.207	-24.095
	Chl (0,0005 M) + light	-15.608*	1.261	.000	-20.164	-11.052
	Chl (0,005 M) + light	-.627	1.261	1.000	-5.184	3.929
	ZnO (0,001 M)	-27.451*	1.179	.000	-31.713	-23.189
	ZnO (0,001 M) + light	-10.039*	1.128	.000	-14.114	-5.964
	ZnO (0,005 M)	-15.659*	1.261	.000	-20.215	-11.103

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**2 priedas.** Naudojamų metodų antibakterinio poveikio prieš *E. coli* palyginimas

**ANOVA**

E.coli\_kiekis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1015560148663686,000	2	507780074331843,200	130,565	,000
Within Groups	703929100168360,100	181	3889111050653,923		
Total	1719489248832046,000	183			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: E.coli\_kiekis

Bonferroni

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Fotosensibil izatorius	Chl	6504405,55556*	689446,00592	,000	4838403,7970	8170407,3141
	ZnO	9738944,85490*	691286,98652	,000	8068494,4856	11409395,2242
Kontrolė	Chl	-6504405,55556*	689446,00592	,000	-8170407,3141	-4838403,7970
	ZnO	3234539,29935*	298272,68172	,000	2513782,6222	3955295,9765
Chl	Kontrolė	-9738944,85490*	691286,98652	,000	-11409395,2242	-8068494,4856
	ZnO	-3234539,29935*	298272,68172	,000	-3955295,9765	-2513782,6222

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



**3 priedas.** ROS įtakos *E. coli* kiekiui statistinė analizė

**ANOVA**

E.coli\_kiekis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	146249771433006,900	1	146249771433006,900	25,430	,000
Within Groups	994943873103781,000	173	5751120653779,081		
Total	1141193644536788,000	174			

**4 priedas.** Chlorofilino koncentracijos įtakos chlorofilinu indukuotos fotosensibilizacijos antimikrobiniam poveikiui statistinė analizė

**ANOVA**

E.coli\_kiekis\_log

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,932	4	1,483	650,047	,000
Within Groups	,023	10	,002		
Total	5,955	14			

**Multiple Comparisons**

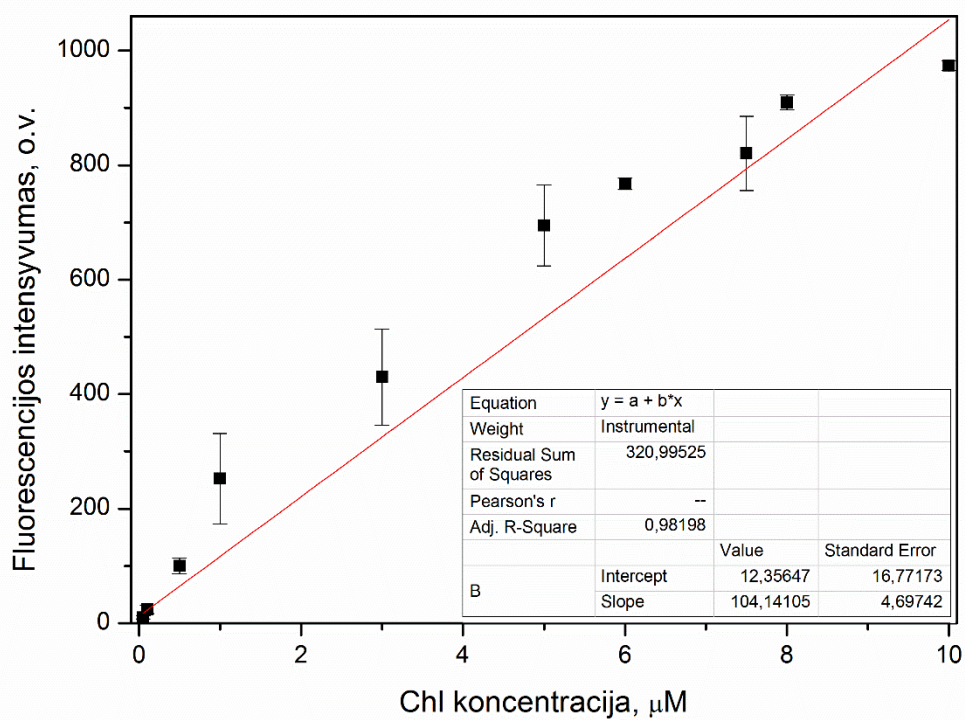
Dependent Variable: E.coli\_kiekis\_log

Bonferroni

(I) Koncentracija _mikroM	(J) Koncentracija _mikroM	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	15,00	,664050949*	,038998904	,000	,52438003	,80372187
	50,00	1,071503943*	,038998904	,000	,93183303	1,21117486
	150,00	1,534379744*	,038998904	,000	1,39470883	1,67405066
	500,00	1,757593457*	,038998904	,000	1,61792254	1,89726437
15,00	,00	-,664050949*	,038998904	,000	-,80372187	-,52438003
	50,00	,407452994*	,038998904	,000	,26778208	,54712391
	150,00	,870328795*	,038998904	,000	,73065788	1,00999971
	500,00	1,093542508*	,038998904	,000	,95387159	1,23321342
50,00	,00	-1,071503943*	,038998904	,000	-1,21117486	-,93183303
	15,00	-,407452994*	,038998904	,000	-,54712391	-,26778208
	150,00	,462875801*	,038998904	,000	,32320488	,60254672
	500,00	,686089514*	,038998904	,000	,54641860	,82576043
150,00	,00	-1,534379744*	,038998904	,000	-1,67405066	-1,39470883
	15,00	-,870328795*	,038998904	,000	-1,00999971	-,73065788
	50,00	-,462875801*	,038998904	,000	-,60254672	-,32320488
	500,00	,223213713*	,038998904	,002	,08354280	,36288463
500,00	,00	-1,757593457*	,038998904	,000	-1,89726437	-1,61792254
	15,00	-1,093542508*	,038998904	,000	-1,23321342	-,95387159
	50,00	-,686089514*	,038998904	,000	-,82576043	-,54641860
	150,00	-,223213713*	,038998904	,002	-,36288463	-,08354280

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### 5 priedas. Chlorofilino fluorescencijos kalibracinė kreivė



6 priedas. Apdorojimo būdo įtakos prieš grūdų mikroorganizmus statistinė analizė

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) Apdorojimas	(J) Apdorojimas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Mezofilai	Kontrolė	Sviesa	935222,2222222221 <sup>*</sup>	193420,0818082479	,000	345412,730706481	1525031,713737963
		Chl	1104383,8383838383 <sup>*</sup>	181319,1154203140	,000	551474,676789331	1657292,999978345
		Chl+sviesa	1481001,1111111110 <sup>*</sup>	172444,8012351354	,000	955153,021397962	2006849,200824260
		ZnO	1078944,4444444443 <sup>*</sup>	176567,5698014533	,000	540524,505888072	1617364,383000816
		ZnO+sviesa	1479524,9682539680 <sup>*</sup>	211038,6109073445	,000	835990,053855326	2123059,882652610
	Sviesa	Kontrolė	-935222,2222222221 <sup>*</sup>	193420,0818082479	,000	-1525031,713737963	-345412,730706481
		Chl	169161,6161616162	212948,5015186572	1,000	-480197,262324818	818520,494648050
		Chl+sviesa	545778,8888888889	205445,0100519888	,149	-80699,064074332	1172256,841852109
		ZnO	143722,2222222222	208917,5660106816	1,000	-493344,840439996	780789,284884440
		ZnO+sviesa	544302,7460317460	238762,9325836362	,390	-183773,897010789	1272379,389074281
	Chl	Kontrolė	-1104383,8383838383 <sup>*</sup>	181319,1154203140	,000	-1657292,999978345	-551474,676789331
		Sviesa	-169161,6161616162	212948,5015186572	1,000	-818520,494648050	480197,262324818
		Chl+sviesa	376617,2727272727	194095,1975844782	,851	-215250,896920387	968485,442374933
		ZnO	-25439,3939393940	197767,1432718877	1,000	-628504,686442743	577625,898563955
		ZnO+sviesa	375141,1298701299	229069,9271969890	1,000	-323377,948492924	1073660,208233184
	Chl+sviesa	Kontrolė	-1481001,1111111110 <sup>*</sup>	172444,8012351354	,000	-2006849,200824260	-955153,021397962
		Sviesa	-545778,8888888889	205445,0100519888	,149	-1172256,841852109	80699,064074332
		Chl	-376617,2727272727	194095,1975844782	,851	-968485,442374933	215250,896920387
		ZnO	-402056,6666666667	189663,9945117247	,569	-980412,456386090	176299,123052756
		ZnO+sviesa	-1476,1428571429	222111,7272956428	1,000	-678777,091710013	675824,805995727
ZnO	Kontrolė	-1078944,4444444443 <sup>*</sup>	176567,5698014533	,000	-1617364,383000816	-540524,505888072	
	Sviesa	-143722,2222222222	208917,5660106816	1,000	-780789,284884440	493344,840439996	
	Chl	25439,3939393940	197767,1432718877	1,000	-577625,898563955	628504,686442743	
	Chl+sviesa	402056,6666666667	189663,9945117247	,569	-176299,123052756	980412,456386090	
	ZnO+sviesa	400580,5238095239	225327,5762857706	1,000	-286526,740085333	1087687,787704381	
ZnO+sviesa	Kontrolė	-1479524,9682539680 <sup>*</sup>	211038,6109073445	,000	-2123059,882652610	-835990,053855326	
	Sviesa	-544302,7460317460	238762,9325836362	,390	-1272379,389074281	183773,897010789	
	Chl	-375141,1298701299	229069,9271969890	1,000	-1073660,208233184	323377,948492924	
	Chl+sviesa	1476,1428571429	222111,7272956428	1,000	-675824,805995727	678777,091710013	
	ZnO	-400580,5238095239	225327,5762857706	1,000	-1087687,787704381	286526,740085333	
E.coli	Kontrolė	Sviesa	58787,8787878788	72298,2249411129	1,000	-168966,758716612	286542,516292369
		Chl	45454,5454545455	72298,2249411129	1,000	-182300,092049945	273209,182959036
		Chl+sviesa	457221,2121212122 <sup>*</sup>	56334,3230201268	,000	279756,228313376	634686,195929048
		ZnO	454787,8787878788 <sup>*</sup>	49890,5150334484	,000	297622,247465528	611953,510110230

	ZnO+sviesa	482760,1010101010 <sup>1</sup>	49890,5150334484	,000	325594,469687750	639925,732332452	
	Kontrole	-58787,8787878788	72298,2249411129	1,000	-286542,516292369	168966,758716612	
	Chl	-13333,3333333333	90630,6213042757	1,000	-298838,880928377	272172,214261710	
Sviesa	Chl+sviesa	398433,3333333334 <sup>1</sup>	78488,4204102700	,000	151178,276194638	645688,390472028	
	ZnO	396000,0000000000 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	162885,696552749	629114,303447251	
	ZnO+sviesa	423972,2222222223 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	190857,918774971	657086,525669474	
	Kontrole	-45454,5454545455	72298,2249411129	1,000	-273209,182959036	182300,092049945	
	Sviesa	13333,3333333333	90630,6213042757	1,000	-272172,214261710	298838,880928377	
Chl	Chl+sviesa	411766,6666666667 <sup>1</sup>	78488,4204102700	,000	164511,609527972	659021,723805362	
	ZnO	409333,3333333333 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	176219,029886082	642447,636780585	
	ZnO+sviesa	437305,5555555556 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	204191,252108304	670419,859002807	
	Kontrole	-457221,2121212122 <sup>1</sup>	56334,3230201268	,000	-634686,195929048	-279756,228313376	
	Sviesa	-398433,3333333334 <sup>1</sup>	78488,4204102700	,000	-645688,390472028	-151178,276194638	
Chl+sviesa	Chl	-411766,6666666667 <sup>1</sup>	78488,4204102700	,000	-659021,723805362	-164511,609527972	
	ZnO	-2433,3333333333	58501,8144946485	1,000	-186726,371847572	181859,705180906	
	ZnO+sviesa	25538,8888888889	58501,8144946485	1,000	-158754,149625350	209831,927403128	
	Kontrole	-454787,8787878788 <sup>1</sup>	49890,5150334484	,000	-611953,510110230	-297622,247465528	
	Sviesa	-396000,0000000000 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	-629114,303447251	-162885,696552749	
ZnO	Chl	-409333,3333333333 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	-642447,636780585	-176219,029886082	
	Chl+sviesa	2433,3333333333	58501,8144946485	1,000	-181859,705180906	186726,371847572	
	ZnO+sviesa	27972,2222222222	52325,6136068466	1,000	-136864,482536908	192808,926981352	
	Kontrole	-482760,1010101010 <sup>1</sup>	49890,5150334484	,000	-639925,732332452	-325594,469687750	
	Sviesa	-423972,2222222223 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	-657086,525669474	-190857,918774971	
ZnO+sviesa	Chl	-437305,5555555556 <sup>1</sup>	73999,5924222967	,000	-670419,859002807	-204191,252108304	
	Chl+sviesa	-25538,8888888889	58501,8144946485	1,000	-209831,927403128	158754,149625350	
	ZnO	-27972,2222222222	52325,6136068466	1,000	-192808,926981352	136864,482536908	
Mikromicet ai	Sviesa	2515,1515151516	104423,2384058952	1,000	-326440,045234850	331470,348265153	
	Chl	201848,4848484849	134014,4759821038	1,000	-220325,343381999	624022,313078969	
	Kontrole	Chl+sviesa	635381,8181818182 <sup>1</sup>	134014,4759821038	,001	213207,989951334	1057555,646412303
		ZnO	591992,9292929294 <sup>1</sup>	92478,7743285630	,000	300665,310375357	883320,548210501
		ZnO+sviesa	663328,4848484849 <sup>1</sup>	92478,7743285630	,000	372000,865930913	954656,103766057
		Kontrole	-2515,1515151516	104423,2384058952	1,000	-331470,348265153	326440,045234850
		Chl	199333,3333333333	145488,8351755913	1,000	-258987,143322304	657653,809988971
	Sviesa	Chl+sviesa	632866,6666666666 <sup>1</sup>	145488,8351755913	,002	174546,190011029	1091187,143322304
		ZnO	589477,7777777778 <sup>1</sup>	108440,9751399616	,000	247865,864017074	931089,691538481
		ZnO+sviesa	660813,3333333333 <sup>1</sup>	108440,9751399616	,000	319201,419572630	1002425,247094037
		Kontrole	-201848,4848484849	134014,4759821038	1,000	-624022,313078969	220325,343381999
		Sviesa	-199333,3333333333	145488,8351755913	1,000	-657653,809988971	258987,143322304
	Chl	Chl+sviesa	433533,3333333333	167996,0363054254	,213	-95689,567811166	962756,234477833
		ZnO	390144,4444444444	137168,1892527900	,111	-41964,244888692	822253,133777581
		ZnO+sviesa	461480,0000000000 <sup>1</sup>	137168,1892527900	,028	29371,310666864	893588,689333136
	Kontrole	-635381,8181818182 <sup>1</sup>	134014,4759821038	,001	-1057555,646412303	-213207,989951334	
Chl+sviesa	Sviesa	-632866,6666666666 <sup>1</sup>	145488,8351755913	,002	-1091187,143322304	-174546,190011029	

	Chl	-433533,3333333333	167996,0363054254	,213	-962756,234477833	95689,567811166
	ZnO	-43388,8888888889	137168,1892527900	1,000	-475497,578222025	388719,800444247
	ZnO+sviesa	27946,6666666667	137168,1892527900	1,000	-404162,022666469	460055,355999803
ZnO	Kontrolė	-591992,9292929294*	92478,7743285630	,000	-883320,548210501	-300665,310375357
	Sviesa	-589477,7777777778*	108440,9751399616	,000	-931089,691538481	-247865,864017074
	Chl	-390144,4444444444	137168,1892527900	,111	-822253,133777581	41964,244888692
	Chl+sviesa	43388,8888888889	137168,1892527900	1,000	-388719,800444247	475497,578222025
	ZnO+sviesa	71335,5555555556	96992,5567837275	1,000	-234211,428881536	376882,539992647
ZnO+sviesa	Kontrolė	-663328,4848484849*	92478,7743285630	,000	-954656,103766057	-372000,865930913
	Sviesa	-660813,3333333333*	108440,9751399616	,000	-1002425,247094037	-319201,419572630
	Chl	-461480,0000000000*	137168,1892527900	,028	-893588,689333136	-29371,310666864
	Chl+sviesa	-27946,6666666667	137168,1892527900	1,000	-460055,355999803	404162,022666469
	ZnO	-71335,5555555556	96992,5567837275	1,000	-376882,539992647	234211,428881536

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**7 priedas.** Apdorojimo būdo įtakos sudygusių grūdų kiekiui statistinė analizė

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Salygos	(J) Salygos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Light	-2,034	2,315	1,000	-10,098	6,031
	Chl	-3,854	2,520	1,000	-12,634	4,925
	Chl + light	-16,067*	2,887	,001	-26,125	-6,009
	ZnO	-5,227	2,315	,589	-13,291	2,838
	ZnO + light	-15,731*	2,520	,000	-24,511	-6,952
Light	Control	2,034	2,315	1,000	-6,031	10,098
	Chl	-1,821	2,636	1,000	-11,002	7,361
	Chl + light	-14,034*	2,989	,004	-24,445	-3,622
	ZnO	-3,193	2,440	1,000	-11,694	5,307
	ZnO + light	-13,697*	2,636	,002	-22,879	-4,516
Chl	Control	3,854	2,520	1,000	-4,925	12,634
	Light	1,821	2,636	1,000	-7,361	11,002
	Chl + light	-12,213*	3,150	,022	-23,187	-1,239
	ZnO	-1,373	2,636	1,000	-10,554	7,809
	ZnO + light	-11,877*	2,818	,011	-21,692	-2,061
Chl + light	Control	16,067*	2,887	,001	6,009	26,125
	Light	14,034*	2,989	,004	3,622	24,445
	Chl	12,213*	3,150	,022	1,239	23,187
	ZnO	10,840*	2,989	,037	,429	21,251
	ZnO + light	,336	3,150	1,000	-10,638	11,310
ZnO	Control	5,227	2,315	,589	-2,838	13,291
	Light	3,193	2,440	1,000	-5,307	11,694
	Chl	1,373	2,636	1,000	-7,809	10,554
	Chl + light	-10,840*	2,989	,037	-21,251	-,429
	ZnO + light	-10,504*	2,636	,018	-19,686	-1,322
ZnO + light	Control	15,731*	2,520	,000	6,952	24,511
	Light	13,697*	2,636	,002	4,516	22,879
	Chl	11,877*	2,818	,011	2,061	21,692
	Chl + light	-,336	3,150	1,000	-11,310	10,638
	ZnO	10,504*	2,636	,018	1,322	19,686

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**8 priedas.** Apdorojimo būdo įtakos daigų ir šaknų ilgiui statistinė analizė

**Multiple Comparisons**

Bonferroni

Dependent Variable	(I) Salygos	(J) Salygos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Saknis	Kontrolė	Šviesa	-,91602	,79890	1,000	-3,2659	1,4338
		Chl	-1,62244	,79890	,638	-3,9723	,7274
		Chl+šviesa	-4,42410*	,77671	,000	-6,7087	-2,1395
		ZnO	-4,41219*	,89836	,000	-7,0546	-1,7698
		ZnO+šviesa	-7,24143*	,82933	,000	-9,6808	-4,8021
	Šviesa	Kontrolė	,91602	,79890	1,000	-1,4338	3,2659
		Chl	-,70642	,71989	1,000	-2,8239	1,4110
		Chl+šviesa	-3,50808*	,69518	,000	-5,5529	-1,4633
		ZnO	-3,49618*	,82889	,000	-5,9342	-1,0581
		ZnO+šviesa	-6,32541*	,75352	,000	-8,5418	-4,1090
	Chl	Kontrolė	1,62244	,79890	,638	-,7274	3,9723
		Šviesa	,70642	,71989	1,000	-1,4110	2,8239
		Chl+šviesa	-2,80166*	,69518	,001	-4,8464	-,7569
		ZnO	-2,78976*	,82889	,012	-5,2278	-,3517
		ZnO+šviesa	-5,61899*	,75352	,000	-7,8354	-3,4026
	Chl+šviesa	Kontrolė	4,42410*	,77671	,000	2,1395	6,7087
		Šviesa	3,50808*	,69518	,000	1,4633	5,5529
		Chl	2,80166*	,69518	,001	,7569	4,8464
		ZnO	,01190	,80753	1,000	-2,3633	2,3871
		ZnO+šviesa	-2,81733*	,72996	,002	-4,9644	-,6703
ZnO	Kontrolė	4,41219*	,89836	,000	1,7698	7,0546	
	Šviesa	3,49618*	,82889	,000	1,0581	5,9342	
	Chl	2,78976*	,82889	,012	,3517	5,2278	
	Chl+šviesa	-,01190	,80753	1,000	-2,3871	2,3633	
	ZnO+šviesa	-2,82923*	,85826	,015	-5,3537	-,3048	
ZnO+šviesa	Kontrolė	7,24143*	,82933	,000	4,8021	9,6808	
	Šviesa	6,32541*	,75352	,000	4,1090	8,5418	
	Chl	5,61899*	,75352	,000	3,4026	7,8354	
	Chl+šviesa	2,81733*	,72996	,002	,6703	4,9644	
	ZnO	2,82923*	,85826	,015	,3048	5,3537	
Daigas	Kontrolė	Šviesa	-,06151	,26614	1,000	-,8443	,7213
		Chl	-,24771	,25426	1,000	-,9956	,5002
		Chl+šviesa	-,78998	,28217	,078	-1,6199	,0400



	ZnO	-,88710*	,24554	,005	-1,6093	-,1649
	ZnO+šviesa	-2,38205*	,29276	,000	-3,2432	-1,5209
Šviesa	Kontrolė	,06151	,26614	1,000	-,7213	,8443
	Chl	-,18619	,26614	1,000	-,9690	,5966
	Chl+šviesa	-,72846	,29292	,195	-1,5900	,1331
	ZnO	-,82559*	,25782	,021	-1,5839	-,0672
	ZnO+šviesa	-2,32054*	,30314	,000	-3,2122	-1,4289
Chl	Kontrolė	,24771	,25426	1,000	-,5002	,9956
	Šviesa	,18619	,26614	1,000	-,5966	,9690
	Chl+šviesa	-,54227	,28217	,823	-1,3722	,2877
	ZnO	-,63940	,24554	,140	-1,3616	,0828
	ZnO+šviesa	-2,13435*	,29276	,000	-2,9955	-1,2732
Chl+šviesa	Kontrolė	,78998	,28217	,078	-,0400	1,6199
	Šviesa	,72846	,29292	,195	-,1331	1,5900
	Chl	,54227	,28217	,823	-,2877	1,3722
	ZnO	-,09713	,27433	1,000	-,9040	,7098
	ZnO+šviesa	-1,59208*	,31730	,000	-2,5254	-,6588
ZnO	Kontrolė	,88710*	,24554	,005	,1649	1,6093
	Šviesa	,82559*	,25782	,021	,0672	1,5839
	Chl	,63940	,24554	,140	-,0828	1,3616
	Chl+šviesa	,09713	,27433	1,000	-,7098	,9040
	ZnO+šviesa	-1,49495*	,28522	,000	-2,3339	-,6560
ZnO+šviesa	Kontrolė	2,38205*	,29276	,000	1,5209	3,2432
	Šviesa	2,32054*	,30314	,000	1,4289	3,2122
	Chl	2,13435*	,29276	,000	1,2732	2,9955
	Chl+šviesa	1,59208*	,31730	,000	,6588	2,5254
	ZnO	1,49495*	,28522	,000	,6560	2,3339

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## CHLOROPHYLLIN-BASED PHOTSENSITIZATION FOR MICROBIAL CONTROL OF FOODS

Eglė Paškevičiūtė<sup>1</sup>, Bernadeta Žudytė<sup>1</sup>, Živilė Lukšienė<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Applied Research, Vilnius University, Lithuania  
[bernadetazud@gmail.com](mailto:bernadetazud@gmail.com)

In recent years fruits and vegetables have been increasingly implicated as 2nd leading cause of foodborne illnesses [1]. Thus, existing decontamination technologies for microbial control are not enough effective.

In this context photosensitization seems promising. It employs a photosensitizer which preferentially associates with microorganism and after activation with visible light of appropriate wavelength generates around reactive oxygen species (ROS) which induce lethal damage of microorganism [2].

The present investigation was undertaken to evaluate the effectiveness of Chlorophyllin-based photosensitization for microbial control of fresh produce, i.e. cocktail tomatoes.

Data presented in Fig. 1A indicated that after illumination of Chl-soaked tomatoes with LED-based light (405 nm (light dose 3 J/cm<sup>2</sup>) microbial contamination reduced by 2.4 log (99%), whereas the population of *Listeria* reduced by 1.5 log (95 %) (Fig. 1B).

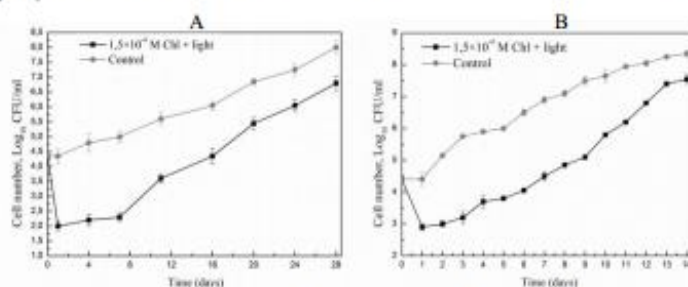


Fig. 1 A - Regrowth of mesophilic bacteria on cherry tomatoes after photosensitization treatment: 1.5x10<sup>-4</sup>M, 5 min illumination, light dose 3 J/cm<sup>2</sup>; B - Regrowth of thermoresistant pathogen *Listeria monocytogenes* 56Ly.

During treatment temperature on the surface of tomatoes changed only from 23 °C to 28.5 °C what means that treatment is not dangerous to food matrix.

Nutritional quality of treated tomatoes was tested evaluating total antioxidant activity. No statistically significant changes of the antioxidant activity of treated tomatoes have been found.

Comparing the decontamination efficiency of Chl-based photosensitization with conventional preservation treatments showed that that Chl-based photosensitization was most effective (Fig. 2).

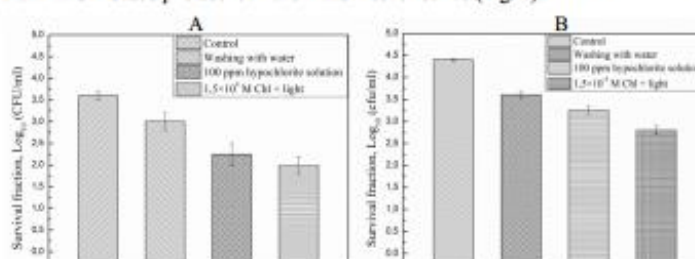


Fig. 2 A - Inactivation of thermoresistant *Listeria monocytogenes* 56Ly; B - thermoresistant *Bacillus cereus* SV60 inoculated on tomatoes by Chl-based photosensitization in comparison with conventional treatments.

Chl-based photosensitization drastically reduced the population of naturally distributed surface attached mesophilic bacteria and inoculated thermoresistant strains of *B. cereus* and *L. monocytogenes*. Moreover, it did not induce harmful effects on nutritional quality of tomatoes, acted nonthermally and prolonged the shelf-life of tomatoes by 4 days. In our opinion, chlorophyllin-based photosensitization has a huge potential as alternative not-chemical, light-based fruit and vegetable preservation technology.

- [1] I. Castro-Ibáñez, M.I. Gil, A. Allende, Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain, LWT - Food Sci. Technol. 85, 284–292 (2017).
- [2] Z. Lukšienė, E. Paškevičiūtė, Novel approach to decontaminate food-packaging from pathogens in non-thermal and not chemical way: Chlorophyllin-based photosensitization, in: J. Food Eng., Elsevier Ltd, 317-323 (2012).

## **BOTRYTIS CINEREA INHIBITION BY PHOTOACTIVATED ZNO NANOPARTICLES**

**Bernadeta Žudytė<sup>1</sup>, Vilmantas Pupkis<sup>2</sup>, Vilma Kisnierienė<sup>2</sup>, Živilė Lukšienė<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Photonics and Nanotechnology, Vilnius University, Lithuania

<sup>2</sup>Department of Neurobiology and Biophysics, Vilnius University, Lithuania

[bernadetazud@gmail.com](mailto:bernadetazud@gmail.com)

*Botrytis cinerea* is the gray mold pathogen, which causes diseases for pre- and post-harvest fruits [1]. It is the most important postharvest decay pathogen [2] and the second most economically significant plant pathogen [3]. In order to control *B. cinerea*, it is necessary to find effective antifungal method.

In recent years, a rapid development of nanotechnology opens up whole universe of new possibilities for agriculture. ZnO nanoparticles have high specific toxicity against bacteria and only minimal effects were observed on human cells. The aim of this study was to evaluate the antifungal efficiency of ZnO nanoparticles in suspension after photoactivation with visible light against harmful fungi *B. cinerea* in vitro.

The absorption spectrum of ZnO nanoparticles suspension ( $1 \times 10^{-3}$  M) is presented in Fig. 1. It is obvious, that absorption maximum at 375 nm. No other peaks were observed in the spectrum, what confirms the high purity of ZnO nanoparticles.

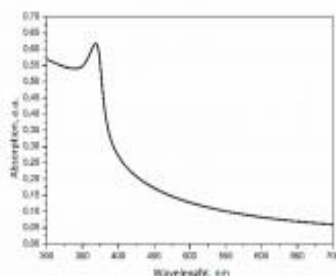


Fig. 1 Absorption spectrum of  $1 \times 10^{-3}$  M ZnO nanoparticles

Radial growth of *B. cinerea* was examined in control and treated samples in vitro. As seen in Fig. 2 photoactivated ZnO nanoparticles significantly (~80 %) inhibited the radial growth of *B. cinerea* compared to the control.

Membrane potential (MP) is useful parameter to measure because it reflects physiological status of the cell and integrity of plasma membrane. Cells in treated group exhibited less negative MP ( $-24.8 \pm 1.4$  mV) compared to MP of untreated cells ( $-35.5 \pm 1.5$  mV). These results are in agreement with other studies, which showed that photoactivated ZnO nanoparticles increases permeability of plasma membrane.

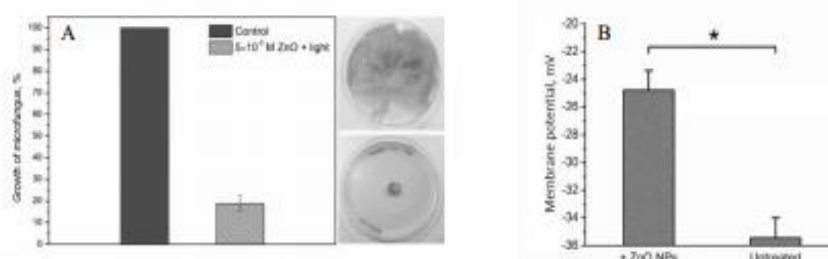


Fig. 2 A – *B. cinerea* growth inhibition by  $5 \times 10^{-3}$  M photoactivated ZnO nanoparticles; B - Effect of ZnO nanoparticles on *B. cinerea* cell membrane potential

Obtained results confirms the idea, that photoactivated ZnO nanoparticles can be used as effective antifungal treatment against *B. cinerea*.

- [1] Stockwell, V. O., Shaffer, B. T., Jones, L. A., & Pscheidt, J. W. (2018, July). Fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* isolated from berry crops in Oregon. In International Congress of Plant Pathology Abstracts and Proceedings.
- [2] Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In Postharvest decay (pp. 131-146).
- [3] Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

## UNDERSTANDING *E. COLI* DAMAGES AFTER CHLOROPHYLLIN-BASED PHOTOSENSITIZATION USING SERS

Bernadeta Žudytė<sup>1</sup>, Martynas Velička<sup>2</sup>, Živilė Lukšienė<sup>1</sup>, Valdas Šablinskas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Photonics and Nanotechnology, Vilnius University, Lithuania

<sup>2</sup>Institute of Chemical Physics, Vilnius University, Lithuania

[bernadetazud@gmail.com](mailto:bernadetazud@gmail.com)

Every year Centers for Disease Control and Prevention and World Health Organization reports numerous cases of illnesses and even deaths, which are related with food, contaminated with pathogens [1,2]. Chlorophyllin-based photosensitization is one of the most promising innovative approaches for decontamination of fresh produce [3]. However, main disadvantage of this method is limited susceptibility of Gram-negative bacteria [4]. In order to find ways for the optimization of this technology, it is necessary to find out precise mechanism how does it destroy bacterial cell. For this reason, surface enhanced Raman scattering (SERS) was used.

The collected SERS spectra of pure *E. coli*, aqueous 1 mM chlorophyllin solution and bacteria treated by chlorophyllin-based photosensitization are presented in the Fig. 1.

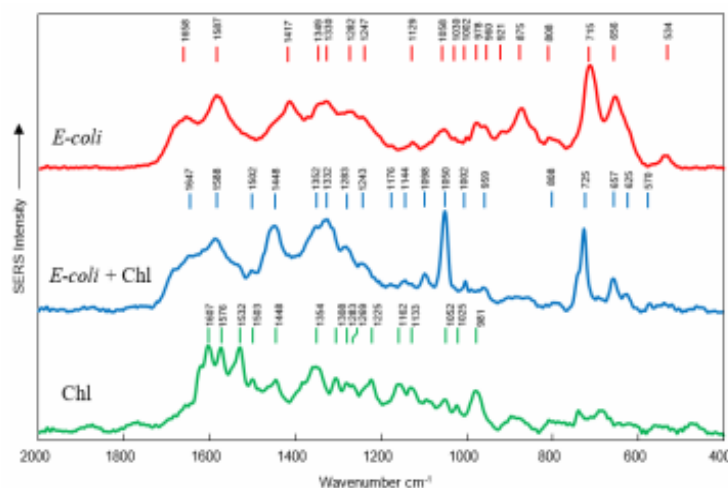


Fig. 1 SERS spectra of *E. coli* in the buffer solution (red), bacteria affected by chlorophyllin-based photosensitization (blue) and chlorophyllin (green)

Noticeable differences in the spectra of bacteria after the treatment with chlorophyllin-based photosensitization can be seen. The major differences are the appearance of an intense spectral bands located at  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $1448\text{ cm}^{-1}$  and  $1098\text{ cm}^{-1}$ . These bands can be attributed to the vibrations of carbohydrate fragments,  $\delta(\text{CH}_2)$  and  $\nu(\text{C-C})$  normal vibrational modes of the lipids [5]. This finding can be associated with bacteria cell membrane.

SERS spectra of these molecules are weak in the unaffected bacteria, since due to the close packing of molecules in the membrane of undamaged cells the carbohydrate molecules cannot appear in close neighbourhood with metal nanoparticles of the colloidal solution, used for Raman signal enhancement. The situation is different when the membrane is damaged - fragments of molecules from the membrane can get closer to the nanoparticles what in turn can reason strong SERS spectral bands.

These spectral features indicate that some changes related to the lipid molecules, proteins and carbohydrates are taking place due to the bacteria treatment with chlorophyllin-based photosensitization. These changes are induced by ROS [6] which lead us to believe that in fact the disruption of the integrity of the membrane is the key effect of the chlorophyllin-based photosensitization treatment.

[1] CDC (2011). <https://www.cdc.gov/VitalSigns/foodsafety/> (Retrieved on date: 10/01/2019).

[2] WHO (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/> (Retrieved on date: 10/01/2019).

[3] Paskėvičiūtė, E., Žudytė, B., & Lukšienė, Z. (2018). Towards better microbial safety of fresh produce: Chlorophyllin-based photosensitization for microbial control of foodborne pathogens on cherry tomatoes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 182, 130-136.

[4] Buchovec, I., Lukševičiūtė, V., Kokštaitė, R., Labeikyte, D., Kaziukonyte, L., & Lukšienė, Z. (2017). Inactivation of Gram (-) bacteria *Salmonella enterica* by chlorophyllin-based photosensitization: Mechanism of action and new strategies to enhance the inactivation efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 172, 1-10.

[5] Colnija, A., Dina, N. E., Leopold, N., Vodnar, D. C., Bogdan, D., Pomv, S. A., & David, L. (2017). Characterization and discrimination of gram-positive bacteria using Raman spectroscopy with the aid of principal component analysis. *Nanomaterials*, 7(9), 248.

[6] Kashmiri, Z. N., & Mankar, S. A. (2014). Free radicals and oxidative stress in bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(9), 34-40.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry &amp; Photobiology, B: Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol)

## Towards better microbial safety of fresh produce: Chlorophyllin-based photosensitization for microbial control of foodborne pathogens on cherry tomatoes

Egle Paskeviciute<sup>a</sup>, Bernadeta Zudyte<sup>a</sup>, Zivile Luksiene<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Vilnius University, Inst. of Photonics and Nanotechnology, Sauletekio 10, Vilnius 10223, Lithuania<sup>b</sup> Faculty of Mathematics and Informatics, Naugarduko g. 24, Vilnius 03225, Lithuania

### ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial efficiency of Chlorophyllin-based photosensitization for microbial control of cherry tomatoes.

Chlorophyllin-based photosensitization ( $1.5 \times 10^{-4}$  M,  $3 \text{ J/cm}^2$ ) significantly (2.4 log) reduced the population of naturally distributed surface attached various mesophilic bacteria (microbiota) on tomatoes. Moreover, the population of thermoresistant strains of food pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* inoculated on tomatoes was reduced by 1.5 log and 1.6 log respectively after this treatment. Conventional washing with water reduced the population of *Listeria* on tomato by 0.6 log and *Bacillus* by 0.8 log. In comparison, hypochlorite treatment reduced *Listeria* on tomatoes by 1.4 log and *Bacillus* by 1.6 log. The regrowth of mesophilic bacteria and thermoresistant *Listeria* on the surface of tomatoes after photosensitization was delayed for 28 days and 14 days respectively. Moreover, photosensitization did not induce harmful effects on main parameter of nutritional quality of tomatoes, i.e. antioxidant activity of tomatoes remained unchanged ( $27.5 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{kg}$ ). Eventually, this treatment did not induce visible thermal effects in fruit matrix and prolonged the shelf-life of tomatoes by 4 days. In our opinion, chlorophyllin-based photosensitization has a huge potential as alternative to not chemical food preservation technology, saving water and energy. In addition, fast development of light emitting diodes (LED's) and light sources based on LED technologies make this treatment low cost, environmentally friendly and easy to maintain.

### 1. Introduction

In recent years, the consumption of various fruits and vegetables has drastically increased. At the same time fresh produce has been increasingly implicated as 2nd leading cause of foodborne illnesses [1]. World Health Organization has estimated that foodborne and waterborne diseases killed about 2.2 million people every year worldwide [2]. According to European Food Safety Authority (EFSA) even in European Union in 2015 there were 437 cases and 14 outbreaks of foodborne illness related to vegetable and fruit consumption [3]. Fresh vegetables and fruits are very frequently contaminated with Gram (+) foodborne pathogens such as *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* [4]. In France during 2007–2014 years > 140 foodborne outbreaks associated with *Bacillus cereus* have been reported [5]. In Switzerland from the end of 2013 to the beginning of 2014 year 32 cases of listeriosis have been registered [6]. Since 1990, several outbreaks of foodborne illness have been associated with the consumption of raw tomatoes [7].

In order to decrease microbial contamination of fruits and vegetables traditionally sodium hypochlorite and acids as disinfectants are commonly used. Yet, the usage of chemical sanitizers in XX<sup>th</sup> century is suspected to be environmentally unsound as it is associated with occupational hazards. Many researchers mentioned that excessive use of chlorine can be harmful to humans due to the formation of carcinogenic disinfection by-products such as trihalomethanes, chloramines, halo-ketones, chloropicrins, and haloacetic acids caused by the reaction of residual chlorine with organic matter [8]. Due to these risks the use of chlorine-based compounds is forbidden in such European countries as the Netherlands, Sweden, Germany, and Belgium [9]. Consequently, the need for novel technologies which would be more effective and would meet high nowadays standards is obvious.

First attempts to prevent infectious food-borne diseases using photosensitization for microbial control of fruits and vegetables have been started in our laboratory. Photosensitization employs a photosensitizer which preferentially associates with microorganism and after activation

\* Corresponding author at: Vilnius University, Inst. Photonics and Nanotechnology, Sauletekio 10, Vilnius 10223, Lithuania.  
E-mail address: [Zivile.Luksiene@tmi.vu.lt](mailto:Zivile.Luksiene@tmi.vu.lt) (Z. Luksiene).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.009>

Received 2 January 2018; Received in revised form 5 April 2018; Accepted 5 April 2018  
Available online 11 April 2018

1011-1344/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Innovative Nonthermal Technologies: Chlorophyllin and Visible Light Significantly Reduce Microbial Load on Basil

Egle Paskeviciute,  
Bernadeta Zudyte and  
Zivile Luksiene\*

Vilnius University, Institute of  
Photonics and Nanotechnology,  
Saulėtekio 10, 10223 Vilnius, Lithuania

Received: 23 April 2018  
Accepted: 21 December 2018



### SUMMARY

Due to the high amount of biologically active compounds, basil is one of the most popular herbs. However, several outbreaks have been reported in the world due to the consumption of basil contaminated with different food pathogens. The aim of this study is to apply nonthermal and ecologically friendly approach based on photosensitization for microbial control of basil which was naturally contaminated with mesophils and inoculated with thermoresistant food pathogen *Listeria monocytogenes* 56Ly. The obtained data indicate that soaking the basil in  $1.5 \cdot 10^{-4}$  M chlorophyllin (Chl) for 15 min and illumination with light for 15 min at 405 nm significantly reduced total aerobic microorganisms on basil by 1.3 log CFU/g, and thermoresistant *L. monocytogenes* 56Ly from 6.1 log CFU/g in control to 4.5 log CFU/g in the treated samples. It is important to note that this treatment had no impact on enzymatic activity of polyphenol oxidase and pectinesterase. Results obtained in this study support the idea that photosensitization technique with its high selectivity, antimicrobial efficiency and nonthermal nature can serve in the future for the development of safe nonthermal and environmentally friendly preservation technology for different fruits and vegetables.

**Key words:** photosensitization, antimicrobial technology, fresh produce, *Ocimum basilicum*

### INTRODUCTION

Basil is one of the most popular pot-herbs mostly due to high amount of biologically active compounds, such as volatile oils, tannins, terpenes, flavonoids, glycosides and macro- and microelements. Moreover, for many years basil has been applied as medical herb to treat inflammation (1).

However, despite its high antimicrobial activity, due to phenolic compounds (carvacrol, eugenol, linalool, and thymol) (2,3), several outbreaks have been reported after consumption of minimally processed foods that included basil (4-6). In 2017 European Food Safety Authority (7) confirmed that *Listeria monocytogenes* is one of the most often detected pathogens in ready-to-eat food in Europe. For instance, Estonia reported 3.6 % of ready-to-eat products contaminated with *Listeria monocytogenes*. In 2008, the consumption of basil contaminated with *Salmonella enterica* induced outbreak of salmonellosis in Israel and it spread out in four countries (8). Moreover, in the United Kingdom, Berger *et al.* (9) reported a large outbreak of salmonellosis (55 people) due to consumption of basil. Thus, it is evident that conventional antimicrobial technologies for decontamination of fresh produce are not efficient enough.

FAO and WHO convened an Expert Meeting in 2007 and concluded that from a global perspective, leafy green vegetables currently presented the greatest concern in terms of microbiological hazards (10). Moreover, fresh produce contaminated with different pathogens can pose a bioterrorism threat (11).

Most recent methods applied for microbial control of foods are thermal or chemical. Both of them are not desirable nowadays, because they induce plenty of uncontrolled chemical

\*Corresponding author:

E-mail: [Zivile.Luksiene@tmi.vu.lt](mailto:Zivile.Luksiene@tmi.vu.lt)

ORCID IDs: 0000-0002-4147-1437  
(Zudyte), 0000-0003-3544-0252  
(Paskeviciute), 0000-0001-6807-2770  
(Luksiene)