



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Popierinių pakuočių, pasižyminčių baktericidinėmis  
savybėmis, sukūrimas ir tyrimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Liudvika Juškaitė**

Projekto autorė

**doc. dr. Antanas Šarkinas**

Vadovas

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Popierinių pakuočių, pasižyminčių baktericidinėmis  
savybėmis, sukūrimas ir tyrimas**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Liudvika Juškaitė**

Projekto autorė

**doc. dr. Antanas Šarkinas**

Vadovas

**dr. Darius Černauskas**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Liudvika Juškaitė

## **Popierinių pakuočių, pasižyminčių baktericidinėmis savybėmis, sukūrimas ir tyrimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Liudvika Juškaitė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Juškaitė, Liudvika. Popierinių pakuočių, pasižyminčių baktericidinėmis savybėmis, sukūrimas ir tyrimas. Magistro baigiamasis projektas. Vadovas doc. dr. Antanas Šarkinas. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Maisto institutas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: maisto pakavimas, nanodalelė, varis, sidabras, žalioji sintezė, antibakterinis aktyvumas, žalioji chemija, biotechnologija, maisto mokslas, nanotechnologijos.

Kaunas, 2021. 55 p.

### Santrauka

Maisto pramonė susiduria su daugybe svarbių iššūkių: patogenų, galinčių turėti įtakos produktų kokybei ir saugai, grėsme ir didėjančiais maisto atliekų kiekiais. Mokslininkai intensyviai siūlo inovatyvius šių problemų sprendimo būdus: nanostruktūros suteikia galimybę sumažinti maisto atliekų kiekį, jas panaudojant nanodalelių sintezei, o šios gali efektyviai padėti užtikrinti maisto saugą. Maisto pramonėje naudojamos nanodalelės gali atlikti nanostruktūrizuotų maisto ingredientų ir maisto „nanosensorių“ vaidmenį. Nanomedžiagos gali būti naudojamos tvirtesnėms, funkcinėms ir inovatyvioms pakuotėms kurti. Šiame darbe aptariamos ir analizuojamos minėtos maisto saugos problemos ir siūlomi praktiniai sprendimai popierinėms maisto produktų pakuotėms impregnuoti su metalinėmis nanodalelėmis. Vario ir sidabro nanodalelės buvo susintetintos naudojant maisto atliekas (bananų ir obuolių žievelių vandeninius ekstraktus), siekiant impregnuoti maistinio popieriaus pakuotę. Pirmasis eksperimento etapas apėmė kiekybinę ir kokybinę maisto atliekų ekstraktų analizę. Siekiant įvertinti junginius, gebančius redukuoti metalų jonus, buvo atliktas paruoštų ekstraktų efektyviosios skysčių chromatografijos tyrimas. Remiantis efektyviosios skysčių chromatografijos rezultatais, Cu ir Ag nanodalelių sintezei ir jų impregnavimui į popieriaus matricą buvo pasirinktas obuolių žievelių ekstraktas.

Koloidiniai tirpalai ir nanodalelėmis impregnuotas popierius buvo analizuojami taikant ultravioletinės–regimosios šviesos spektroskopijos metodą. Nanodalelėmis impregnuoto popieriaus morfologinė analizė buvo atlikta taikant skenuojančią elektroninę mikroskopiją. Nanodalelių pasiskirstymo popieriaus matricoje apibūdinimas atliktas taikant Rentgeno spindulių energijos dispersijos spektroskopiją. Galiausiai, taikant klasikinį difuzijos į agarą metodą, buvo iširtas antibakterinis nanodalelėmis modifikuoto popieriaus aktyvumas prieš patogenines *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ir *Staphylococcus aureus* bakterijas.

Juskaite, Liudvika. The development and investigation of the nanoparticles modified paper food packages with antibacterial properties. Master's Final Degree Project. Supervisor dr. Antanas Sarkinas. Kaunas university of technology, Faculty of Chemical engineering, Food institute.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: food packaging, nanoparticle, copper, silver, green synthesis, antibacterial activity, green chemistry, biotechnology, food science, nanotechnology.

Kaunas, 2021. 55 p.

### Summary

The food industry is facing a number of important challenges: the threat of pathogens, that can affect the quality and safety of products, and an increasing amount of food waste. Researchers are intensively proposing an inovative ways to solve the following issues: nanostructures offer opportunities to reduce food waste by applying them for the synthesis of nanoparticles, which would be useful for improvement of food quality. Nanoparticles applied in the food industry can play a role as nanostructured food ingredients and as food 'nanosensors'. In the context of food packaging, nanomaterials can already be applied in this area in the form of reinforced, active and smart packaging. This work discusses and analyzes the above mentioned problems of food safety and suggests the practical solutions for the impregnation of paper based food packages with metal nanoparticles. Copper and silver nanoparticles were synthesized using food waste materials (aqueous extracts of banana and apple peels) for impregnation of a food paper package. The first stage of the experiment included the quantitative and qualitative analysis of the food waste based extracts. In order to evaluate the compounds capable of reducing metal ions, high performance liquid chromatography analysis of the prepared extracts was carried out. Based on the high performance liquid chromatography results, the extract of apple peels was selected for the synthesis of Cu and Ag nanoparticles and their impregnation into the paper matrix.

The colloidal solutions and the nanoparticles impregnated paper were analyzed by ultraviolet–visible spectroscopy. The morphological characterization of the nanoparticles impregnated paper was carried out using scanning electron microscopy. The characterization of nanoparticles distribution on the paper matrix was investigated by Energy-dispersive X-ray spectroscopy. Finally, the antibacterial activity of the nanoparticles modified paper against pathogenic bacteria of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* was investigated by the conventional agar diffusion method.

## Turinys

Įvadas .....	9
1. Literatūros apžvalga .....	10
1.1. Patogenai .....	10
1.2. Patogeninės bakterijos.....	12
1.2.1. <i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridium perfringens</i> ir <i>Clostridium botulinum</i> .....	12
1.2.2. <i>Campylobacter jejuni</i> .....	13
1.2.3. <i>Salmonella</i> spp.....	13
1.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.2.5. <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.2.6. <i>Bacillus subtilis</i> .....	15
1.3. Virusai .....	15
1.4. Parazitai.....	16
1.5. Grybelinės infekcijos .....	16
1.6. Prevencinės priemonės prieš maisto patogenus .....	17
1.6.1. Radiacijos technologijos maisto pramonėje .....	18
1.6.2. Patogenų aptikimo metodai .....	20
1.7. Nanotechnologijos maisto pakavime .....	21
1.7.1. Sidabro (Ag) nanodalelės .....	22
1.7.2. Vario (Cu) nanodalelės .....	22
1.8. Nanodalelių sintezė .....	22
1.8.1. Fizikinė nanosintezė.....	23
1.8.2. Cheminė nanodalelių sintezė .....	23
1.8.3. Biologinė nanosintezė .....	23
1.8.4. Maistinių atliekų taikymas nanodalelių sintezei.....	24
1.9. Mikroorganizmų sąveika su nanodalelėmis .....	24
1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	24
2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....	26
2.1. Medžiagos ir reagentai .....	26
2.2. Priemonės ir prietaisai.....	26
2.3. Metodai .....	27
2.3.1. Vandenių obuolių ir bananų žievių ekstraktų paruošimas .....	27
2.3.2. Kokybinė ir kiekybinė redukuojančių cukrų, esančių žievių ekstraktuose, analizė .....	27
2.3.3. Vario ir sidabro nanodalelių sintezė .....	29
2.3.4. Popierinių pakuočių padengimas Cu ir Ag nanodalelėmis .....	29
2.3.5. Vario ir sidabro nanodalelių optinių savybių tyrimas .....	29
2.3.6. Susintetintų nanodalelių morfologijos (SEM) ir elementinės sudėties (EDS) tyrimai .....	30
2.3.7. Susintetintų nanodalelių antibakterinių savybių tyrimas .....	30
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	32
3.1. Kokybinė ir kiekybinė redukuojančių cukrų, esančių žievių ekstraktuose, analizė .....	32
3.2. Vario ir sidabro nanodalelių sintezė ir jų optinių savybių analizė .....	34
3.3. Vario ir sidabro nanodalelių morfologinės ir elementinės sudėties tyrimai .....	36
3.4. Susintetintų nanodalelių antibakterinių savybių tyrimas .....	40
4. Rekomendacijų dalis .....	46
Išvados.....	47

Literatūros sąrašas..... 48

## Santrumpų ir terminų žodynas

- ATCC – angl. *American Type Culture Collection*, Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija
- DNR – deoksiribonukleorūgštis
- EDS – (Rentgeno spindulių) energijos dispersijos spektroskopija, (angl. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDX))
- EFSA – angl. *European Food Safety Authority*, Europos maisto saugos tarnyba
- ESC – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. HPLC, *High-performance/pressure liquid chromatography*)
- FDA – angl. *The Food and Drug Administration*, Maisto ir Vaistų Administracija
- GMP – angl. *Good Manufacturing Practices*, Geroji Gamybos Praktika
- HACCP – angl. *Hazard Analysis Critical Control Points*, Pavojaus analizės kritiniai kontrolės taškai
- ISO – angl. *International Organization for Standardization*, Tarptautinė standartizacijos organizacija
- KSV – kolonijas sudarantys vienetai
- Nds – nanodalelės
- PAM – paviršiaus aktyvioji medžiaga
- PCA – agaras *Plate Count Agar*
- PGR – polimerazės grandininė reakcija, angl. *polymerase chain reaction*, PCR
- RNR – ribonukleino rūgštis
- ROS – angl. *reactive oxygen species*, reaktyviosios deguonies rūšys
- SEM – angl. *scanning electron microscopy*, skenuojanti elektroninė mikroskopija
- SPR – angl. *surface plasmon resonance*, paviršiaus plazmono rezonansas
- UV–RŠ – ultravioletinė–regimoji šviesa
- ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas



## Įvadas

Šiais laikais pasaulis susiduria su vis sudėtingesnėmis problemomis. Kelios iš jų, reikalaujančios greitų ir efektyvių sprendimų, yra susijusios su maisto pertekliumi (arba jo trūkumu) ir patogenais. Maisto žmonijai visada reikėjo ir reikės – jo kokybė ir sauga yra viena iš prioritetinių sričių visame kame. Beje, maisto pertekliaus ir didžiulio jo poreikio sąlygojamas atliekų kiekio didėjimas yra globalinio masto problema, sukelianti neigiamas klimato kaitos pasekmes. Sąvartynuose besikaupiančios maisto atliekos sukuria patologią terpę daugintis patogeniniams mikroorganizmams. Patogeninių savybių turintys mikroorganizmai vis sparčiau prisitaiko prie juos supančios aplinkos, o tai kelia didžiulį pavojų maisto produktų saugumui, tuo pačiu ir žmonių sveikatai.

Ieškant būdų, kaip spręsti šias problemas, mokslinių straipsnių kiekis nuolat sparčiai auga. Publikacijose, kuriose nagrinėjamos atliekų panaudojimo galimybės, pasaulio mokslo tyrėjų grupės pateikia inovatyvius jų taikymo sprendimus nanomedžiagų sintezei. Tokiu būdu sukurtos nanomedžiagos turi unikalių mechaninių, elektrinių, fotokatalitinių, hemolizinių savybių bei pasižymi plazmoniniais, antibakteriniais efektais ar (ir) kitomis savybėmis. Dėl to šios medžiagos yra taikomos tarpdisciplininuose moksliniuose tyrimuose, taip pat ir su maistu susijusiose srityse. Nors tai palyginti nauja tyrimų kryptis, tačiau tokios nanomedžiagos, kaip nanodalelės vis labiau atranda savo nišą maisto saugos srityje. Vis aktualesnis tampa ir šių dalelių pritaikomumas maisto pakavime. Be to, biotechnologijų ir nanotechnologijų sandūroje atsiradę ir „žaliosios chemijos“ principais paremti sintezės metodai mažina maisto atliekų kiekį panaudojant jas kaip reagentus. Toks jų panaudojimas leidžia išvengti agresyvių, toksiškų cheminių agentų naudojimo, tuo pačiu ir kenksmingo jų poveikio gamtai bei žmogaus sveikatai.

**Darbo tikslas** – sukurti metodiką popierinių maisto pakuočių impregnavimui sidabro ir vario nanodalelėmis, susintetintomis panaudojant antrines maisto žaliavas.

### Uždaviniai:

1. parinkti antrines maistines žaliavas, tinkamas sidabro ir vario nanodalelių sintezei, pagaminti jų ekstraktus ir ištirti juose esančių sidabro ir vario jonus redukuojančių medžiagų kokybinę ir kiekybinę sudėtį;
2. susintetinti sidabro ir vario nanodaleles, panaudojant pasirinktas antrines maistines žaliavas ir ištirti jų optines ir morfologines savybes;
3. sukurti metodiką popierinių pakuočių impregnavimui sidabro ir vario nanodalelėmis;
4. ištirti sidabro ir vario nanodalelėmis modifikuotų popierinių pakuočių optines ir morfologines savybes;
5. ištirti sukurtų popierinių pakuočių antibakterinį poveikį keturių rūšių skirtingų koncentracijų patogeninėms bakterijoms.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Patogenai

Su maistu į žmogaus organizmą atkeliauja ne tik naudingosios medžiagos, pavyzdžiui, baltymai, riebalai, angliavandeniai, vitaminai, bet egzistuoja ir nemenkas sveikatos problemas galintys sukelti veiksniai. Mityba būtina žmogui išgyventi, todėl net ir esant realiam pavojui, maisto produktai turi būti vartojami kasdien. Tačiau pasaulyje yra daugybė žmonių, kurie neturėdami pasirinkimo badauja. Tuo pačiu metu kituose kraštuose problemų sukelia maisto žaliavų perteklius. Vis dėlto su maistu gaunama energija yra pasaulį varanti jėga. Tad siekiant kuo labiau sumažinti galimus pavojus organizmui yra svarbu kuo daugiau išsiaiškinti ir suprasti apie maiste esančius patogenus.

Jau 460-aisiais metais prieš Kristų Hipokratas pastebėjo stiprų ryšį tarp žmonių vartojamo maisto ir juos užklumpančių ligų. Vėliau buvo suprasta, kad „maisto kilmės“ ligos pasireiškia tada, kai į žmogaus organizmą su maistu patenka patogenas ir apsigyvena šeimininko kūne, kuriame paprastai pasidaugina, arba, kai toksigeninis patogenas, esantis maisto produkte pagamina toksinus, kurie vartojant produktą patenka į žmogaus organizmą. Todėl ligos, kylančios pavartojus maisto, paprastai skirstomos į maisto kilmės infekcijas ir intoksikacijas (arba, kitaip, apsinuodijimus). Infekcijos atveju, užtrunka žymiai daugiau laiko, kol pasirodo pirmieji ligos simptomai, nei esant intoksikacijai, kadangi dažniausiai nemažai tam reikšmės turi inkubacinis periodas [1].

Tiek besivystančiose, tiek išsivysčiusiose šalyse problemų sukelia maisto infekcinių ligų ir apsinuodijimų protrūkiai, kurie kelia nemenką iššūkį sveikatos sistemoms bei kenkia šalių ekonomikoms. Infekcinės ligos protrūkiu laikomas dviejų ar daugiau panašios infekcijos atvejų pasireiškimas dėl vartoto to paties maisto produkto ar patiekalo [1]. Kartais visuomenės akirtyje pasirodo žinių apie vieno ar kito infekcinio susirgimo protrūkį, o tai nemenkai verčia sunerinti didesnę vietos visuomenės dalį. Vienas tokių atvejų buvo atsitikęs Indijoje, vakarinėje Maharaštros valstijos dalyje, kurioje apsinuodijimo simptomus pajautė 291 religiniame masiniame susibūrimo dalyvavęs žmogus. Nustatyta, kad inkubacinis protrūkio periodas buvo nuo 10 iki 40 valandų ir dažniausi infekcijos požymiai buvo viduriavimas, pilvo spazmai, aukšta temperatūra, šaltkrėtis bei vėmimas. Šie simptomai tyrėjams leido manyti, kad tokį apsinuodijimą galėjo sukelti enteropatogeniniai organizmai, greičiausiai, *Escherichia coli* arba *Salmonella* spp [2]. Didžiosios Britanijos šiaurės rytuose po vykusio maisto festivalio 2013 metais kovo mėnesį buvo identifikuoti 413 (vėliau iš viso nustatyti 592) virškinamojo trakto negalavimai, pasireiškę sunkiu viduriavimu bei pilvo skausmais. Šio protrūkio tyrėjų atliktas daugiakompleksinis PGR (polimerazės grandininės reakcijos, angl. *polymerase chain reaction, PCR*) tyrimas patvirtino, kad daugelis viduriavimo atvejų susiję su įvairių rūšių patogenais (šiuo atveju nustatytos *Salmonella*, *Shigella* rūšys ir Shiga toksiną produkuojančios *E. coli*), nors istoriškai tokie protrūkiai buvo siejami su tam tikro vieno patogeno padermėmis, turinčiomis panašias, jei ne identiškąs fenotipines ir genotipines charakteristikas [3].

Skaičiuojama, kad patogenai ir jų toksinai gali sukelti daugiau nei 250 įvairių su maistu susijusių ligų [4]. Pasaulio Sveikatos Organizacijos internetiniame puslapyje skelbiama, kad kasmet apie 600 mln. žmonių (maždaug 1 iš 10 pasaulio gyventojų) susergera patekus į jų organizmus užkrėstam maistui, o 420 tūkstančių atvejų baigiasi mirtimi [5]. O vieną iš saugiausių, kaip teigiama, maisto tiekimą pasaulyje turinčių Jungtinių Amerikos Valstijų federalinė valdžia, FDA (angl. *The Food and Drug Administration*, Maisto ir Vaistų Administracijos) internetinėje svetainėje nurodo, kad kasmet valstijose užsikrečia maždaug 48 mln. gyventojų (1 iš 6 amerikiečių). Tai sukelia 128 tūkst.

hospitalizacijų ir apie 3000 mirčių [6]. Tokia statistika yra gana abstrakti, ypač vertinant tai, kad maisto patogenų sukeltos ligos gali turėti tiek lengvų, tiek labai rimtų indikacijų. Kai infekcija tampa nuolatinė, ją sukeliančio maisto kilmės patogeno buvimą organizme galima sieti net su kardiitu (širdies raumens uždegimu) ar kitais širdies pažeidimais. Tipiniu atveju, pacientai, turintys širdies pažeidimus, atsiradusius prasidėjus bakterinei infekcijai, iš pradžių susiduria su klasikiniiais infekcinės ligos simptomais (aukšta temperatūra, pykinimu, spazmais, viduriavimu ir kt.). Reikia paminėti, kad infekcija gali turėti esminės įtakos ir visai organizmo sistemai. Atrodytų, paprasta bakterinė infekcija gali sukelti tokias antrines komplikacijas, kaip meningoencefalitas (galvos smegenų uždegimas), endoftalmitas (vidinių akies dangalų uždegimas), osteomielitas (kaulo ir kaulo čiulpų uždegimas), smegenų abscesas (lokalus pūlingas darinys), Guillain-Barré sindromas (ūminė uždegiminė nervų liga, polineuropatija) ir peritonitas (pilvaplėvės ar jos dalies uždegimas). Bet nėra tiksliai žinoma ar gausenės klinikinių atvejų pranešimų apie kardiitą, siejamą su maisto patogenais, skaičius yra dėl padidėjusio supratimo apie šią būklę, ar dėl virulentinių patogenų pagausėjimo [7].

Maisto tiekimo grandinė yra labai sudėtinga dėl maisto kompozicijos ir gaminių apdorojimo skirtumų, o tai gali sąlygoti maisto patogenų atsiradimą ir net pakartotinį jų pasirodymą vienoje ar kitoje maisto tiekimo proceso dalyje. Vis dėlto, pranešama apie daugybę faktorių, susijusių su infekcinių ligų atvejų pagausėjimu. Tai siejama su mitybos įpročių ir vartotojų prioritetų pokyčiais, didesniu tarptautinių kelionių skaičiumi, maisto apdorojimo, gamybos bei platinimo pasikeitimais, agrokultūros ir gyvulininkystės sričių pokyčiais, klimato kaita. Beje, patogenų nustatymo metodų bei molekulinė technologijų pažanga padidina naujai atsirandančių patogenų atpažinimo galimybes. Įtakos turi ir mikroorganizmų virulentiškumo faktorių įgijimas, atsparumas antimikrobiniais vaistams bei patogenų adaptacija esant naujoms sąlygoms. Taip pat įtaką tam daro neadekvatūs sanitarijos ir vektorinės kontrolės (metodų, skirtų apriboti ar sunaikinti ligas sukeliančių patogenų nešiotojus) matavimai, netinkamos visuomenės sveikatos priežiūros paslaugos ir nepakankamas visuomenės informavimas [8, 9].

Patogenų gebėjimas prisitaikyti ir išgyventi esant stresinei aplinkai maisto apdorojimo metu ar šeimininko virškinamajame trakte, kaip minėta, gali didinti nustatomą infekcinių ligų skaičių. Taigi, maisto kilmės patogenai susiduria su didele įvairove šeimininko organizmo gynybos mechanizmų, kuriuos įveikę gali sukelti infekciją. Šeimininko organizme tokie biocheminiai ir fiziniai faktoriai, kaip bakteriolitiniai fermentai, rūgštinis pH, tulžis, „vietinė“ mikroflora, antimikrobiniai peptidai bei įgimtas ir adaptyvusis imuninis atsakas, yra esminiai veiksniai eliminuojant patogenus. Tai yra taip pat ir seilės bei skrandžio rūgštys, peristaltika, žarnyno gleivinės ir enterocitų (žarnų epitelio ląstelių, angl. *intestinal epithelial cell*, IEC) formuojamas barjeras, bei skirtingo lygio imuninis atsakas, kylantis iš šeimininko su žarnynu susijusio limfinio audinio (angl. *gut-associated lymphoid tissue*, GALT). Vis dėlto, pavyzdžiui, agresyvios maisto apdorojimo ar konservavimo priemonės gali išprovokuoti bakterijų „susidorojimo“ mechanizmus, kurie paskatintų specifinę ar plačią genų ekspresiją, o jos rezultatas galėtų būti išsivystęs atsparumas baktericidiniams pažeidimams. Tokie genų ekspresijos pokyčiai toliau gali sąlygoti pasikeitimus bakterijų adhezijos, kolonizavimo, invazijos ir toksinų gamybos procesuose, kurie paskatintų patogenų virulentiškumą organizmo užkrėtimo metu [10, 11].

Žmogaus organizme infekciją sukeliančiais patogenais gali būti gramneigiamos bei gramteigiamos bakterijos, virusai ar net maiste esantys parazitai, o šie patogenai dažniausiai yra zoonotinės (zoonozė – patogeno sukelta infekcija, perduota gyvūno žmogui) kilmės [9]. Jungtinių Amerikos Valstijų FDA duomenimis, maisto kilmės patogenai gali būti kategorizuojami pagal specifines vartojamo maisto

grupės. Pavyzdžiui, labiausiai siejama su žalia ar neiškepusia vištiena *Campylobacter* sp. yra dažniausia infekcinių ligų priežastis Jungtinių Amerikos Valstijų maisto tiekime, dėl to suserga daugiau nei du milijonai žmonių kiekvienais metais. O daugiausiai mėsoje, vištienoje ir kiaušiniuose randama *Salmonella* sukelia daugiau nei milijoną kasmet fiksuojamų apsinuodijimo atvejų [12]. Europos Sąjungoje EFSA (angl. *European Food Safety Authority*, Europos maisto saugos tarnybos) paskelbtais duomenimis, didžiausią infekcijų protrūkių skaičių 2015 metais sukėlė bakterijos (33,7 % visų atvejų), nors paskui keletą metų buvo stebimas mažėjantis šių mikroorganizmų kiekis. Bakteriniai toksinai buvo antri tarp vertintų infekcijas nulemiančių veiksnių (19,5 % visų atvejų). Virusai sukėlė 9,2 % visų protrūkių atvejų, nors ankstesniais metais (2014 m.) tai buvo dažniausios infekcijų priežastys. Parazitai ir kiti užsikrėtimus sukeliantys veiksniai, ypač histaminas, buvo užfiksuoti mažiau nei 3 % visų protrūkių. Tačiau maždaug trečdaliu (34 %) visų tais metais fiksuotų atvejų infekcijų šaltiniai nebuvo identifikuoti. Beje, EFSA išskyrė ir maisto produktus, kuriuose užkrato nešiklių buvo daugiausiai. Tai didžiąja dalimi buvo gyvūninės kilmės produktai, ypač kiaušiniai, jų produktai bei kiauliena (po 10 %). Taip pat nemažai patogenų turėjo broilerių mėsa (9 %), sūris (8 %), žuvis ir jos produktai (7 %), pienas ir pieno produktai (5 %), jautiena (4 %) ir vėžiagyviai (3 %) [1].

**1.1 lentelė.** Daugiausiai susirgimų sukeliantys patogenai (JAV *Center for Disease Control* informacija) [12].

Patogenai	Susirgimų skaičius	%
<i>Norovirus</i>	5,461,731	58
<i>Salmonella</i>	1,027,561	11
<i>Clostridium perfringens</i>	965,958	10
<i>Campylobacter</i> spp.	845,024	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	241,148	3
Suma		91

## 1.2. Patogeninės bakterijos

Bakterijos yra dažniausiai pasitaikantys infekcines ligas sukeliantys veiksniai ir egzistuoja įvairiomis formomis bei skirtingais tipais. Pavyzdžiui, Jungtinėse Amerikos Valstijose įvertinus etiologiją (ligų atsiradimo priežastis ir sąlygas) 1993–1997 metų laikotarpiu nustatyta, kad bakterijos sukėlė 75 % visų vykusių protrūkių ir identifikuotos 86 % nustatytų atvejų. Be to, tarp įvardinto 31 patogeno, sukėlusio infekcines ligas, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* ir *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> buvo inkriminuotos dėl didžiosios dalies susirgimų, hospitalizavimų ir mirčių. Žmogaus organizmui galinčios pakenkti bakterijos taip pat turi įvairių savybių. Kai kurios iš jų geba suformuoti sporas ir dėl to yra atsparios karščiui (lot. *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ir kt.). Dauguma šių patogenų yra mezofiliniai, kurių augimui optimali temperatūra svyruoja nuo 20 iki 45 °C, tačiau yra ir tokių, kurie sugeba daugintis ir esant šaldymo sąlygoms ar net žemesnėms nei 10 °C temperatūroms (pavyzdžiui, tokios psichrotrofinės bakterijos, kaip *L. monocytogenes* ir *Yersinia enterocolitica*) [1, 13]. Sekančiuose skyreliuose pateikiama detalesnė informacija apie konkrečių bakterijų savybes.

### 1.2.1. *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* ir *Clostridium botulinum*

*Clostridium* spp. priklauso *Bacillaceae* šeimai ir yra sporas formuojančios bakterijos, kurios gali būti ir obligatinės anaerobinės arba aerotolerantinės [1]. Ši gentis apima apie 150 metaboliškai skirtingų

gramteigiamų bakterijų rūšių, kurios plačiai išplitusios visur, daugiausiai bedeguonėje aplinkoje, kur yra organinių junginių (dirvožemyje, vandens nuosėdose, gyvūnų ir žmonių virškinimo traktuose ir pan.). Nors beveik visos *Clostridium* spp. padermės yra simbiotinės komensalistinės (sąveikaujančios su kita rūšimi, kai vienas iš organizmų gauna naudos iš kito, tačiau tai pastarajam nekenkia), bet yra ir oportunistinių, toksinus gaminančių patogenų [14].

Iš patogeninių klostridijų *C. difficile* išsiskiria tuo, kad ši rūšis kurį laiką buvo atpažįstama, kaip dažniausias patogenas hospitalinių ligų atvejais Europoje, sukeliantis viduriavimą ir pseudomembraninį kolitą. Beje, auga ir tyrėjų susidomėjimas *C. difficile* gebėjimu išvengti antibiotikų biocidinio (žudančio) poveikio [14].

*C. perfringens* yra gramteigiama lazdelės formos, sporas formuojanti, anaerobinė bakterija, stipriai susijusi su daugybe žmonių bei gyvūnų virškinimo sistemos ir mažakraujystės ligų. Kai aplinkoje plačiai paplitusios šios bakterijos sporos susiduria su šeimininku ir pereina į germinacijos (sudygimo), paskui ataugimo, ląstelių proliferacijos ir toksinų išskyrimo etapus, gali pasireikšti ankstyvieji dujinės gangrenos (klostridinės mionekrozės) simptomai [15]. *C. perfringens* yra nejudrios įkapsuliuotos ląstelės, kurių sporos atsparios tokiems aplinkos stresoriams, kaip radiacija, išdžiūvimas ir karštis. Vegetatyvinės bakterijų ląstelės auga 6–50 °C temperatūrų intervale, o optimalios sąlygos joms yra 43–47 °C. Palankiausias pH joms yra 6,0–7,2, nors gali augti ir pH esant 5,0–9,0 [1].

*C. botulinum* yra viena iš botulino neurotoksiną produkuojančių bakterijų. Šie endopeptidazės toksinai laikomi viena iš nuodingiausių žinomų medžiagų ir yra priskirti biologinio pavojaus faktorių A kategorijai. Botulizmą, rimtą neuroparalitinę ir net kartais mirtiną ligą, pavojingą žmonėms ir gyvūnams, sukelti gali toksinai, kuriuos gamina būtent gramteigiamos, anaerobinės, sporas formuojančios *C. botulinum* bakterijos. Yra žinomi septyni botulino toksinų tipai (A–G), iš kurių A, B, E ir F sąlygoja iš esmės visus žinomus žmonių botulizmo atvejus. Paprastai su botulino toksinu siejami tokie maisto produktai, kaip konservuotos daržovės, tunas, sūdyta ir rūkyta žuvis, mėsos užkandžiai, vištiena ir jos kepenėlės. Vis dėlto grėsmingiausių šių toksinų galinčiu turėti maisto produktu įvardijamas medus. Juo neturėtų būti maitinami vaikai iki vienerių metų amžiaus [15, 1].

### 1.2.2. *Campylobacter jejuni*

*C. jejuni* yra viena iš dažniausiai nustatomų patogenų infekcijų JAV priežasčių. Su šia infekcija, sukeliančia Guillian-Barré sindromą ir reaktyvųjį artritą, siejami dideli žmogiškieji bei ekonominiai nuostoliai. Šiai gramneigiamai, spiralės formos bakterijai natūraliu „rezervuaru“ yra tapę laukiniai paukščiai, kurių žarnynas suteikia tinkamą biologinę nišą *C. jejuni* ištvirtinti ir plisti. Žmonių kampilobakteriozei atsirasti svarbiausi rizikos faktoriai yra netinkamai apdorota šviežia arba nepakankamai iškepta paukštiena. Nauji atradimai dešifruojant molekulinis *C. jejuni* virulentiškumo mechanizmus atskleidė, kad tai yra unikalus patogenas, galintis nutraukti N glikozidinius ryšius daugiau nei trisdešimtyje baltymų, susijusių su kolonizacija, adhezija (sukibimu) ir invazija [16, 17].

### 1.2.3. *Salmonella* spp.

Bene daugiausiai žarnyno infekcijų pasaulyje sukelia gramneigiamos *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos. Šeimai priklausanti *Salmonella* gentis yra paprastai dalijama į dvi rūšis, kurios gali sukelti ligas žmogaus organizme: *S. enterica* ir *S. bongori*. Toliau šios rūšys dar skirstomos į serotipus (pagal Kaufmann-White schemą, 1934 m.), diferencijuojančius *Salmonella* padermes pagal jų paviršius ir jų žiuželių antigenines savybes [1]. *Salmonella* spp. siejama su plačia įvairove maisto produktų ir yra

viena iš dažniausių patogeninių bakterijų. Pagrindiniai užkrato šaltiniai yra paukštiena ir jos gaminiai, pieno produktai, mėsa ir jos produktai. Rimtu iššūkiu sveikatos sistemoms tapo tai, kad *Salmonella* gali patekti į maisto grandinę bet kuriame etape: su grūdais, ūkyje, šeriant gyvulius, maisto gamybos procesuose ir net mažmeninėje prekyboje. Todėl žmonija neretai susiduria su salmonelioze, zoonotine infekcija, sukelta *Salmonella* spp. bakterijų, konkrečiau, *S. enteritidis* ir *S. typhimurium*. Bakterijų aktyvumas maisto produktuose priklauso nuo įvairių aplinkos faktorių. Pavyzdžiui, augimui optimalus pH yra 4,0–9,0, tačiau skirtinguose serotipuose gali nemažai varijuoti ir minimali augimo pH vertė būti ir 4,05, ir 5,5. Joms augti palanki temperatūra gali kisti nuo 5,3 °C iki maždaug 45 °C [18, 19].

#### 1.2.4. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* yra vienas iš labiausiai paplitusių bakterinių žmogaus patogenų, galintis sukelti hospitalinę infekciją ir užkrėtimą už ligoninės ribų. Iššūkių kelia atsparios vaistams padermės, kaip MRSA (angl. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). Ši bakterija gali būti komensalistinė (ji yra kolonizavusi maždaug 30 % žmonių populiacijos), bet gali būti ir žmogaus patogenas (sukelia bakteremiją, endokarditą ir kitas infekcijas). *S. aureus* randama ir aplinkoje, ir normalioje žmogaus floroje ant odos ir gleivinės membranų, tačiau ant sveikų individų paprastai infekcijos nesukelia. Patekusi į kraujo sistemą ir vidinius žmogaus audinius bakterija gali sukelti gana rimtas infekcijas. Žmogaus organizmui gali tekti susidurti su folikulitu, celiulitu, nuplikytos odos sindromu ir net tokiomis būklėmis, kaip meningitas, gastroenteritas, toksinio šoko sindromas ar šlapimo takų infekcijos. *Staphylococcus aureus* yra gramteigiamas kokas (apvalios globulės formos bakterija), linkęs susitelkti į „vynuogių kekės“ klasterius. Šie mikroorganizmai auga 18–40 °C (kai kurios padermės – 7–47,8 °C) temperatūrose, aerobinėmis ir fakultatyviai anaerobinėmis sąlygomis. Enterotoksinus produkuoja 10–46 °C temperatūrų intervale, nors gyvena 37 °C optimaliomis sąlygomis. Šios bakterijos formuoja auksinės arba geltonos spalvos kolonijas. Jų dauginimuisi palankus 4,5–9,3 pH (optimalus – nuo 7,0 iki 7,5) ir toleruoja *Staphylococcus aureus* didelius kiekius druskos (>10 % natrio chlorido) [1, 20, 21].

#### 1.2.5. *Escherichia coli*

Net jeigu *Escherichia coli* virškinamajame trakte gali reziduoti nesukeldama didesnės žalos, tačiau ši bakterija gali turėti patogeninių gebėjimų, pasireiškiančių žmogaus organizme viduriavimu, kitų organų sistemų ligomis. *E. coli* bakterija viena iš pirmųjų kolonizuoja kūdikių organizmus ir įsikuria juose visam gyvenimui, kaip normali žmogaus žarnyno mikrobiota. Ne patogeninės formos *E. coli* padermės suteikia šeimininko organizmui ir naudingų medžiagų (pavyzdžiui, vitaminus K ir B<sub>12</sub>). Patogeniniai *E. coli* variantai pasaulyje sukelia nemažai ligų ir mirčių. Todėl *E. coli* bakterijos, esančios maiste, aplinkoje ir žmogaus organizme, yra plačiai tyrinėjamos. Tai yra gramneigiama lazdelės formos bakterija, taip pat priklausanti *Enterobacteriaceae* šeimai. *E. coli* sugeba augti aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis, ypač esant 37 °C temperatūrai. Bakterija gali būti tiek nejudri, tiek judri su peritrichiniais (išsidėsčiusiais visame ląstelės paviršiuje) žiuželiais. Žarnyno *E. coli* infekcijos tradiciškai yra suskirstytos į 6 patotipus, atsižvelgiant į jų patogeniškumo profilius (virulentiškumo faktorius, klinikinių susirgimų ir filogenetinius profilius): enteropatogeninė *E. coli* (EPEC), enterohemoraginė (EHEC, kuriai priklauso ir taip pat gerai žinoma Shiga toksiną produkuojanti *E. coli* (STEC), kurios serotipas O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>), enteroinvazinė (EIEC, potipiui priklauso ir

*Shigella* sp.), enteroagregatyvinė (EAEC), enterotoksigeninė (ETEC) bei difuziškai adherentinė *E. coli* (DAEC) [1, 22, 23, 24, 25, 26,].

### 1.2.6. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* sugeba gyventi ir vystytis skirtingose aplinkose, taip pat ir gyvūnų virškinimo traktuose [27]. *Bacillus* genties bakterijos plačiai naudojamos pramonėje, žemdirbystėje ir medicinoje, kadangi daugybė funkcinų *Bacillus* padermių naudojamos pramoninių fermentų, bioinsekticidų, antibiotikų ir kitų produktų gamyboje. *B. subtilis* yra viena iš svarbiausių funkcinų padermių [28]. Nepaisant to, *Bacillus* genties rūšys jau seniai maisto gamintojams kėlė sunkumų dėl jų endosporų atsparumo. Tam tikros endosporos yra atsparios karščiui, dezinfekavimui, išdžiūvimui, radiacijai, o jų adhezinės savybės padeda joms prisirišti prie gamybos įrangos paviršių ir sąlygoja atsparumą valymo procedūroms. Dėl to šie mikroorganizmai dažnai tampa rūpestį keliančiais klinikų aplinkos, biotechnologinių procesų ir maisto gamybos teršalais. Tokiu būdu džiovinti produktai (prieskoniai, sausi pusryčiai, pieno milteliai ir pan.) dažnai stipriai užkrečiami sporomis. Kai maisto ruošimo metu susiliečia su vandeniu, tokios sporos gali sudygti, o tai gali tapti maisto produkto sugedimo ar, galiausiai, apsinuodijimo priežastimi [29]. Beje, yra atlikta tyrimų, kurių metu nustatyta, jog *B. subtilis* yra viena iš bakterijų, galinčių produkuoti surfaktiną. Tai yra mažinantis paviršiaus įtempimą surfaktantas, naudojamas kaip antibiotikas, tačiau turi nespecifinį citotoksiškumą. Taip pat ši bakterija gali gaminti ir jonoforinį (jonus nešantį) toksišką bei karščiui atsparų peptidą amiloziną [30].

### 1.3. Virusai

Praėjusiame amžiuje bakteriniai patogenai sukėlė didžiąją dalį infekcinių susirgimų ir apsinuodijimų. Vis dėlto, su gerėjančiomis diagnostinėmis technologijomis ir tobulėjančia tiriamąja epidemiologija, dabar jau žinoma, kad kai kurie žarnyno virusai taip pat stipriai prisideda prie minėtų susirgimų [31]. Maisto ir aplinkos virusologija yra santykinai jauna mokslinė disciplina ir dėl to dar prieš keletą metų buvo mažai su virusų buvimu ir plitimu skirtingose maisto matricose susijusių publikacijų. Beje, trūko ir palyginamųjų žinių apie virusų bei kitų infekcinių ligų pernešimo būdus ir galimus veikimo kelius [32]. Pastaraisiais metais pagerėjo supratimas apie maisto apsinuodijimus ir, bendrai, apie maisto saugą, todėl atsirado ir daugiau informacijos (bei jos didesnis poreikis) apie tokias būkles, kaip virusinis gastroenteritas [33]. Žinoma, šiuo metu daugiausiai dėmesio skiriama konkrečiai koronaviruso (SARS-CoV-2) pandemijos suvaldymo klausimams spręsti, bet tuo pačiu tikėtina, kad ir kitų virusų, taip pat maisto kilmės, plitimo ir veikimo mechanizmai ateinančiais metais sulauks nemenko pasaulio mokslininkų dėmesio.

Plati įvairovė skirtingų virusų gali sukelti apsinuodijimus maistu ar infekcijas, kurių simptomų gausa gali varijuoti nuo švelnių ir stiprių susirgimų, iki chroniškų, sekinančių ligų ar net mirties. Dėl būdingų virusų ir bakterijų skirtumų, pavyzdžiui, fakto, kad, priešingai bakterijoms, virusai neatlieka replikacijos maiste (taigi, nesidaugina ir neprodukuoja toksinų), virusus dažnu atveju yra sudėtinga aptikti. Tai, tikėtina, reiškia, kad maisto produktai tiesiog yra virusų nešikliai [33, 32]. Taip vadinami „maisto kilmės“ virusai gali būti perduodami su užterštu maistu, taip pat ir kombinuotai kartu su žmogus–žmogui kontaktu ar su aplinkos užterštumu, pavyzdžiui, per vandenį. Tokie virusai, infekuojantys virškinamojo trakto dalis, yra žmogaus adenovirusas (angliška santrumpa, čia ir toliau: *HAdV*), žmogaus astrovirusas (*HAsV*), norovirusas (*NoV*), žmogaus rotavirusas (*HRV*). Hepatito A ir E virusai (atitinkamai, *HAV* ir *HEV*) per epitelį patenka į organizmo kraujotaką, per kurią nukeliauja į kepenų hepatocitus ir makrofagus [31]. Taip pat yra duomenų, kad su maistu gali būti perduodami

sapovirusai, parvovirusai, koronavirusai, enterovirusai, Aichi virusai ir kiti. Dauguma šių virusų yra labai maži, turintys viengrandę RNR (angl. *positive-sense single-stranded RNA*), yra stabilūs už šeimininko organizmo ribų ir dėl to lieka infektyvūs aplinkoje ar ant maisto paviršiaus. Kad būtų sukelta infekcija paprastai reikia labai nedidelio kiekio viruso dalelių (10–100). Beje, dauguma jų neturi lipidinio apvalkalo, tačiau yra išimčių. Pavyzdžiui, dvigrandžiai RNR (angl. *double-stranded RNA*) rotavirusai ir koronavirusai, kurie turi apvalkalus, bei adenovirusai ir parvovirusai, kurie yra DNR virusai [32]. Užkrėsti žmonės galintys virusai grupuojami į daugiau nei 20 šeimų, o būtent užkratą skleidžiantys su maistu, manoma, priklauso mažiausiai dešimčiai iš jų. Daugiausiai virusams patogias sąlygas plisti sudaro higienos trūkumas maisto gamybos procesų metu ar juos atliekančių žmonių aplaidumas, neprofesionalumas. Retesniais atvejais užsikrėsti galima vartojant gyvūninius maisto produktus, kuriuose reziduoja zoonotiniai virusai [34, 35].

Praktikoje dažniausiai fiksuojamos virusinės maisto kilmės ligos yra gastroenteritas ir hepatitas, kurias atitinkamai sukelia žmogaus norovirusas ir hepatito A virusas. Virusinio gastroenterito simptomai apima pykinimą, vėmimą, pilvo skausmus ir kartais aukštą temperatūrą bei galvos skausmą. Dėl bakterinio gastroenterito išsivysto sunkiausias būklės, tačiau būtent virusai kaip *NoV*, lemia didžiausius susirgimų skaičius. Tuo metu hepatitas gali pasireikšti rimtu nusilpimu, atsirandančiu dėl aukštos temperatūros, galvos skausmo, pykinimo ir negalavimų iki vėmimo, viduriavimo, pilvo skausmo ir geltos. Pasaulyje *HAV* sukelia apie 50 % visų hepatito atvejų ir gali apriboti pacientų veiksnumą keletui mėnesių ar net išsivystyti iki ūminių atvejų, kai gali prireikti kepenų transplantacijos arba tai gali pasibaigti mirtimi [36].

#### **1.4. Parazitai**

Nors po truputį vis labiau pripažįstama maisto kilmės parazitų svarba sukeliant infekcijas, bet palyginus su maisto bakteriniais ir virusiniais patogenais jiems skiriama nedaug dėmesio [37]. Parazitai yra vienaląsčiai organizmai su organizuotu branduoliu ir yra didesni už bakterijas. Kaip ir virusai, jie maisto produktuose nesidaugina, o patekę į šeimininko organizmą cistų forma, gauna iš jų apsaugą ir mitybą. Parazitai gali būti perduodami iš gyvūno žmogui, iš žmogaus žmogui ir iš žmogaus gyvūnui. Tokie organizmai gyvena ir dauginasi infekuoto gyvūno ar žmogaus audiniuose ar organuose ir dažnai išskiriami su išmatomis. Bene dažniausiai minimi, kaip daugiausiai užkrėtimų sukeliantys yra *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* ir *Trichinella spiralis* parazitai. Tačiau dėl sudėtingų jų gyvenimo ciklų, įvairių perdavimo kelių, ilgų periodų nuo infekavimo iki simptomų pasireiškimo, yra sudėtinga tinkamai įvertinti jų savybes. Europos maisto saugos tarnyba 2016 metais nustatė, pasiremama daugybiniais aspektais ir kriterijais, kuriems parazitams turėtų būti skiriamas didžiausias dėmesys. Tai yra *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Echinococcus granulosus* s.l., *Cryptosporidium* spp., kiti *Trichinella* spp., nors skirtinguose regionuose prioritetai gali skirtis. Pavyzdžiui, pastebėta, kad rytų (tarp jų ir Lietuvoje), pietryčių ir pietvakarių Europoje svarbiausi yra *Echinococcus granulosus* s.l. ir *Echinococcus multilocularis*, o vakarų Europoje – *Toxoplasma* ir *Cryptosporidium* parazitai. Beje, 2015 metais atliktų tyrimų duomenimis, Lietuvoje buvo nustatytas didžiausias iš Europos valstybių parazitinių infekcijų skaičius, po to rikiavosi Rumunija ir Bulgarija [1, 38].

#### **1.5. Grybelinės infekcijos**

Infekcinių susirgimų atveju grybų vaidmuo nėra labai plačiai aptariamasis. Yra žinoma maždaug 300 grybelių rūšių, sukeliančių ligas, kurios pasireiškia alerginėmis reakcijomis ir net gyvybei



pavojingomis invazinėmis infekcijomis. Daugybė grybų taip pat gali sintetinti pavojingus antrinius metabolitus. Pavyzdžiui, mikotoksinai gali stipriai užteršti kviečius, kukurūzus, ryžius ir daugybę kitų maisto žaliavų ar produktų. Nors keletas mikotoksinų pasekmių sveikatai literatūroje yra apibūdinta gana išsamiai (smarkus apnuodijimas, kepenų pažeidimai, nervinio vamzdelio defektai, net vėžys), tačiau mikotoksinų pasireiškimo poveikis globaliu mastu nėra žinomas. Beje, kai kurie maistą užkrečiantys ar jo gedimą skatinantys grybai yra žinomi patogenai (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium* ir mukormicetai). Įtariamos su maistu susijusių invazinių grybų infekcijos yra retos, tačiau pasitaiko tokių infekcijų protrūkių, kurių metu užkrėstieji patiria įprastus šioms infekcijoms negalavimus, kaip pykinimas, vėmimas ir viduriavimas. Pavyzdžiui, tokius simptomus pajuto vieno komercinio jogurto pirkėjai (daugiau nei 200 žmonių). Identifikuota, kad tokiuose užkrėstuose jogurtuose buvo *Mucor circinelloides* pelėsinių grybelių, kurie gali sukelti rimtą grybelinę infekciją mukormikozę, o sergamumas šia infekcija paskutiniu metu vis didėjo. Šis grybelinis patogenas daugiausiai problemų sukelia imuninės sistemos sutrikimų ar kitų susirgimų turintiems žmonėms, pavyzdžiui, sergantiems ŽIV, diabetu, neutropenija (sumažėjęs baltųjų kraujo ląstelių kiekis). Tokios infekcijos sukeltas mirtingumas gali siekti 68–100 %. Infekcija patenka į plaučius, sinusus, minkštuosius audinius, kraujotaką ir ant odos [39, 40].

## 1.6. Prevencinės priemonės prieš maisto patogenus

Maisto saugumo problemos šiuolaikiniame industrializuotame pasaulyje yra labai įvairios, ypač vertinant tas, kurios iškyla besivystančiose šalyse. Tradiciniai metodai naudojami šviežio maisto produkcijos rinkoje besivystančiose valstybėse, pavyzdžiui, Brazilijoje, kur dideli kiekiai paruošto iškart vartoti maisto (angl. *ready-to-eat*) yra parduodami gatvėse, gali sukelti biologinio, cheminio ir fizikinio užterštumo pavojų. O industrializuotose šalyse yra nustatytos normos maisto apdorojimui ir pakavimui [41]. Pavyzdžiui, Gerosios Gamybos Praktikos (angl. *Good Manufacturing Practices, GMP*) ir Pavojaus analizės kritiniai kontrolės taškai (angl. *Hazard Analysis Critical Control Points, HACCP*) padeda sumažinti maisto užterštumo kiekius. *HACCP* yra maisto saugumo užtikrinimo metodas, paremtas tinkamų higienos praktikų pritaikymu. Sistema identifikuoja bet kokias papildomas ar specifiskesnes kontrolės priemones reikalingas maisto gamybos operacijoms, pabrėžia reikiamas vietas (taškus), kuriose reikia stipresnės higienos priežiūros, numato koreguojamuosius veiksmus jei kontroliavimo rezultatai nurodo kontrolės praradimą ir, galiausiai, suteikia daugiau apmokymų bei atsakomybių gamybos operatoriams [13]. Paprastai išsivysčiusių valstybių maisto gamintojai ir apdorotojai vykdo rekomenduojamąsias maisto saugos praktikas ir laikosi reguliacinių maisto standartų, tačiau jų įsipareigojimų laipsnis, laikantis saugaus maisto kultūros, skiriasi priklausomai nuo kompanijų politikos [42].

Konkretūs maisto produktų gamintojai ar žaliavų tiekėjai turi savo nuostatas, atitinkančias bendruosius reikalavimus, siekiant užtikrinti savo produkcijos kokybę ir saugumą. Pavyzdžiui, plačiai žinomos bendrosios priemonės efektyviai mažinančios užkrato riziką gyvulių ūkiuose bei apdirbimo įmonėse, kurias privaloma įdiegti yra: 1) stiprinti higienos priemones ir atskirti sergančius gyvulius nuo sveikųjų, 2) kadangi dauguma enteropatogenų yra sunaikinama vėsinant, būtina tai veiksmingiau kontroliuoti po skerdimo, 3) reikia vengti kryžminės kontaminacijos (užkrėtimo), 4) imtis prevencinių matavimų tikrinant patogenų paplitimą ūkiuose ir apdirbimo aplinkose, 5) protingai naudoti antibiotikus gydant gyvulių ligas, 6) maisto apdirbime ir saugojime pritaikyti apsauginius barjerus, 7) tinkamai apdoroti maisto produktus, 8) vengti vartoti šviežius neapdorotus gyvulinius produktus [43].

Pastaruoju metu keletas metodų yra naudojami pramonės maisto saugumo programoms įvertinti. Vienas iš jų apima infekcinių susirgimų stebėjimą populiacijoje, pirmiausiai, iš identifikuojamų ir pranešamų klinikinių atvejų. Beje, produktų testavimai pasiremiant moksliniais duomenimis bei mikrobiologiniais standartais yra įdiegiami laikantis prielaidos, kad jeigu neatitinkanti nustatytų reikalavimų produkcija yra pašalinama iš rinkos, tai infekcijų protrūkių skaičius turėtų sumažėti [42]. Kadangi pramonė ir verslas vis labiau remiasi mokslininkų skelbiamais duomenimis, tai ir mokslo bendruomenė vis aktyviau dirba ties pasiūlymais kaip sustiprinti maisto kokybę ir saugumą. Pavyzdžiui, atliekama nemažai tyrimų, siekiant kuo plačiau išnagrinėti bakteriocinų ar kitų natūralių konservantų (vaistažolių ekstraktų, eterinių aliejų ir pan.) savybes ir galimybes panaudoti juos kaip alternatyvias priemones stabdančias patogeninių ar maisto gedimą spartinančių mikroorganizmų augimą. Geras tokių tyrimų pavyzdys yra eterinių aliejų ir lizuojančių fermentų pritaikymas *L. monocytogenes* bioplėvelės susiformavimo prevencijai maisto gamybos įmonėse [8]. Beje, paviršių, kuriuos gamyklose yra užėmusios biologinės plėvelės, sanitarijos palaikymas yra sudėtinga užduotis, kadangi bioplėvelės sudarančios ląstelės yra antimikrobiškai labai atsparios. Tokių nepageidaujamų plėvelių kontrolei pastaraisiais metais buvo pasiūlyti alternatyvūs metodai naudojant bakteriofagus, fermentus ar kitas perspektyvas [44]. Vykdomi ir tokie tyrimai, kurie, autorių teigimu, galėtų būti naudingi numatant nelinijines maiste esančių mikroorganizmų išgyvenamumo kreives. Pavyzdžiui, buvo nagrinėjama *E. coli*, *Listeria innocua* ir *S. aureus* inaktyvacijos kinetika juodose tigrinėse krevetėse, pritaikant skirtingas slėgio ir temperatūros kombinacijas. Nustatyta, kad *S. aureus* buvo pati atspariausia slėgio pokyčiams bakterija iš tirtų rūšių [8].

### **1.6.1. Radiacijos technologijos maisto pramonėje**

Per amžius technologijos, kaip ilgiau išsaugoti šviežius ir saugius maisto produktus, tobulėjo spartėjant mokslo pažangai. Tradiciniai metodai (šaldymas, džiovinimas, konservavimas, rauginimas, pasterizacija, fermentacija, vėsinimas, laikymas kontroliuojamose sąlygose, konservantų naudojimas ir t.t.) ne tik pailgino produktų tinkamumo vartoti laiką, bet ir stabdė galimų nepageidaujamų mikroorganizmų atsiradimą bei vystymąsi. Paprastai maistui išsaugoti sunaikinant vegetatyvinius mikroorganizmus taikomi terminiai procesai. Bet vien tik terminis apdorojimas sužadina nepageidaujamas biochemines reakcijas, dėl kurių pakinta juslinės savybės ir maistinė vertė. Todėl, palyginti, tokios naujos technologijos, kaip radiacijos procesai, yra vis labiau pritaikomos pramonėje. Jonizuojančioji radiacija jau kurį laiką plačiai naudojama pramoniniuose procesuose, ypač sterilizuoti farmacijos ir kosmetikos produktus ar apdoroti maistą. Nejonizuojančioji – paviršiams nukenksminti pakavimo sektoriuje. Šių technologijų poveikis maisto produktams (jų maistinei vertei bei cheminei kompozicijai) priklauso nuo apšvitinimo dozės ir tokių faktorių, kaip temperatūra ir deguonies buvimas ar nebuvimas radiacija veikiamoje aplinkoje [45].

Manoma, kad maisto švitinimas yra bene geriausiai išstudijuota maisto technologija. Daugiau nei 60 metų gerai dokumentuotų tyrimų šia tema ir kitų analitinių metodų tobulėjimas atvedė prie šiuo metu gana plataus radiacijos technologijos pritaikymo [46]. Maisto apšvita patvirtinta maždaug 60 pasaulio šalių ir saikingas naudojimas ribojamas daugiausiai Azijoje ir Šiaurės Amerikoje. Kinijoje daugiausiai švitinami prieskoniai, vaisiai, dehidratuotos daržovės (70 % visų Azijos apšvitinamų kiekių). Japonija taiko šią technologiją tik bulvėms. O tokios Europos šalys, kaip Belgija, Vokietija, Prancūzija, Ispanija, Estija ir kitos, leidžia vartoti apšvitintą maistą, tačiau augaliniai taip apdoroti produktai šiose šalyse neužima daugiau nei 20 % viso švitinamo maisto. Jungtinėse Amerikos Valstijose daugiausiai tokiu būdu apdorojamas augalinis maistas yra prieskoniai [47]. Maisto apšvitos

metu produktai tam tikrą laiką yra veikiami jonizuojančia energija (gama ir rentgeno spinduliais, elektronų pluoštu). Poveikio intensyvumas ir trukmė priklauso nuo tikslo: paskatinti pelėsių ir patogeninių bei sporuliuojančių bakterijų inaktyvaciją, apsaugoti daržoves nuo ūglių formavimo, kontroliuoti infestaciją (apsikrėtimą zooparazitais) ar atidėti vaisių subrendimo laiką [48]. Pagal *Codex Alimentarius* (arba „maisto kodeksą“, tarptautiniu mastu pripažintų standartų bei rekomendacijų rinkinį, reglamentuojantį maisto saugą ir gamybą bei kitas su maistu susijusias sritis [49]) rekomenduojama maksimali radiacijos dozė (10 kGy (Grėjus, SI sistemos jonizuojančio spinduliavimo sugertosios dozės išvestinis vienetas)) pakelia produkto temperatūrą per mažiau nei 2,4 °C, o tai nepakeičia temperatūrai jautrių maisto produktų išvaizdos ar tekstūros. Tačiau ne visi produktai atlaiko apšvitinimo dozes, kurių reikia pasiekti norimos naudos be kokybės praradimo, o esant didesnei dozei nei rekomenduojama produktuose pasireiškia oksidacinis stresas [50]. Pavyzdžiui, norint pasiekti komercinį sterilumą, reikalingos stiprios švitinimo dozės (ne mažiau 42 kGy), o dėl to gali pradėti formuotis laisvieji radikalai. Toks poveikis gali būti sumažintas apšvitinant užšaldytą maisto produktą. Taigi, tokiu atveju patartina švitinimą kombinuotai atlikti kartu su kitu procesu, pavyzdžiui, pasterizacija, taip sumažinant reikalingos apšvitos kiekį bei proceso kaštus [51]. Vis dėlto, nepaisant fakto, kad šį metodą įvairios tarnybos pripažino saugiu, menka komunikacija tarp maisto gamintojų ar mokslininkų ir visuomenės bei žinių stoka apie šią technologiją kelia sumaištį bei skatina priešiškas nuomones apie švitinamą maistą. Mažai kas iš visuomenės narių tiki, kad švitinimo paveiktas maistas nebus radioaktyvus, nors šio proceso metu, kaip daugelis mokslininkų teigia, maistas juda per energijos lauką ir nepaliečia jo energijos šaltinio [48].

Beje, švitinimas gama spinduliais paremtas radioaktyvių šaltinių naudojimu (pavyzdžiui, kobaltu-60 ir ceziumu-137). Tuo metu elektronų pluošto ir rentgeno spindulių apšvitos technologijoms reikalinga energija generuojama iš komercinės elektros, o ją gamina vadinamieji „linijiniai akceleratoriai“ [52].



**1.1 pav.** „Radura“ simbolis, kuriuo žymimi jonizuojančia spinduliuote apšvitinti maisto produktai [76].

Dar viena neterminė technologija, gana plačiai paplitusi maisto saugos srityje, yra ultravioletinė (UV) šviesa. Tai – nejonizuojančiosios radiacijos pritaikymo pavyzdys. Šis maisto apdorojimo būdas pateikia vartotojams minimaliai apdirbtą, mikrobiologiškai saugų ir šviežio gaminio įvaizdį turintį produktą. Jau kurį laiką UV šviesos pritaikymas dažniausiai minimas trijose su maisto pramone susijusiose kategorijose: 1) mikroorganizmų inhibicija (slopinimas) ant paviršių, 2) mikroorganizmų sunaikinimas ore, 3) skysčių sterilizavimas. Visų pirma, pritaikius UV švitinimą pastebėta, kad apšvitinus pasterizuotą pieną, jame padidėja vitamino D<sub>3</sub> koncentracija per 7-dehidrocholesterolio konversiją į cholekalciferolį. Be to, nors didžiąja dalimi mokslinėje literatūroje kalbama apie skysčių apšvitinimą UV šviesa, tačiau yra prietaisų, su kuriais šią technologiją galima pritaikyti ir kieto maisto paviršiams. Yra UV šviesos reaktorių, skirtų skysčiams, kurie paremti tėkmės tipais ir yra projektuojami UV šviesos kabinetai arba tuneliai, kuriuose būtų galimybė apšvitinti kietus produktus [53, 54, 45].

## 1.6.2. Patogenų aptikimo metodai

Nuolatinė maisto patogenų stebėseną ir rizikos faktorių identifikavimas yra būtini, kad užtikrintų maisto saugumą [55]. Iš gausybės šiuo metu prieinamų patogenų aptikimo metodų kartais gali būti sudėtinga pasirinkti tinkamiausius. Todėl pirmiausia patartina vadovautis ISO (angl. *International Organization for Standardization*, Tarptautinės standartizacijos organizacijos) pateikiamais tokių maisto saugos testų atrankos kriterijais: 1) greitis, 2) tikslumas (turint omenyje jautrumą, atsikartojamumą ir specifiškumą), 3) kaina (kiekvieno tyrimo, įskaitant reagentus ir įrangą), 4) naudojimo paprastumas, 5) metodo patikimumas (lyginant su etaloniniu), 6) tipas (maisto matricos tūrio pralaidumas susijęs su atliekamomis operacijomis) [12].

Infekcines ligas sukeltys faktoriai gali būti izoliuojami ir nustatomi tradiciniais mikrobiologiniais metodais. Tokie kultūrų kultivavimo metodai, dažnai vadinami „auksiniu standartu“, yra nebrangūs, jautrūs ir suteikia kiekybinės bei kokybinės informacijos apie maisto pavyzdžiuose esančius mikroorganizmus. Paprastai šie metodai reikalauja naudoti specifines terpes skirtingoms gyvybingoms bakterinėms ląstelėms nustatyti. Beje, maiste pasirodžius toksinų gaminimosi požymiams reikalinga, kad patogenų koncentracijos pasiektų specifinius lygius, pavyzdžiui, 5 log KSV (kolonijas sudarantys vienetai)/g *Staphylococcus aureus* ir *Bacillus cereus*, 3 log KSV/g *Clostridium botulinum*. Tam reikia dar papildomų išotrinimo žingsnių (atrankaus išotrinimo ir sėjimo lėkštelėse), kurie užtrunka nuo 8 iki 24 valandų ilgiau nei paprastai tyrimui būtino laiko. Nors tokie metodai ir labai atrankūs, tačiau maisto matricių heterogeniškumas ir tam tikrų nepatogeninių mikroorganizmų buvimas jose gali stipriai apsunkinti patogenų aptikimą [13].

Minėtieji ir kiti tradicinių patogenų aptikimo metodų trūkumai sąlygoja įvairių greitujų metodų atsiradimą bei spartų jų vystymąsi. Šie metodai taupant laiko sąnaudas (užtrunka paprastai nuo kelių minučių iki kelių valandų), žmogiškuosius išteklius (labiau išvengiama žmogiškųjų klaidų faktorius) bei sumažinant rizikas galimoms infekcijoms plisti (aptikimui reikalingas patogenų kiekis gali būti ir labai mažas), suteikia galimybę paprasčiau ir patogiau kontroliuoti atsirandančių patogenų kiekius. Greitieji metodai gali būti skirstomi į nukleino rūgštimi paremtus, imunologinius ir biojutiklinius metodus [13]. Iš jų PGR, priklausantis nukleino rūgštimi paremtiems metodams; ELISA (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), LFI (angl. *Lateral Flow Immunoassay*), IMS (angl. *Immunomagnetic Separation*) (imunologiniai) bei tėkmės citometrija dažnai taip pat vadinami tradiciniais [56]. Be šių yra plėtojami ir tokie proteomika ir metabolomika paremti metodai, kaip MALDI-TOF MS (angl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), kuris pirmiausia remiasi mikroorganizmų charakterizavimu tipiniame masių diapazone  $m/z$  (2–20 kDa (kiloDaltonai, atominės masės vienetai), daugiausia ribosominiai baltymai) analizuojant visą ląstelių proteomą [57].

Pastaruosiu metu labai daug dėmesio sulaukiančios aptikimo sistemos yra biojutiklinės. Kai kurios iš jų turi geresnes aptikimo ribas, o tai žymiai sumažina bei eliminuoja su PGR metodais susijusius trūkumus. Biologiniai jutikliai yra patogenų aptikimo prietaisai, kurie paprastai susideda iš trijų elementų: biologinės sugavimo molekulės (arba bioreceptoriaus: zondo, antikūno, fermento, ląstelės, nukleino rūgšties, bakteriofago ir kt.), pakeičiančio sugavimo molekulės ir taikinio sąveikas į signalą metodo (keitiklio) ir išvesties duomenų (juos skaitančio prietaiso) [58, 59]. Maisto patogenams nustatyti dažniausiai naudojami elektrocheminiai, mase paremti ir optiniai biojutikliai, o dėl didelio jautrumo ypač naudingi paviršiaus plazmono rezonanso (angl. *surface plasmon resonance*, *SPR*) biologiniai jutikliai. Optiniai biologiniai jutikliai (optiniai pluoštai, mikrogardelės, SPR ir kiti)

aptinka analites be papildomo mėginio apdorojimo sudėtingose maisto matricose, yra jautresni ir specifiskesni, nei kiti biologiniai jutikliai. Matavimai paremti amplitudžių, fazės, dažnio arba šviesos poliarizacijos pokyčiais [13, 58]. Elektrocheminiais jutikliais galima ištirti didelius mėginių kiekius, tačiau jie yra mažiau jautrūs, reikalauja daug plovimo žingsnių ir gali kilti keblumų tiriant įvairiose maisto matricose. Mase paremtais biologiniais jutikliais lengva manipuliuoti, kainos atžvilgiu jie yra efektyvūs, tačiau reikalinga kristalinio paviršiaus regeneracija, ilga bakterijų inkubacijos periodo trukmė, daug plovimo ir džiovavimo žingsnių, o ir jautrumas bei specifiskumas yra maži [13].

Prieš keletą metų aptamerai pasirodė kaip patikimi ir efektyvūs zondai maisto aplinkai kontroliuoti, kadangi yra nebrangūs, stabilūs, lengvai modifikuojami, nešiojami, atkuriami/atkartojami ir leidžia atlikti sudėtingą aptikimą realiu laiku. Sėkmingi aptamerų ir įvairių nanodalelių konjugatai (junginiai) dar labiau pagerino stabilumą, fizikines ir geometrines savybes bei suteikė didesnę paviršių. Be to, tokiu būdu aptamerai geriau apsaugomi nuo modifikacijų ir sustiprinami aptikimo signalai. Maisto patogenams nustatyti su aptameriais jungiamos nanodalelės gali būti aukso Nds (čia ir toliau, nanodalelės), anglies nanovamzdeliai (angl. *carbon nanotubes*, *CNTs*) kvantiniai taškai, grafenas, apkonversijos Nds (angl. *upconversion nanoparticles*) [56]. Aukso Nds gali būti unikalios pritaikomos dėl jų elektroninių, fotoninių ir katalizinių savybių. Beje, jos nėra toksiškos ir gali lengvai prisijungti prie antikūnų. Biologiškai sujungtomis Nds paremti tyrimai pateikia analizei stiprų fluorescencinį signalą. Šis metodas naudojant pulsuojančios lazerio energijos ir absorbuojančių Nds derinį sukelia fizinius pažeidimus. Apšvitinus Nds jos absorbuoja energiją, o joms atsipalaidavus atiduodama šiluma, kuri ir pažeidžia ląsteles [58].

### **1.7. Nanotechnologijos maisto pakavime**

Per keletą pastarųjų dešimtmečių nanotechnologijos vis labiau buvo vertinamos kaip potencialios ir patrauklios technologijos, neaplenkiant ir maisto sektoriaus. Šiuo metu tokios technologijos gali pasiūlyti įvairiausių sprendimų su maistu susijusioms sritims – nuo maisto gamybos ir apdirbimo iki pakavimo. „Nanomedžiagos“ vis reikšmingiau revoliucionuoja maisto kokybę ir saugumą sustiprindamos naudą sveikatai, kurią organizmui suteikia maistas. Platus nanotechnologijų pritaikomumas maisto sektoriuje gali būti suskirstytas į keletą grupių: nanostruktūriniai maisto ingredientai ir maisto „nanojutikliai“. Pirmoji grupė apima plačią erdvę nuo maisto apdorojimo iki jo pakavimo. Maisto apdorojimo procesuose nano- dydžio struktūros gali būti naudojamos kaip maisto priedai, išmanūs maistingųjų medžiagų nešikliai, antimikrobiniai faktoriai, maisto pakuočių mechaninį atsparumą ir tvirtumą gerinantys užpildai ir kita. Tuo metu „nanojutikliais“ gali būti pasiekiamas pranašesnis maisto kokybės ir saugumo įvertinimas [60].

Per santykinai trumpą laiką nanotechnologijos sėkmingai išplėtė savo propaguotojų ratą maisto srityje. Šių technologijų pritaikymą maisto pakavime galima suskirstyti į tokias kategorijas: patobulintas arba sustiprintas pakavimas, aktyvusis pakavimas ir išmanusis pakavimas. Patobulintas pakavimas paprastai reiškia tai, kad Nds yra sumaišomos su polimerų grandinėmis, o to rezultatas yra pagerintos „dujų barjero“ savybės, sustiprintas pakuotės atsparumas temperatūros ir drėgmės poveikiui. Aktyviojo pakavimo atveju, „nanomedžiagų“ panaudojimas yra naudingas joms sąveikaujant tiesiogiai su maistu ar jo aplinka taip efektyviau apsaugant patį produktą. Antimikrobinų savybių jiems suteikti gali nano-anglies oksidas, nano-sidabras, nano-titano dioksidas, nano-magnio oksidas, anglies nanovamzdeliai ir kiti. Išmanusis pakavimas suteikia galimybę maiste pajauti biocheminius ar mikrobiologinius pokyčius. Pritaikius nanotechnologijas galima aptikti tam

tikrų dujų išsiskyrimą gendant maistui ar specifinių patogenų vystymąsi produktuose (saugumą kontroliuojantys biologiniai jutikliai) [61].

Per šiuos metus, kai sparčiai tobulėjo nanotechnologijų pritaikymas maisto sektoriuje, buvo ištirta daugybė potencialių Nds. Pavyzdžiui, tarp daugiausiai ištirtų oksidinių Nds buvo  $\text{TiO}_2$  (titano dioksidas),  $\text{ZnO}$  (cinko oksidas),  $\text{SiO}_2$  (silicio oksidas) ir  $\text{MgO}$  (magnio oksidas). Šie metalų oksidai sugeba blokuoti UV spindulius ir yra fotokatalitiniai dezinfekuojantys faktoriai [62]. Šios dalelės bei tokių metalų, kaip sidabro, aukso ir cinko Nds funkcionuoja esant tiesioginiam kontaktui arba jos gali lėtai migruoti ir reaguoti su organinėmis medžiagomis (joms teikiant pirmenybę), esančiomis maiste. Manoma, kad tokių Nds priešmikrobinis aktyvumas, sąlygojantis paveikiamų ląstelių pažeidimus, gali pasireikšti dėl tokių mechanizmų, kaip: tiesioginė sąveika su mikroorganizmų ląstelėmis (sutrikdomas tarpmembraninis elektronų perdavimas, pažeidžiamas ląstelės apvalkalas), oksiduojami ląstelių komponentai, generuojami antriniai produktai (pavyzdžiui, reaktyviosios deguonies rūšys (angl. *reactive oxygen species, ROS*) arba ištirpę sunkiųjų metalų jonai) [63].

### 1.7.1. Sidabro (Ag) nanodalelės

Bene ryškiausias sidabro privalumas, kalbant apie jo antimikrobines savybes, yra toks, kad jis gali būti lengvai įterpiamas į daugybę įvairių medžiagų (tekstilės, plastiko ir pan.). Dėl to jis ypač naudingas pritaikymams, kurie reikalauja plataus spektro nepertraukiamo antimikrobinio aktyvumo ten, kur tradicinės priemonės būtų nepraktiškos. Vis dėlto mokslininkams dar kyla nemažai klausimų, susijusių su Ag (taip pat ir sidabro Nds) aktyvumo mechanizmais. Pavyzdžiui, nesutariama, kokių būdu sidabro Nds yra toksiškos bakterinėms ląstelėms. Pats konservatyviausias požiūris nurodo, kad Ag atomai atskyla nuo sidabro Nds paviršių ir pažeidžia ląsteles tokiais pat mechanizmais, kaip ir stebima kitais tradiciniais sidabro priešmikrobininių priemonių atvejais. Kita hipotezė teigia, kad sidabro Nds tiesiog perneša  $\text{Ag}^+$  ir kad yra dar papildomi aktyvumo mechanizmai. Taip pat yra duomenų, kad tai dar kiti mechanizmai, nes pastebėtos sidabro Nds reakcijos su DNR fosforo grupėmis bei užfiksuotas faktas, kad Ag nanodalelėms prisijungus prie membraninių baltymų, įvyksta ląstelių morfologiniai pokyčiai (susiformuoja duobės/skylės) [64].

### 1.7.2. Vario (Cu) nanodalelės

Daugumos aerobinių organizmų metabolizmui bei elektronų pernašos sistemoms reikalingas varis, tačiau kai jo koncentracijos viršija normas, varis gali tapti toksiškas ir slopinti bakterinių ląstelių augimą. Yra gerai žinoma, kad varis turi plačiai pasireiškiantį aktyvumą prieš bakterijas ir grybelius. Neseniai buvo parodyta, kad Cu nanodalelių dydžių, morfologijos, koncentracijų bei produkavimo metodų skirtumai gali pakeisti biocidinį (arba antibakterinį) aktyvumą prieš patogenus. Lyginant su auksu ir sidabru, Cu yra ypač jautrus orui, o vario oksido fazės termodinamiškai yra stabilesnės. Beje, vario Nds buvo išbandytos ir kompozituose su sidabro Nds. Išanalizavus tokio kompozito optines, antimikrobines ir fizikines–chemines savybes, buvo pastebėtos žymios UV, deguonies ir šviesos obstrukcijos (trukdymo) galimybės bei stiprus biocidinis poveikis prieš gramneigiamas ir gramteigiamas bakterijas [65, 66].

## 1.8. Nanodalelių sintezė

Nanodalelių sintezės (dar vadinamos nanosinteze) metu, reagentas A (pavyzdžiui, metalų druskos) sąveikauja su reagentu B (ribojančiu agentu/faktoriumi) ir specifinėje temperatūroje įvyksta reakcija, kurios rezultatas – nanodalelės ir šalutiniai produktai. Kai kuriais atvejais, šalutiniai produktai arba

didesnės reakcijos struktūros gali agreguotis cheminiais ryšiais (įvyksta masių aglomeracija) [67]. O, priešingai organiniams junginiams su turimomis skirtingomis funkcinėmis grupėmis, susidariusios koloidinės dalelės turi tik briaunas ir ligandus, kurie yra stipriai tarpusavyje susiję (yra tiek briaunų, kiek yra ir specifinių ligandų). Dėl to nanodalelėmis tampa sudėtinga manipuliuoti. Visų pirma, nėra tinkamo metodo, leidžiančio kontroliuoti ligandų gabalėlių pozicijas, formas ir užimamą plotą. Ligandai nėra pastovūs, dinamiškai sudaro ryšius ir disocijuoja nuo Nds paviršiaus, net ir stipriausių tiolių ligandų atveju ant aukso/sidabro paviršių. Beje, nanodalelių koloidinis nestabilumas yra nuolatinis trikdys, keliantis neužtikrintumą atliekamuose Nds tyrimuose [68].

Nanodalelių sintezė gali būti atliekama fizikiniais, cheminiais ir biologiniais metodais. Pagrindinis fizikinių ir cheminių metodų trūkumas yra jų aukšta kaina, kadangi yra naudojamos pavojingos ir toksiškos medžiagos. Todėl paskutiniaisiais metais dauguma tyrimų yra orientuoti į biologines sistemas su mikroorganizmais ir augalais. Sistemos yra draugiškos aplinkai, nėra naudojamos pavojingos medžiagos [69].

### **1.8.1. Fizikinė nanosintezė**

Fizikiniai metodai remiasi „viršus–žemyn“ būdu, kai stambios medžiagos yra susmulkinamos iki smulkių dalelių pritaikant tokius veiksmus, kaip gniuždymas, pjaustymas, malimas, homegonizacija ir taip toliau. Šiais įvairiais fizikiniais metodais gaminamos didesnio dydžio, tūrio ir diametro Nds, kuriose susiformuoja paviršiaus defektai, yra brangūs ir užtrunka daug laiko. Ypač brangi įranga, kurios išlaikymas taip pat nepigus tada, kai norima gaminti vienodo dydžio Nds [67].

### **1.8.2. Cheminė nanodalelių sintezė**

„Apačia–aukštyn“ technika, naudojama cheminės nanosintezės procesuose, kuriais dažniausiai paruošiamos sidabro Nds vandenyje ar organiniuose tirpikliuose, kaip stabili koloidinė dispersija. Sidabro druska naudojama nanodalelių sintezei gali būti veikiamą tokiomis cheminiais procesais, kaip hidroterminiai, cheminės garų depozicijos (angl. *chemical vapor deposition*, *CVD*), pirolizės, sol–gel ir kitais. Juose dažnai naudojami reduktoriai yra boro hidridas, citratas, askorbatas ir elementinis vandenilis. Šiuo sintezės būdu toksiški chemikalai yra neišvengiami [67]. Pavyzdžiui, naudojant cheminės redukcijos metodus, ištirpintas tirpiklyje metalinis „prekursorius“ (pirmtakas) (pavyzdžiui, vario acetatas) yra sumaišomas su reikiamu redukuojančiu agentu (pavyzdžiui, hidrazinu) ir paviršiaus aktyviaja medžiaga (PAM) nuolat maišomoje talpoje (ar reaktoriuje) esant inertinei atmosferai. Beje, dažnai redukuojančio agento aktyvumas stipriai priklauso nuo tirpalo pH [70].

### **1.8.3. Biologinė nanosintezė**

Šis nanosintezės būdas, dar vadinamas žaliaja sinteze, remiasi cheminiais metodais naudojant nepavojingus chemikalus ir medžiagas, gaunamas iš mikroorganizmų, biopolimerų, cukrų ir augalinių ekstraktų. Nors bakterijos ir grybeliai, kurie veikia kaip redukuojantys ir ribojantys agentai, gali produkuoti viduląstelines sidabro Nds, šie šaltiniai reikalauja papildomų ekstraktijų ir atgavimo procesų. Vis dėlto augalinių elementų panaudojimas sąlygoja viduląstelinių Ag nanodalelių gamybą per palyginti trumpesnę laiką ir ateityje ji gali būti dar didesnė. Augaliniuose ekstraktuose yra daugybė fenolinių junginių, pavyzdžiui, galo ir elago rūgščių, kurios palengvina krūvių pernašą hidroksilų struktūroms, todėl ir veikia kaip redukuojantys veiksniai. Kiti fenoliniai junginiai, kaip tano rūgštis, gali turėti tiek redukuojančių, tiek stabilizuojančių savybių. Tano rūgšties buvimas lemia hidroksilo

ar karboksilo grupių skilimą susidarant laisviems vandenilio atomams bei elektronams, kurie gali redukuoti metalų jonus. Beje, Nds stabilizavimas vyksta dėl chinonų arba karbanijonų (neigiamas krūvis yra ant trivalentės anglies atomo) susidariusių per šį procesą [71].

#### **1.8.4. Maistinių atliekų taikymas nanodalelių sintezei**

Susidarančių maisto atliekų kiekis pasaulio mastu sparčiai didėja kartu su didėjančiais nuolat augančios populiacijos poreikiais. Ši problema dar labiau išryškėja dėl lėto efektyvesnių atliekų tvarkymo strategijų progreso. Maisto tiekimo grandinėje atliekos generuojamos įvairiose jos stadijose, tiek gamyboje, tiek sandėliavime, tiek prekyboje, tiek vartojant ir po. Tokios atliekos pagal jų biochemines savybes gali būti plačiai skirstomos į augalinės (kultivuojamų grūdų, vaisių ir daržovių) ir gyvulinės (po skerdimo liekančių dalių, išrūgų ir kt.) kilmės atliekas. Literatūroje kartais dar išskiriamos ir vandeninių kultūrų (angl. *aquacultural*) maisto, pavyzdžiui, dumblių, atliekos. Tokios atliekos yra įvairių angliavandenių, baltymų, lipidų ir kitų maistingų medžiagų saugyklos ir gali formuoti žaliavas komerciškai svarbiems metabolitams. Atliekose esančios naudingos „biomolekulės“ ir junginiai gali aktyviai dalyvauti redukuojant metalų jonus vandeniniuose tirpaluose ir taip prisidėti prie nanodalelių suformavimo. Biologinės molekulės taip pat gali nulemti dalelių augimą specifine kryptimi, o kai kurios gali elgtis kaip ribojantys faktoriai, kurie apsaugo nanodaleles nuo aglomeracijos. Ir, žinoma, tai potencialus šaltinis patikimoms, tvarioms, žaliaja chemija paremtoms technologijoms, nors šiuo metu tai gan nauja tyrinėjimų sritis [72, 73].

#### **1.9. Mikroorganizmų sąveika su nanodalelėmis**

Šiuo metu jau yra nemažai nuveikta tiriant nanotechnologijos pritaikomumą maisto sektoriuje ir vis energingiau gilinamasi į nanodalelių poveikį žmonių sveikatai, tačiau visa tai apjungiančių žinių dar labai trūksta. Pavyzdžiui, jau žinoma, kad Nds sąveikaujant su biologinėmis molekulėmis ir organelėmis susiformuoja biologinė karūna (angl. *bio-corona*), o tai turi neigiamą poveikį ląstelėms, kaip toksiškumą imunitetui ir genetikai ar net gali sukelti ląstelės mirtį [74]. Yra duomenų, rodančių, kad Nds–bakterijų kompleksų formavimasis sumažėja priklausomai nuo koncentracijos kai nanodalelės padengiamos biologine karūna, joms patekus į organizmo virškinimo sistemą, pradedant burna. Tačiau, kai pH tampa užtektinai žemas (kaip skrandžio sąlygomis) gali atsikurti ir pakankama Nds adsorbcija [75]. Beje, į organizmą patekusių nanodalelių absorbcija skirtinguose organuose varijuoja. Biologiniame skystyje Nds gali pakeisti savybes ir dėl joninės jėgos pokyčių bei gali paveikti baltymus, lipidus, kraujo ląsteles, net genetinę medžiagą [74]. Yra atliktų tyrimų, kuriais įrodytas aukso Nds, plačiai naudojamų maisto pakavime, gebėjimas sukelti chromatino pokyčius žmogaus plaučių fibroblastų branduoliuose ir genų ekspresijoje. Vis dėlto nanodalelių įtaka tradiciniams bei patogeniniams mikroorganizmams virškinamojo trakto viduje nėra visiškai suprasta. Be to, kad Nds sąveikauja su sveiko virškinamojo trakto mikroflora, dalelės gali paveikti ir per nosį ar burną patenkančius patogenus. Taigi, maisto produktuose randamos Nds taip pat gali daryti įtaką, pavyzdžiui, probiotikams [75].

#### **1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Visais laikais žmonija kovojo su jos egzistencijai iškytančiais pavojais. Kuo daugiau žinių įgauta, tuo daugiau iššūkių. Mikroorganizmai turi daug įtakos žmonių kasdienybei ir vis dar yra mokomasi kaip su jais gyventi santaikoje. Problemų keliantys įvairūs patogenai (bakterijos, virusai, parazitai, grybelinės infekcijos) ir jų savybės trumpai apžvelgiami šiame darbe. Didžiulė dalis infekcinių



susirgimų kyla su maistu į organizmą patekus patogenams. Todėl svarbu tinkamai užtikrinti maisto produktų saugą ir efektyviai šalinti maisto gamybos bei tiekimo grandinėje atsirandančius potencialiai pavojingus mikroorganizmus. Maisto sauga yra kontroliuojama įvairiais su tuo dirbančioms įmonėms nustatytais reikalavimais (pavyzdžiui, taikoma Geroji Gamybos Praktika ir Pavojaus analizės kritiniai kontrolės taškai). Naudojami tradiciniai maisto apdorojimo būdai (šaldymas, džiovinimas, konservavimas, fermentacija ir taip toliau) bei radiacijos technologijos vis dar yra efektyvūs, tačiau vien šių priemonių nepakanka. Norint operatyviai kovoti su pavojingais patogenais, svarbu ir juos laiku aptikti. Tam pasitelkiami tradiciniai mikrobiologiniai metodai bei laiką ir resursus taupantys pažangesni greitieji metodai (tokie, kaip tėkmės citometrija, PGR, ELISA, įvairūs biojutikliai).

Šiais laikais atsiranda vis daugiau galimybių pritaikyti potencialias nanotechnologijas ir jomis spręsti keletą problemų vienu metu. Maisto saugos srityje matoma perspektyva panaudojant maisto atliekose esančias naudingas medžiagas susintetinti nanodaleles (pavyzdžiui, metalines vario ir sidabro), kurios galėtų būti pritaikytos kaip antibakterinės medžiagos maisto pakavime. Šiame darbe tokia galimybė yra nagrinėjama. Tačiau reikia nepamiršti, kad šie konstruktai gali kelti tokius iššūkius, kaip nanodalelių migracija į maisto produktus ar į žmogaus organizmą. Todėl ši tema yra potencialiai aktuali būsimiems moksliniams tyrimams pasaulyje.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Medžiagos ir reagentai

Tyrimų metu buvo naudotos šios medžiagos ir reagentai:

1. obuoliai JONAGOLD (2 kl.), kilmės šalis: Lenkija (lot. *Malus*);
2. bananai (2 kl.), kilmės šalis: Ekvadoras (lot. *Musa*);
3. distiliuotas vanduo;
4. daržovių ir vaisių ploviklis „Earth Friendly Products“. Sudėtis: vanduo, denatūruotas alkoholis, kaprililo/miristilo gliukozidas (iš augalų gaunama aktyvioji paviršiaus medžiaga), kalio sorbatas (iš augalų gaunamas natūralus maisto konservantas), citrinos rūgštis;
5. vario sulfatas, 5-iavandenis –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Eurochemicals, Lietuva);
6. sidabro nitratas –  $\text{AgNO}_3$  (Sigma-Aldrich, Vokietija);
7. cinko sulfatas –  $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Vokietija);
8. kalio heksacianoferatas (II) 3-hidratas (geltonoji kraujo druska) –  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Vokietija);
9. acetonitrilas (ACN) –  $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$  (Sigma-Aldrich, Vokietija);
10. sieros rūgštis 1% –  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich, Vokietija);
11. bario chloridas 1% –  $\text{BaCl}_2$  (Sigma-Aldrich, Vokietija);
12. standartinė pamatinė fruktozės medžiaga (Sigma-Aldrich, Vokietija);
13. standartinė pamatinė gliukozės medžiaga (Sigma-Aldrich, Vokietija);
14. mitybinė terpė – agaras *Plate Count Agar* – PCA (Labochema);
15. bakterijų kultūros: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739.

### 2.2. Priemonės ir prietaisai

Vario ir sidabro Nds sintezei ir jų tyrimams buvo naudota:

1. matavimo kolbos (25ml, 100 ml, 500 ml);
2. stiklinės (įvairaus tūrio);
3. matavimo cilindrai (100 ml, 500 ml);
4. medicininiai švirkštai ( $10 \text{ cm}^3$ );
5. filtravimo popierius, kurio porų dydis 8–12  $\mu\text{m}$ ;
6. membraniniai filtrai su 0,45  $\mu\text{m}$  poromis;
7. chromatografiniai mėgintuvėliai;
8. piltuvėliai (įvairaus dydžio);
9. vienkartinės fluorimetrinės kiuvetės (Agilent technologies, JAV);
10. automatinės pipetės (1–10, 20–200 ir 100–1000  $\mu\text{l}$  tūrio);
11. petri lėkštelės (Labochema);
12. svarstyklės (ATX84, Shimadzu);
13. pH metras (EDGE, Hanna Instruments);
14. magnetinė maišyklė su kaitinimu IKA C – MAG HS 7 (IKA, Vokietija);
15. centrifuga (Z 206 A, Hermle Labortechnik, Vokietija);
16. džiovavimo spinta E 28–28 L (Binder, Vokietija);
17. termostatas (Binder, Vokietija);
18. ultragarso vonelė;
19. UV–RŠ (regimosios šviesos) spektrometras (Cary 60, Agilent technologies, JAV);

20. zondas (serijos nr. 7910035600, 3,5 mm skersmuo, fiksuotas 10 mm nueinamo kelio ilgis);
21. efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) sistema (Shimadzu UFLC, Japonija);
22. ESC kolonėlė, atvirkščių fazių RP C18 tipo. Parametrai: kolonėlė RP, kurios dalelės yra 3–10 µm; ilgis 100–300 mm; vidinis skersmuo 3–4 mm;
23. prieškolonė RP C18;
24. skenuojantis elektroninis mikroskopas Hitachi S-3400N su įmontuotu Bruker Quad 5040 EDS detektoriumi (Japonija) (Lietuvos Energetikos Institutas, LEI);
25. autoklavas (Fedegari, Italija).

### 2.3. Metodai

#### 2.3.1. Vandenių obuolių ir bananų žievių ekstraktų paruošimas

Po tekančio vandens srove kruopščiai nuplaunami tyrimams naudojami obuoliai ir bananai dar papildomai naudojant ir būtinių ploviklių, kuris turi paviršiaus aktyviųjų medžiagų (PAM). Toks ploviklis su PAM efektyviau šalina ant žievės paviršiaus esančius nešvarumus, vašką ir apnašas. Obuoliai ir bananai nusausinami, jų žievelės nulupamos ir dar nuplaunamos distiliuotu vandeniu. Tada žievės supjaustomos smulkiais gabalėliais ir pasveriami po 100 g šių antrinių žaliavų. Jos išdžiovinamos 60 °C temperatūroje džiovinimo spintoje iki pastovios masės.

Paruoštų džiovintų žievelių pasveriami po 15 g. Šios atskirai perkeliama į karščiui atsparias matavimo kolbas (po 500 ml) ir užpilama po 400 ml distiliuoto vandens. Tada palaikant 90 °C temperatūrą ir nuolat maišant, mišiniai kaitinami ant magnetinės maišyklės 40 min. Gauti tirpalai atvėsunami iki kambario temperatūros bei praskiedžiami iki 400 ml distiliuotu vandeniu. Tirpalai 10 min centrifuguojami 4000 aps./min. greičiu ir gauti centrifugatai nufiltruojami per popierinį filtrą. Tokie ekstraktai dar skiedžiami 10 kartų ir toliau naudojami kituose tyrimų etapuose.

#### 2.3.2. Kokybinė ir kiekybinė redukuojančių cukrų, esančių žievių ekstraktuose, analizė

Analizė atlikta naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC, dažniau vadinama angliško pavadinimo trumpiniu HPLC, *High-performance/pressure liquid chromatography*) metodą, kuris įvairiose srityse labai plačiai taikomas tiek kokybinei, tiek kiekybinei organinių junginių, vaistų, polimerų ir/ar įvairių biologinių komponentų analizei. Šio darbo metu buvo naudota Shimadzu UFLC chromatografijos aparatūra.

**HPLC sistemos darbo sąlygos:** judriosios fazės tėkmės greitis – 1,2 ml/min.; judrioji fazė sudaryta iš acetonitrilo ir vandens, santykiu 1:1 (75:75, V:V); injekcijos tūris – 20 µl; eliucija – izokratinė; kolonėlės darbinė temperatūra – 28 °C; detekcijai naudojamas garinantis šviesos sklaidos detektorius.

**Fruktozės ir gliukozės standartinių tirpalų paruošimas:** pasveriami po 200 mg fruktozės ir gliukozės standartinių pamatinių medžiagų, kurios kiekybiškai perkeliama į atskiras 100 ml matavimo kolbas. Tada distiliuotu vandeniu praskiedžiama iki žymės ir purtoma, kol medžiagos ištirpsta visiškai. Gautuose standartiniuose tirpaluose fruktozės ir gliukozės koncentracijos yra po 2 mg/ml. Atliekant tyrimą yra užrašoma šių standartinių tirpalų chromatograma.

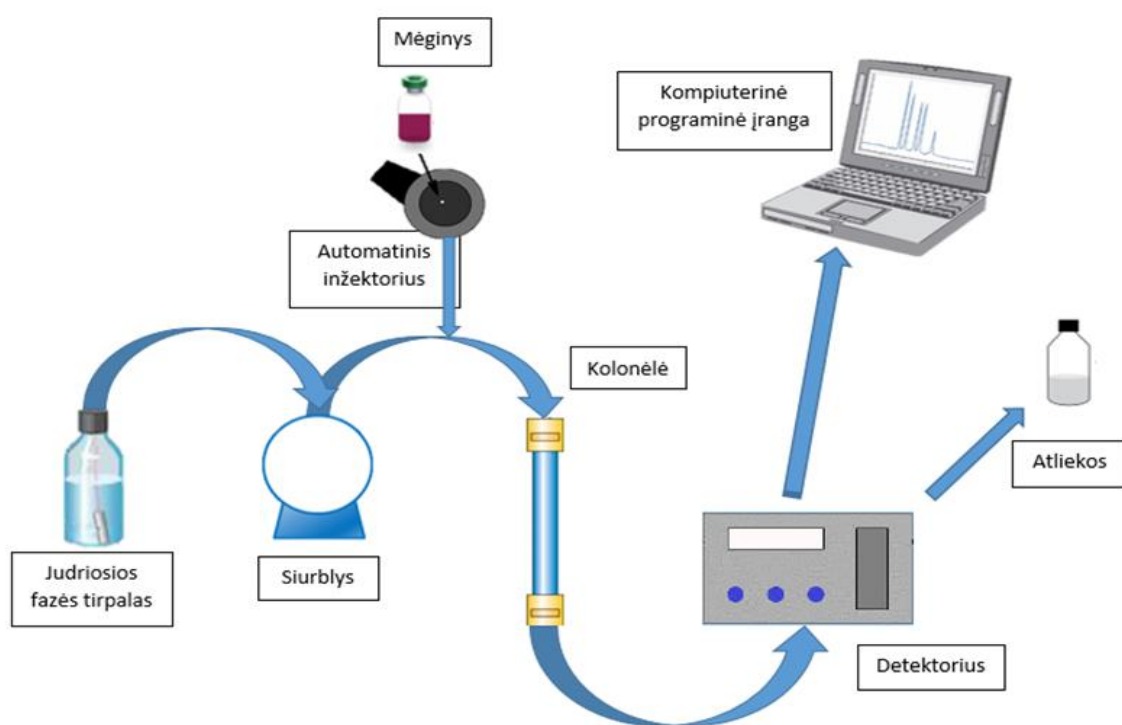
**Tiriamųjų tirpalų paruošimas:** stiklinėje pasveriami po 3,00 g tiriamųjų obuolių ir bananų žievių ekstraktų. Užpilama distiliuoto vandens (po 50 ml) ir 15 min. laikoma 60 °C (± 2 °C) temperatūros

ultragarso vonelėje. Atvėsinti iki kambario temperatūros tirpalai toliau skaidrinami *Carrez I* ir *Carrez II* tirpalais.

***Carrez I* tirpalo paruošimas:** 7,20 g cinko sulfato ( $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$ ) ištirpinama vandenyje. Perkeliama kiekybiškai į 100 ml kolbą ir skiedžiama iki žymės distiliuotu vandeniu.

***Carrez II* tirpalo paruošimas:** 3,60 g kalio heksacianoferato (II) 3-hidrato ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) ištirpinama vandenyje. Analogiškai *Carrez I* tirpalo paruošimui, geltonoji kraujo druska perkeliama kiekybiškai į 100 ml kolbą ir skiedžiama iki žymės distiliuotu vandeniu.

**Analizės eiga.** Nuskaidrinti tiriamieji obuolių ir bananų žievelių ekstraktai filtruojami per membraninius filtrus (su  $0,45 \mu m$  dydžio poromis). Kartu su paruoštais standartiniais fruktozės ir gliukozės 2 mg/ml koncentracijų tirpalais (atskiruose buteliukuose) tiriamieji mėginiai įleidžiami į mobiliosios fazės srautą per automatinį inžektorių. Sistemoje tiriamieji ir standartiniai tirpalai su judriosios fazės srautu teka į chromatografinę kolonėlę, o iš jos toliau patenka į detektorių. Jame užfiksuoti elektriniai signalai perduodami kompiuterinei įrangai, kurioje chromatogramų pavidalu sugeneruojami ir pateikiami rezultatai. Supaprastinta efektyviosios skysčių chromatografijos sistema pateikiama 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) bazinė schema

Iš gautų chromatogramų ataskaitų duomenų toliau apskaičiuojami redukuojančių cukrų kiekiai bandiniuose (2.1.):

$$\text{Sacharidų kiekis: (g/100g (\%) produkto)} = \frac{S_{m\acute{e}g} \cdot C_{st} \cdot V_1 \cdot 100}{S_{st} \cdot 1000 \cdot m} \quad (2.1.)$$

kur:  $S_{m\acute{e}g}$  – mėginio smailės plotas;  $C_{st}$  – sacharido standarto koncentracija mg/ml;  $V_1$  – tūris, kuriame ruoštas mėginys;  $S_{st}$  – sacharido standarto smailės plotas;  $m$  – analizei paimto mėginio masė, g.

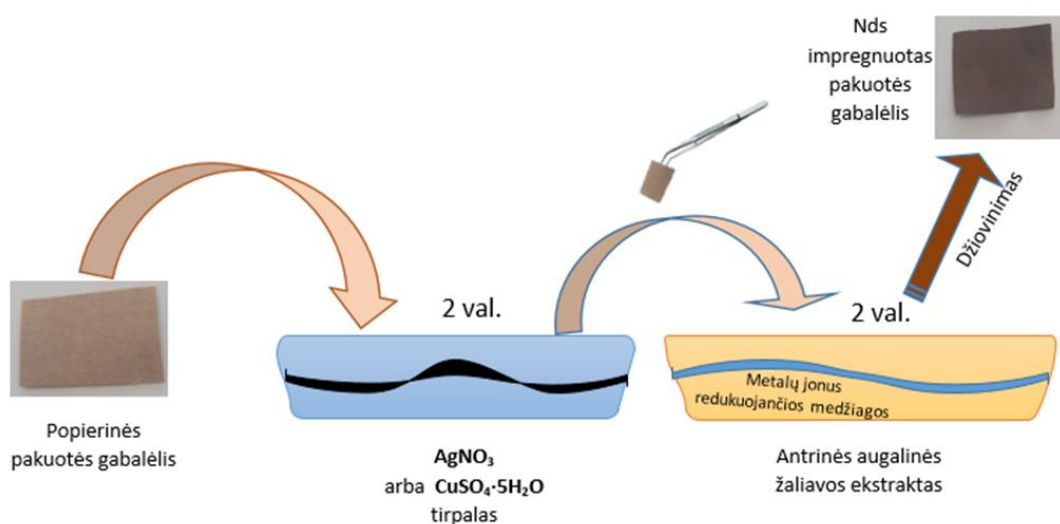
Tyrimų su efektyviosios skysčių chromatografijos sistema sugeneruoti duomenys taip pat apdorojami Microsoft Excel 2016 programine įranga.

### 2.3.3. Vario ir sidabro nanodalelių sintezė

Po 15 ml paruošto obuolių žievelių ekstrakto ir 10 ml vandeninio sidabro nitrato (0,1 mol/l) tirpalo įpilama į 25 ml kolbą ir sumaišoma. Lygiagrečiai tas pats atliekama ir su 10 ml vandeninio vario sulfato (0,1 mol/l) tirpalu. Automatine pipete po 1,5 ml gautų tirpalų įpilama į plastmasines kiuvetes, kurios įstatomos į spektrofotometrą. Jame įsitikinama, kad vyksta Nds sintezė. Sintezė vykdoma kambario temperatūroje. Norint įsitikinti sintezės efektyvumu ji dar pakartojama du kartus.

### 2.3.4. Popierinių pakuočių padengimas Cu ir Ag nanodalelėmis

Popierinė pakuotė sukarpoma maždaug  $15 \times 20$  mm dydžio gabalėliais. Po 5 iš jų dviems valandoms pakuotės gabalėliai pamerkiami į atskiras vones (plačias stiklines) su sidabro nitrato ir vario sulfato (po 0,1 mol/l) tirpalais. Po to šie gabalėliai pincetu atsargiai perkeliama į plačias stiklines su obuolių žievelių ekstraktu, taip pat dviems valandoms (atskirai mirkytus metalų druskų tirpaluose į 2 atskiras vones, atitinkamai). Tada gabalėliai išdžiovinami ant švaraus lygaus paviršiaus.



2.2 pav. Supaprastinta maisto popierinių pakuočių impregnavimo nanodalelėmis schema

### 2.3.5. Vario ir sidabro nanodalelių optinių savybių tyrimas

Koloidinių vario ir sidabro Nds tirpalų bei šiomis nanodalelėmis padengtų popierinių pakuočių optinėms savybėms nustatyti buvo taikytas UV-RŠ spektroskopijos metodas. Analizės metu naudotas Cary 60 (Agilent technologies, JAV) spektrofotometras. Cu ir Ag Nds sintezės tirpalai (po 1,5 ml) įpilami į fluorimetrines kiuvetes, kurios įstatomos į spektrofotometrą. Bazinės linijos korekcijai naudojamas distiliuotas vanduo. Tyrimo metu užfiksuojami 10 kartų skiesto obuolių žievelių ekstrakto bei kontrolinių mėginių ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ir  $\text{AgNO}_3$ ) vandeninių tirpalų spektrai. Matavimai atliekami 350–800 nm bangos ilgių diapazone. Šiame diapazone pamatuojami ir popierinės pakuotės gabalėlių, tiek padengtų Cu ir Ag Nds, tiek nepadengtų jomis, atspindžio (angl. *reflectance*) spektrai tam naudojant prie Cary 60 UV-RŠ spektrofotometro pritaikytą zoną, skirtą matuoti absorbciją, atspindį ir transmisiją ant kietų mėginių paviršių. Galiausiai matavimų rezultatai apdorojami UV WinLab ir OriginLab programinėmis įrangomis.

### 2.3.6. Susintetintų nanodalelių morfologijos (SEM) ir elementinės sudėties (EDS) tyrimai

Nanodalelių morfologinėms savybėms charakterizuoti taikytas skenuojančiosios elektroninės mikroskopijos (SEM) metodas. Tyrimo metu naudota Hitachi S-3400N (Japonija) SEM aparatūra. Šio mikroskopo maksimali skiriamoji geba yra 3,5 nm. Norint pašalinti netirpias obuolių žievelių ekstraktų medžiagas, koloidiniai Cu ir Ag Nds tirpalai centrifuguojami. Atliekant analizę automatinė pipete ant švarių silicio plokštelių atskirai užlašinama po 200  $\mu$ l vario bei sidabro Nds tirpalų supernatantų, praskiestų 10 kartų. Taip paruošti bandiniai paliekami per naktį išdžiūti. SEM nuotraukos gaunamos naudojant 10–15 kV įtampą. Popierinės pakuotės gabalėlių, tiek nepadengtų, tiek padengtų Nds atveju, mėginiai tiesiogiai be papildomo apdorojimo įdedami į bandinio vietą SEM aparatūroje ir padaromos nuotraukos.



2.3 pav. Skenuojančiosios elektroninės mikroskopijos (SEM) Hitachi S-3400N aparatūra [86]

Siekiant nustatyti elementinę bandinio sudėtį, taikytas EDS (rentgeno spindulių energijos dispersijos, angl. *Energy Dispersive X-ray Spectrometry*) metodas. EDS tyrimui taip pat naudotas Hitachi S-3400N skenuojantis elektroninis mikroskopas, kuriame yra įmontuotas Bruker Quad 5040 EDS detektorius. Šis detektorius ne tik suteikia galimybę tiriamuosiuose bandiniuose įvertinti cheminę sudėtį, o taip pat sudaryti tiriamojo objekto paviršiuje pasiskirsčiusių cheminių elementų erdvinį žemėlapij. Šios analizės metu naudojami tie patys tiriamieji pavyzdžiai kaip ir SEM tyrimų atveju.

### 2.3.7. Susintetintų nanodalelių antibakterinių savybių tyrimas

Nanodalelių antibakterinėms savybėms įvertinti buvo pasirinktos keturios patogeninių bakterijų kultūros – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ir *Escherichia coli* ATCC 8739. Šios bakterijos pasirinktos dėl jų ekspansyvaus paplitimo aplinkoje ir plačiai literatūroje nagrinėjamo patogeniškumo. Iš šių bakterijų

dvi (lot. *S. typhimurium* ir *E. coli*) yra gramneigiamos ir dvi (lot. *B. subtilis* bei *S. aureus*) – gramteigiamos. Susintetintų vario ir sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas prieš *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ir *Escherichia coli* buvo vertinamas naudojant tradicinį difuzijos į agarą metodą.

Bakterijų suspensija paruošiama pagal McFarland'o drumstumo standartą Nr. 0,5 (apytiksliai  $1,5 \cdot 10^8$  KSV (kolonijas sudarantys vienetai)/ml) ir skiedžiama iki galutinės reikiamos bakterijų koncentracijos [77]. Tyrimams paruošiamos  $10^4$ ,  $10^6$  ir  $10^8$  KSV/ml koncentracijos. Bakterijų auginimui naudojama mitybinė terpė – agaras PCA (iš angl. trumpinio *plate count agar*), kurią sudaro kazeino triptonas (5,0 g), mielių ekstraktas (2,5 g), bevandenė gliukozė (1,0 g) ir agaras (15 g). Mitybinė terpė paruošiama suspendavus visas sudedamąsias dalis (23,5 g) su 1000 ml distiliuoto vandens. Šis mišinys kaitinamas iki virimo, vėliau 15 min. sterilizuojamas autoklave,  $121^\circ \text{C}$  temperatūroje. Po to terpė aušinama iki  $45\text{--}50^\circ \text{C}$  temperatūros. Atvėsusi terpė maišoma su paruošta mikroorganizmų suspensija ir po 10 ml tokio mišinio supilama į sterilias Petri lėkšteles (skersmuo 90 mm). Terpei lėkštelėse pakankamai atvėsus ir pradėjus stingti ant jos paviršiaus panašiais atstumais vienas nuo kito atsargiai uždedami maždaug 8 mm skersmens skrituliukai, iškirpti iš nepadengtų ir padengtų nanodalelėmis popierinės pakuotės gabalėlių. Tada Petri lėkštelės su pasėtais mikroorganizmais sudedamos į termostatą ir inkubuojamos  $37^\circ \text{C}$  temperatūroje. Antibakterinis susintetintų Nds poveikis prieš *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ir *Escherichia coli* patogenines bakterijas vertinamas po 24 val. Dar antibakterinio aktyvumo įvertinimo procedūra prieš šias bakterijas pakartojama du kartus.

Nagrinėjant Petri lėkštelėse užaugusių bakterijų Nds poveikyje susidariusias skaidrias zonas, apskaičiuojamas slopinimo zonos plotis pagal (2.2.) formulę [78]:

$$H = \frac{D-d}{2} \quad (2.2.)$$

kur: H – slopinimo zonos plotis, mm; D – bendras sterilios zonos ir skritulio skersmuo, mm; d – įdubos skersmuo, mm.

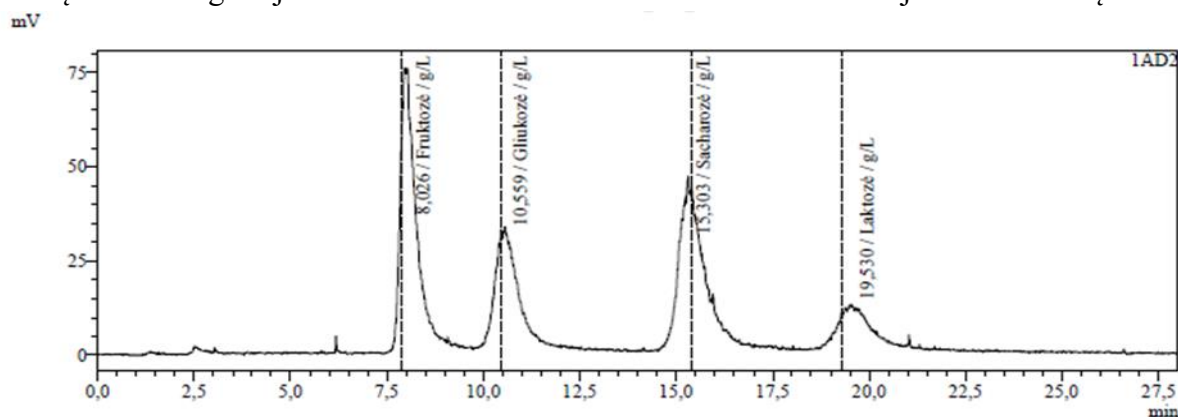


### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Užtikrinti maisto produktų saugą žmonijai darosi vis sudėtingiau, nes atsiranda nauji patogenai, nuolat vystosi jų gebėjimai atsispirti taikomoms apsaugos priemonėms prieš šių žalingų mikroorganizmų veikimą (pavyzdžiui, didėjantis patogenų atsparumas tam tikriems antibiotikams). Todėl yra aktualu ir reikalinga ieškoti naujų būdų, kaip sumažinti jų plitimą ir daromą žalą. Tuo pačiu pasaulio gyventojai susiduria su didėjančia maisto atliekų kiekio problema, o naujais moksliniais pasiekimais leidžia tokias atliekas panaudoti kaip antrines žaliavas kuriant didžiulę naudą. Tiriamojo darbo metu buvo koncentruojamasi ties šiomis mintimis ir pabandyta priartėti prie paminėtų problemų sprendimo.

#### 3.1. Kokybinė ir kiekybinė redukuojančių cukrų, esančių žievių ekstraktuose, analizė

Pirmajame tyrimų etape buvo paruošti bananų ir obuolių žievių vandeniniai ekstraktai (žr. 2.3.1. skyrelyje pateiktą metodiką). Remiantis žaliosios sintezės principais, daugybė augalų ir jų ekstraktų gali būti panaudoti kaip natūralūs reagentai sintetinti metalų nanodaleles. Taip yra dėl to, kad augalai bei jų ekstraktai turi daugybę antrinių metabolitų (įvairių fenolinių junginių, tarp kurių flavonoidų, taninų, kumarinų, stilbenų, lignanų; alkaloidų; saponinų; terpenų; lipidų; angliavandenių [79]), iš kurių kai kurie gali veikti kaip redukuojančios medžiagos. Beje, augalų ekstraktuose yra nemažai redukuojančių cukrų, kurie sugeba redukuoti metalų jonus [80]. Todėl buvo iškelta hipotezė, kad gautame antrinių augalinių žaliavų (maisto atliekų, šiuo atveju – obuolių ir bananų žievių) ekstraktuose esantys monosacharidai (fruktozė ir gliukozė) gali veikti kaip redukuojantys agentai, kurie sugeba redukuoti  $Ag^+$  ir  $Cu^{2+}$  jonus iki metalinių  $Ag^0$  ir  $Cu^0$ , atitinkamai, nanodalelių. Norint patikrinti, ar paruoštuose vandeniniuose žievių ekstraktuose yra fruktozės ir gliukozės, buvo atlikta kokybinė ir kiekybinė jų ESC (arba dažnai vadinama HPLC) analizė. Visų pirma, paruošti vandeniniai gliukozės (2 mg/ml) ir fruktozės (2mg/ml) standartiniai tirpalai. Jie įleisti į sistemos mobiliosios fazės srautą per automatinį inžektorių ir toliau tekėjo iki chromatografinės kolonėlės. Ją perėję tirpalai toliau pateko į detektorių, kuriame gautas elektrinis signalas buvo apdorojamas kompiuteriu. Su programine įranga buvo sudaryta standartinių cukrų tirpalų chromatograma pateikiama 3.1 paveiksle. Kadangi šalia tirtų monosacharidų tuo pačiu metu į sistemą buvo leidžiami ir sacharozės bei laktozės standartiniai tirpalai, jų duomenys taip pat matomi chromatogramoje. Tačiau šiame darbe nagrinėjami tik fruktozės ir gliukozės kiekiai tirtuose bandiniuose. Atlikus gautos chromatogramos analizę nustatytos fruktozės ir gliukozės sulaikymo stacionarioje fazėje trukmės (min.) bei smailių plotai (žr. 3.1 lentelę). Šie duomenys toliau naudojami vertinant redukuojančių cukrų kiekius nagrinėjamuose ekstraktuose. Skaičiavimai atlikti naudojant 2.1 formulę.



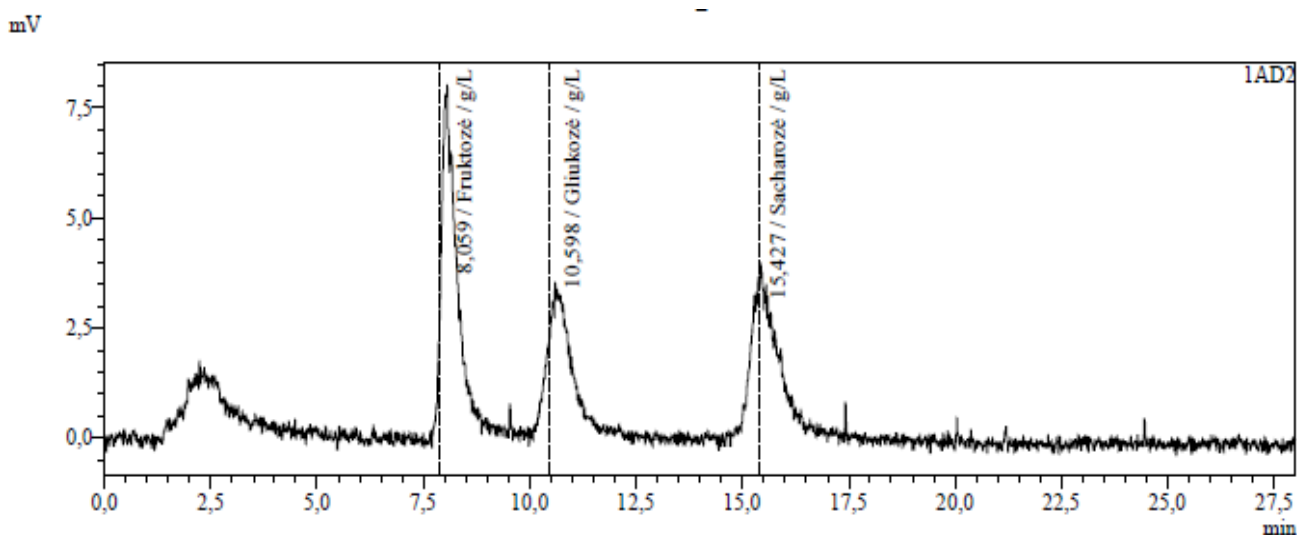
3.1 pav. Standartinių cukrų tirpalų chromatograma



**3.1 lentelė.** Standartinių fruktozės ir gliukozės tirpalų chromatogramos duomenys

Sacharido pavadinimas	Sulaikymo trukmė, min.	Smailės plotas
Fruktozė	8,026	3348748
Gliukozė	10,559	2328923

Turint standartų duomenis, per chromatografinę Shimadzu UFLC sistemą buvo perleisti tiriamųjų mėginių (žievių ekstraktų) tirpalai. Tikėtasi, kad abiejuose ekstraktuose turėtų būti tiek fruktozės, tiek gliukozės. Tai patvirtino gautos bananų žievių (3.2 pav.) ir obuolių žievelių (3.3 pav.) vandeninių ekstraktų chromatogramos ir jų duomenys (pateikti 3.2 ir 3.3 lentelėse, atitinkamai).

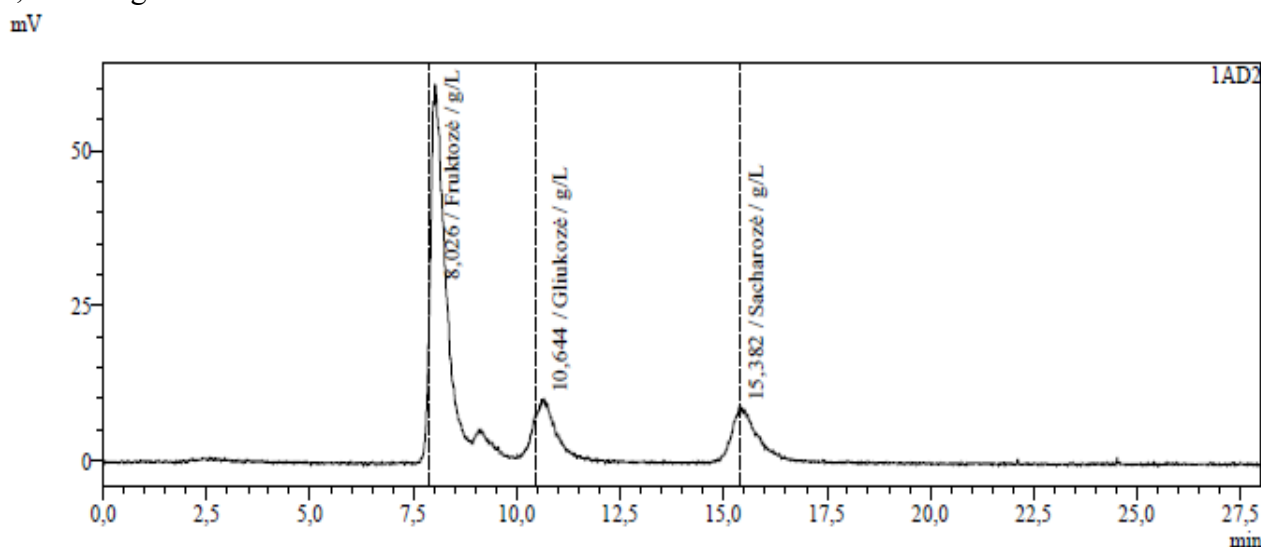


**3.2 pav.** Bananų žievių vandeninio ekstrakto chromatograma

**3.2 lentelė.** Bananų žievių vandeninio ekstrakto chromatogramos duomenys

Sacharido pavadinimas	Sulaikymo trukmė, min.	Smailės plotas
Fruktozė	8,059	42653
Gliukozė	10,598	11491

Atlikti skaičiavimai rodo, kad vandeniniame bananų žievių ekstrakto buvo 0,0424 % fruktozės ir 0,0164 % gliukozės.



**3.3 pav.** Obuolių žievelių vandeninio ekstrakto chromatograma

### 3.3 lentelė. obuolių žievelių vandeninio ekstrakto chromatogramos duomenys

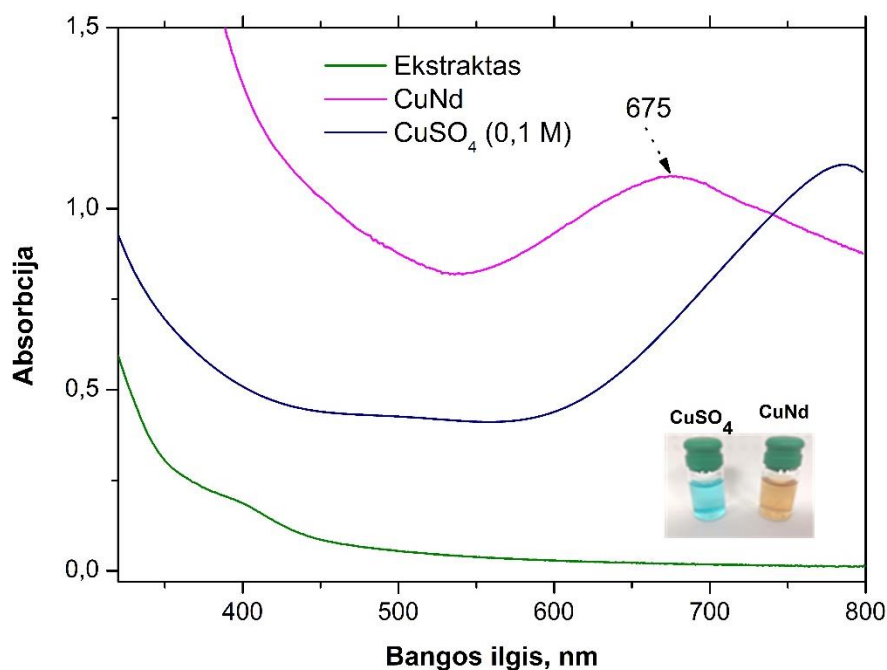
Sacharido pavadinimas	Sulaikymo trukmė, min.	Smailės plotas
Fruktozė	8,026	259221
Gliukozė	10,644	27802

Apskaičiuota, kad tirtame vandeniniame obuolių žievelių ekstrakto buvo 0,258 % fruktozės, o gliukozės – 0,0398 %.

Gavus šiuos rezultatus ir įvertinus fruktozės bei gliukozės (monosacharidų, gebančių Nds sintezėje dalyvauti kaip redukuojantys agentai) kiekius, nuspręsta tyrimus toliau vykdyti ir nanodalelių sintezę atlikti naudojant tik obuolių žievelių ekstraktą tikintis, kad tokiu būdu Ag ir Cu nanodalelių sintezė bus efektyvesnė. Be to, jei būtų svarstoma tolimesnius tyrimus atlikti, pavyzdžiui, su abiejų ekstraktų mišiniu, tam papildomai reikėtų įvertinti galimus sinergistinius ar antagonistinius ekstraktų medžiagų efektus bei kitus faktorius. Šiame pasirinktame obuolių žievelių ekstrakto fruktozės rasta maždaug 6 kartus daugiau nei bananų žievelių atveju, o gliukozės – maždaug 2,5 karto daugiau. Beje, tiek bananų, tiek obuolių žievelių ekstraktų chromatogramose matomos sacharozės smailės šio darbo metu nenagrinėjamos. Jos buvo užfiksuotos ir automatiškai kompiuterio programinės įrangos įvertintos, kadangi, kaip minėta anksčiau, prieš tai užrašant standartinių cukrų chromatogramą buvo nustatyti ir šio sacharido standarto duomenys.

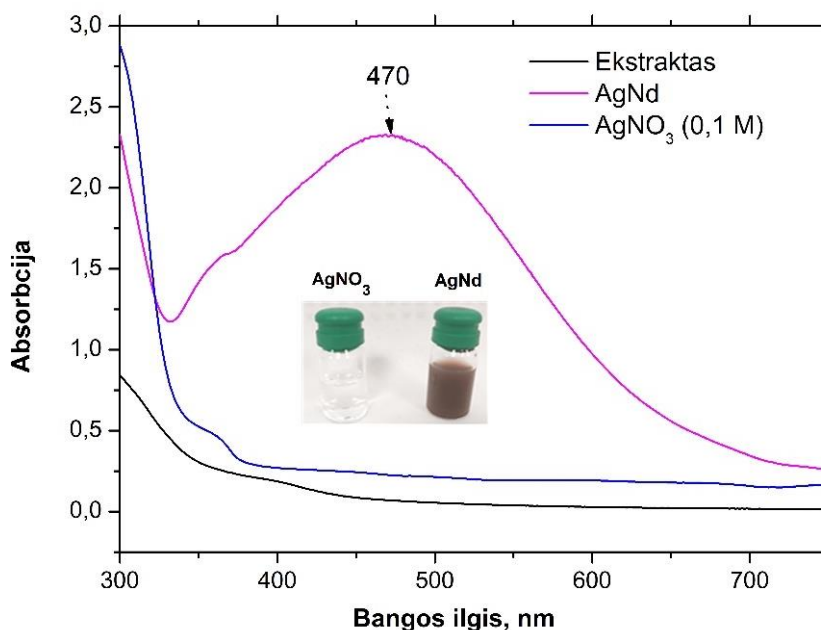
### 3.2. Varo ir sidabro nanodalelių sintezė ir jų optinių savybių analizė

Pasirinkus redukuojančių cukrų šaltiniu obuolių žievelių ekstraktą reikėjo įsitikinti, kad šio mišinio ir metalų druskų sąveika duos norimą rezultatą – bus sudarytos nanodalelės. Todėl buvo paruošti koloidiniai varo ir sidabro Nds tirpalai (žr. 2.3.3. skyrelyje pateiktą informaciją). Apie nanodalelių susidarymą galima spręsti iš akivaizdžių tirpalų spalvų pokyčių, tačiau tikslesnius duomenis galima gauti panaudojus UV-RŠ spektroskopijos metodą. Spektrofotometro duomenys pateikiami 3.4 ir 3.5 paveiksluose.



3.4 pav. Varo nanodalelių UV-RŠ spektrai

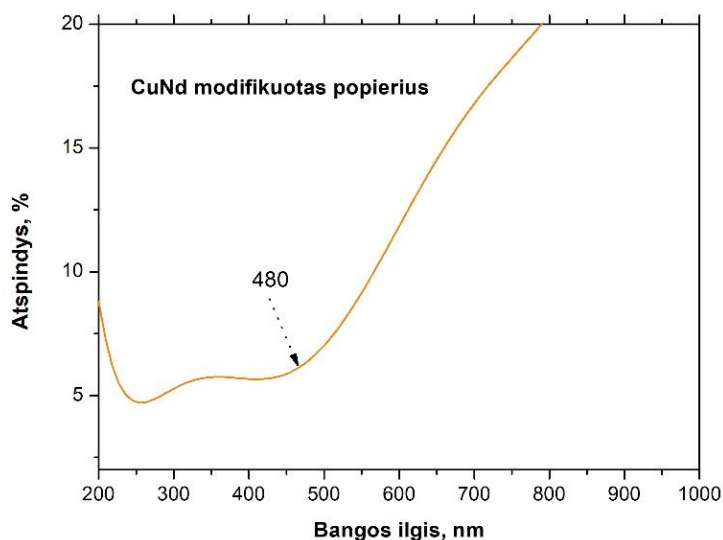
Vandeninio vario sulfato melsva tirpalo spalva, sumaišius jį su pagamintu augaliniu ekstraktu, tapo šviesiai ruda arba oranžine. Gauti Cu koloidinio tirpalo UV-RŠ spektrai patvirtina, kad susidarė Cu nanodalelės. Užfiksuota absorbcijos spektro viršūnė ties 675 nm bangos ilgiu yra netoli būdingo paviršinio plazmono rezonanso ruožo. Dažniausiai literatūroje pateikiamos 570–600 nm bangos ilgio šio reiškinio variacijos ribos [81]. Tačiau taip pat neretai pažymima, kad Cu Nds paviršiaus plazmono rezonanso fenomenas gali būti kontroliuojamas sintezės metu keičiant reakcijos laiką, pH ar vario sulfato santykį su paviršinio aktyvumo medžiaga [82], todėl tikėtina, kad tokį plazmono poslinkį nulėmė tam tikros reakcijos sąlygos. Beje, kaip kontrolė buvo užregistruoti ir obuolių žievelių ekstrakto bei  $\text{CuSO}_4$  tirpalų spektrai. Kad matomas paviršiaus plazmono rezonansas yra būtent vario nanodalelių, rodo ir būdingas kontrolinio  $\text{CuSO}_4$  mėginio absorbcijos spektro intensyvumas (piką pasiekia maždaug ties 780-790 nm bangos ilgiu [83]).



**3.5 pav.** Sidabro nanodalelių UV-RŠ spektrai

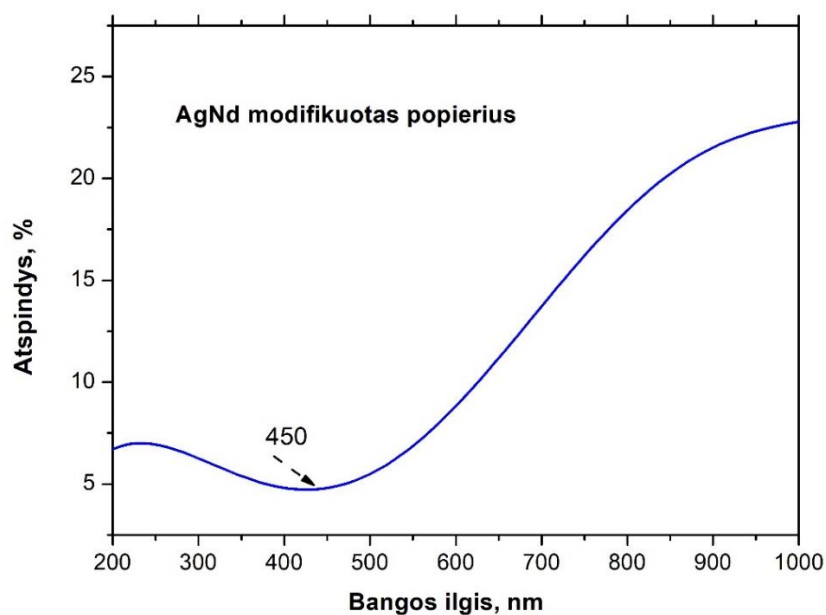
Sidabro nanodalelių susidarymas taip pat patvirtintas atlikus šį tyrimą. Koloidinio tirpalo spektro pikas yra ties 470 nm bangos ilgiu, o tai patenka į paprastai aptinkamų Ag nanodalelių nustatymo ribas (maždaug 410–490 nm [84]). Palyginimui buvo užfiksuoti ir obuolių žievelių ekstrakto bei sidabro nitrato absorbcijos spektrai. Beje, susidarant sidabro Nds bespalvis  $\text{AgNO}_3$  tirpalas tapo tamsiai rudos/violetinės spalvos.

UV-RŠ spektrofotometrijos analizė buvo atlikta ir po sekančio tyrimų žingsnio – popierinės pakuotės gabalėlių padengimo Cu ir Ag nanodalelėmis. Kadangi šiuo atveju tiriami neskystos formos bandiniai, buvo panaudotas prie spektrofotometro Cary 60 pritaikomas zondas. Atliekant šiuos matavimus buvo taikomas atspindžio režimas, todėl ir gaunami atspindžio spektrai. Šie duomenys pateikiami 3.6 ir 3.7 paveiksluose (padengimo Cu ir Ag nanodalelėmis, atitinkamai).



**3.6 pav.** Cu Nds padengto popieriaus UV-RŠ atspindžio spektras

Atlikus vario nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių atspindžio matavimus, užfiksuotas paviršiaus plazmono rezonanso efektas, būdingas šioms nanodalelėms. Šis efektas atsiranda dėl metalų nanodalelių laidumo elektronų sąveikos su būdingais fotonais, o tokia sąveika (bei plazmono pozicija) priklauso nuo Nds formos ir dydžio bei nuo terpės prigimties ir sudėties [85].



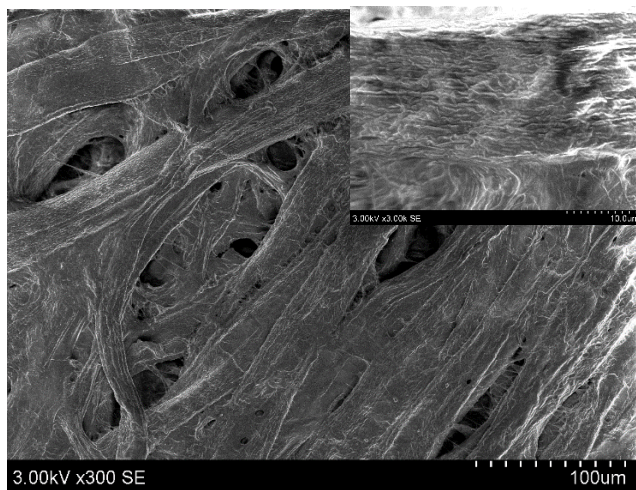
**3.7 pav.** Ag Nds padengto popieriaus UV-RŠ atspindžio spektras

Tokį efektą parodė ir sidabro nanodalelėmis padengtų pakuotės gabalėlių analogiški matavimai. 3.6 ir 3.7 paveiksluose matomi pikai atspindžio spektruose rodo, kad popierinės pakuotės gabalėliai buvo sėkmingai impregnuoti tiek vario, tiek sidabro nanodalelėmis. Beje, kaip ir vario, taip ir sidabro Nds atveju, matomas paviršiaus plazmono rezonanso pikas yra būdingas Ag Nds.

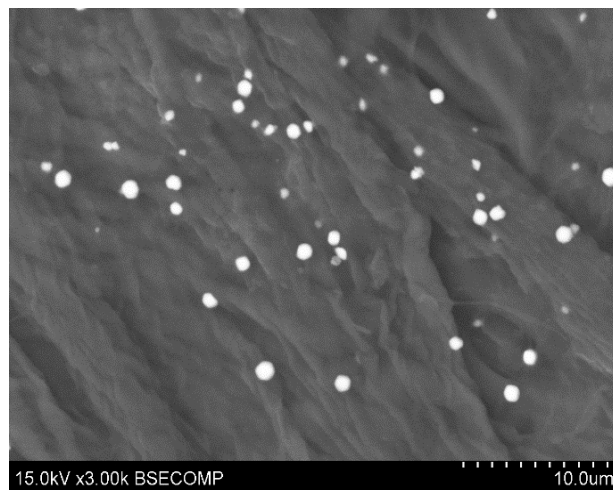
### **3.3. Vario ir sidabro nanodalelių morfologinės ir elementinės sudėties tyrimai**

Užfiksavus ir atpažinus būdingus Cu ir Ag nanodalelių plazmonų pikus, šiam faktui patvirtinti bei gilesnei analizei buvo atliktas skenuojančios elektroninės mikroskopijos (SEM) tyrimas, kuriuo buvo vertinama morfologija. Elementinės sudėties analizei pasitelktas EDS metodas.

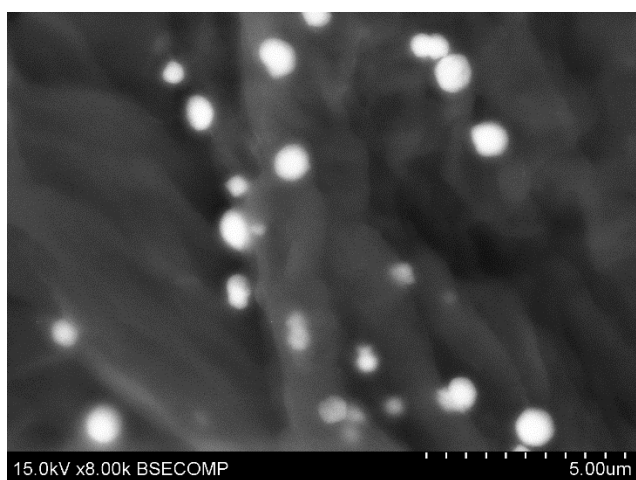




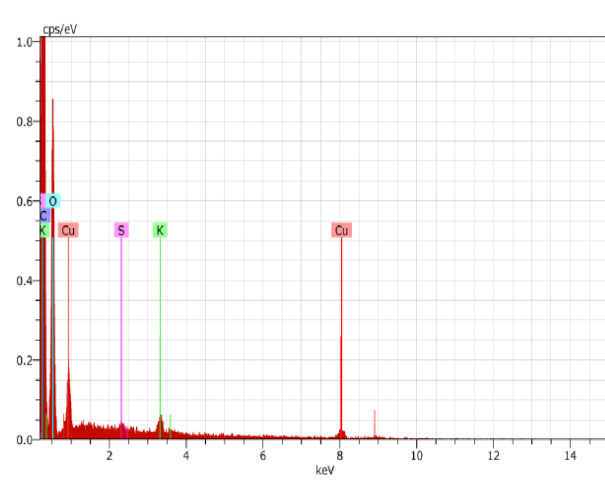
a)



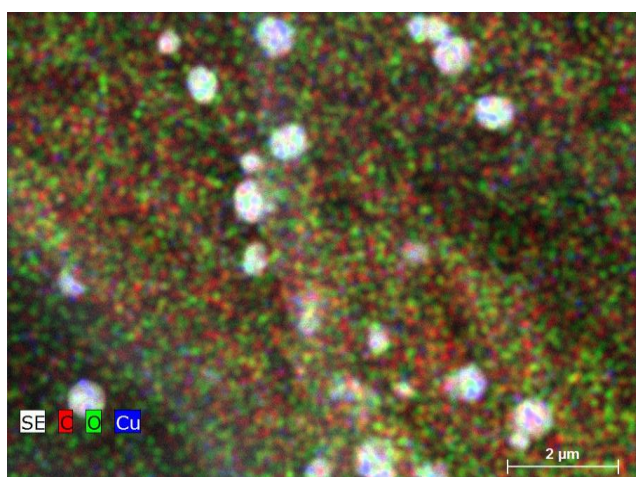
b)



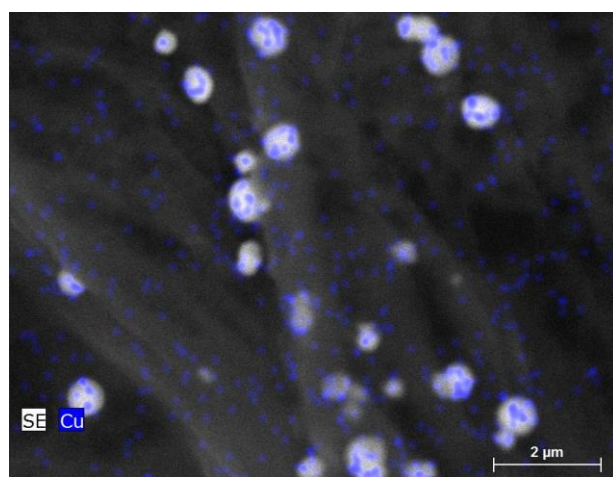
c)



d)



e)



f)

**3.8 pav.** Vario nanodalelių morfologija ir elementinė sudėtis: **a)** kontrolės SEM vaizdai; **b)** ir **c)** Cu Nds SEM vaizdai; **d)** EDS spektras; **e)** cheminių elementų pasiskirstymo bandinyje žemėlapis; **f)** Cu pasiskirstymo bandinyje žemėlapis

Pateiktame 3.8 paveiksle sukoncentruoti pagrindiniai vario nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių SEM ir EDS tyrimų duomenys. Paveikslo a) dalyje pateiktos kontrolinio

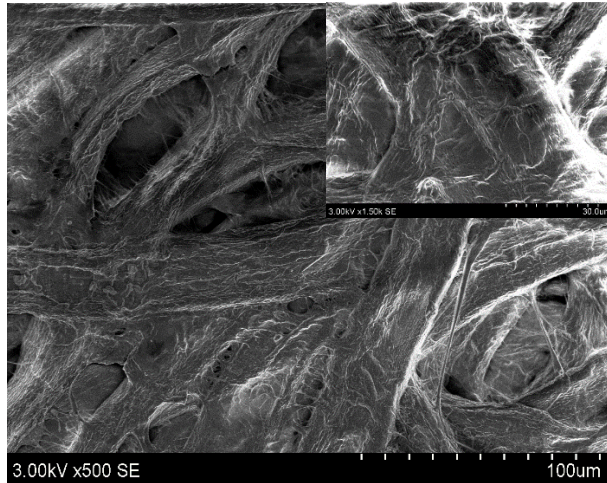
nepadengto nanodalelėmis pakuotės gabalėlio nuotraukos: stambesniu planu vaizdas pateiktas 100  $\mu\text{m}$  masteliu priartinus 300 kartų, o viršutiniame kampe dešinėje – mastelis yra 10,0  $\mu\text{m}$  ir vaizdas priartintas 3000 kartų. Toks vaizdas gana ryškiai pakinta, kai popierinė pakuotė yra impregnuojama vario nanodalelėmis. Paveikslo b) ir c) dalyse pateikti šiomis Nds padengtų popieriaus gabalėlių SEM nuotraukos, iš kurių b) dalyje vaizduojamas bandinio mastelis yra 10,0  $\mu\text{m}$  (3000 kartų priartinimas), o c) dalies vaizdo mastelis – 5,00  $\mu\text{m}$  (8000 kartų priartinimas). Sekantys vaizdai yra gauti su EDS detektoriaus pagalba. Paveikslo e) dalyje pateikiamas bandinio paviršiuje pasiskirsčiusių cheminių elementų žemėlapis, o f) – vario dalelių išsidėstymas. Paveikslo d) dalyje vaizduojamas EDS užfiksuotas spektras, kurio duomenys pateikiami 3.4 lentelėje.

**3.4 lentelė.** EDS užfiksuotų elementų pasiskirstymas (Cu Nds modifikacija)

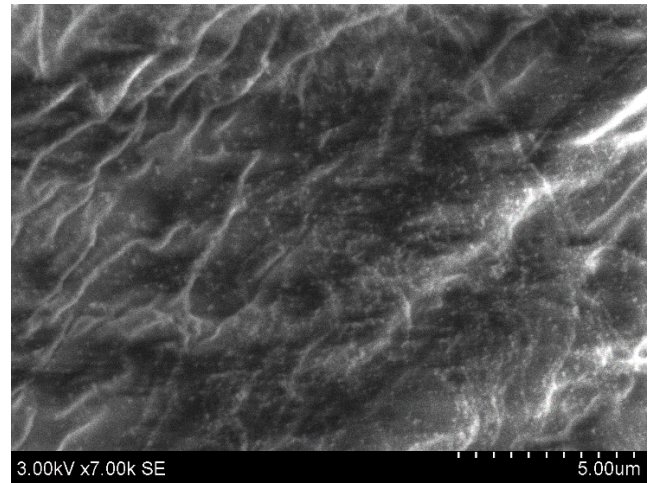
Elementas	Kiekis bandinyje, atominiais procentais (at. %)
Varis	1,92
Kalis	0,47
Anglis	49,95
Deguonis	47,51
Siera	0,15

Ant modifikuoto Cu nanodalelėmis popieriaus gabalėlio paviršiaus daugiausiai yra anglies ir deguonies (po 49,95 at. % ir 47,51 at. %, atitinkamai), taip pat šiek tiek kalio ir sieros dalelių. Jos gali būti matomos dėl paties popieriaus paviršiaus ypatybių. Tirtame bandinio paviršiaus plote užfiksuota apytiksliai 2 at. % vario dalelių. Tai irgi parodo, kad šių nanodalelių sintezė ant popieriaus paviršiaus įvykdyta sėkmingai.

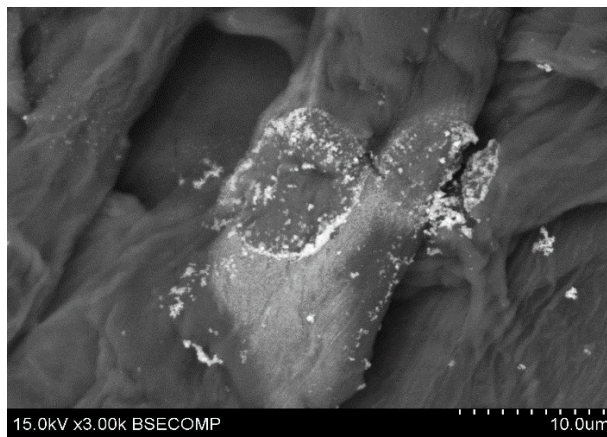




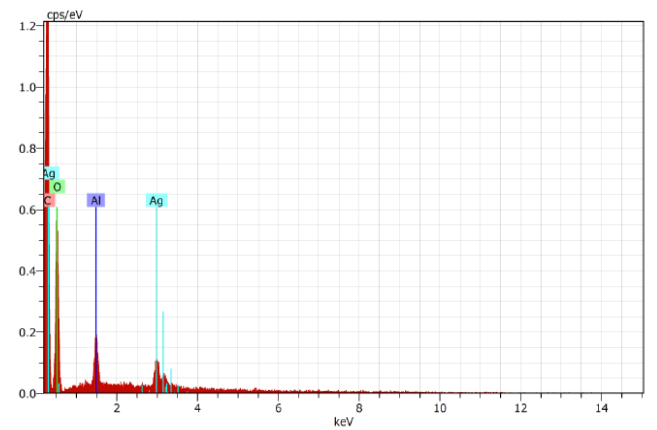
a)



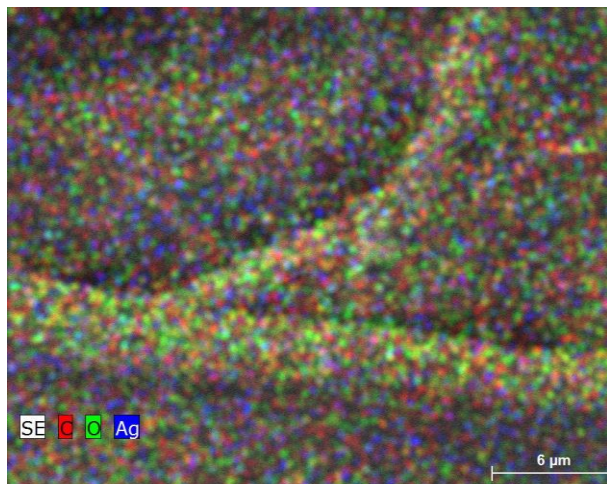
b)



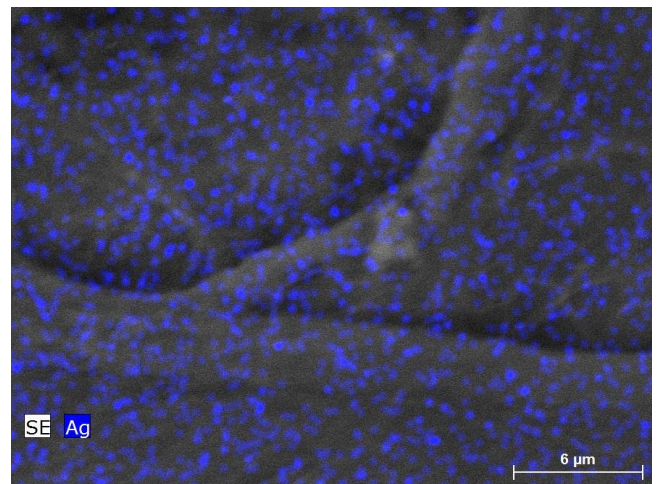
c)



d)



e)



f)

**3.9 pav.** Sidabro nanodalelių morfologija ir elementinė sudėtis: **a)** kontrolės SEM vaizdai; **b)** ir **c)** Ag Nds SEM vaizdai; **d)** EDS spektras; **e)** cheminių elementų pasiskirstymo bandinyje žemėlapis; **f)** Ag pasiskirstymo bandinyje žemėlapis

Sidabro nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių SEM ir EDS tyrimų duomenys pateikiami 3.9 paveiksle. Jame a) dalyje vaizduojamas kontrolinio popierinės pakuotės gabalėlio paviršius: stambesniu planu yra rodoma 100  $\mu\text{m}$  mastelio 500 kartų padidinta nuotrauka, dešiniajame viršutiniame kampe – nuotraukos mastelis yra 30,0  $\mu\text{m}$  ir yra padidinta 1500 kartų. Nors b) paveikslo dalyje (mastelis 5,00  $\mu\text{m}$ , padidinta 7000 kartų) sidabro dalelės nėra matomos labai aiškiai, tačiau šį vaizdą užfiksavus naudojant kitą SEM režimą (vietoj 3,00 kV naudojant 15,00 kV įtampą) ir pasirinkus 10,0  $\mu\text{m}$  mastelį bei 3000 kartų priartinus, Ag dalelių vaizdas tampa kokybiškesnis (3.9 pav. c) dalis). Jame išryškėja tai, kad kai kurios sidabro Nds yra susiagregavusios, o tai irgi paaikšina 3.5 bei 3.7 paveiksluose vaizduojamų plazmonų pozicijas (dėl Ag Nds agregatų susidarymo matomi būtent tokie plazmonų išplatėjimai ir padėty). Beje, 3.9 paveikslo c) dalyje matomos Ag Nds yra kur kas mažesnės nei to paties mastelio ir priartinimo 3.8 paveikslo b) dalyje vaizduojamos Cu Nds. Kaip ir 3.8 paveikslo vaizdų išdėstyme, aptariamame 3.9 paveiksle e) ir f) dalyse pateikiami tiriamo bandinio paviršiuje pasiskirsčiusių cheminių elementų ir sidabro nanodalelių, atitinkamai, žemėlapiiai. Taip pat ir paveikslo d) dalyje pateikiamas EDS spektras. Jo duomenys pateikiami 3.5 lentelėje.

**3.5 lentelė.** EDS užfiksuotų elementų pasiskirstymas (Ag Nds modifikacija)

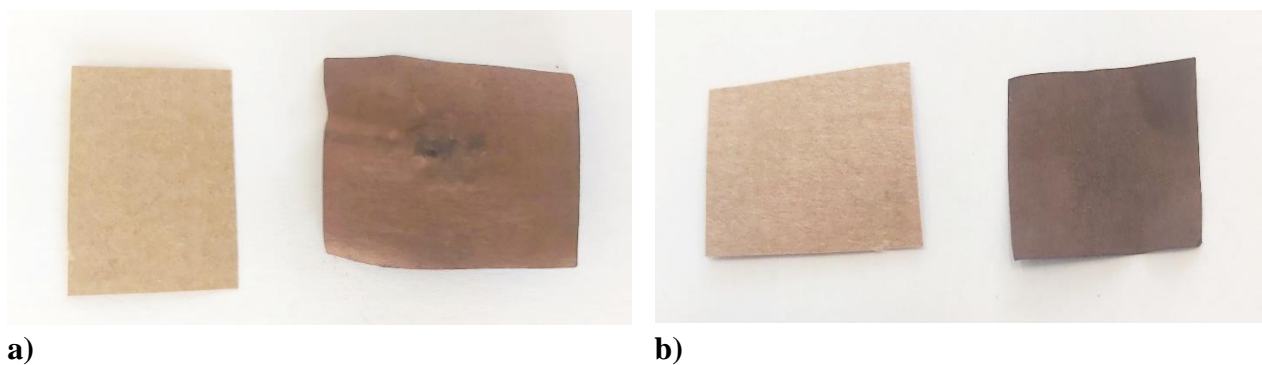
Elementas	Kiekis bandinyje, atominiais procentais (at. %)
Anglis	57,31
Deguonis	40,88
Sidabras	0,71
Aliuminis	1,10

Sidabro nanodalelių modifikacijos atveju EDS metodu aptikti keturi elementai. Kaip ir Cu nanodalelių modifikacijos užfiksuotame EDS spektre, taip ir šio mėginio pavirši daugiausiai užima anglis (57,31 at. %) bei deguonis (40,88 at. %). Labai tikėtina, kad taip yra dėl popierinės pakuotės paviršiaus specifikos. Taip pat užfiksuota ir šiek tiek aliuminio (1,10 at. %). Tuo metu sidabro dalelių kiekis tiriamo bandinio paviršiuje yra mažiausias – sudaro tik 0,71 atominį procentą. Gali būti, kad tam įtakos turi dalelių dydis. Vertinant SEM nuotraukas tiek Cu, tiek Ag nanodalelių modifikacijos ant popierinės pakuotės gabalėlių to paties mastelio vaizduose, kaip jau minėta, gana ryškiai matomas Nds dydžių skirtumas (vario dalelės vizualiai atrodo didesnės už sidabro). O EDS žemėlapiuose (vertinant 3.8 ir 3.9 paveikslų f) dalis) paplitimo prasme sidabro dalelės matomos labiau išplitusios paviršiuje nei vario. Vis dėlto neatmetama ir tikimybė, kad spektrų duomenys galėjo būti užfiksuoti tiriamų mėginių paviršių dalyse, kurios atsitiktinai turėjo mažesnę ar didesnę nagrinėtų dalelių kiekį.

### 3.4. Susintetintų nanodalelių antibakterinių savybių tyrimas

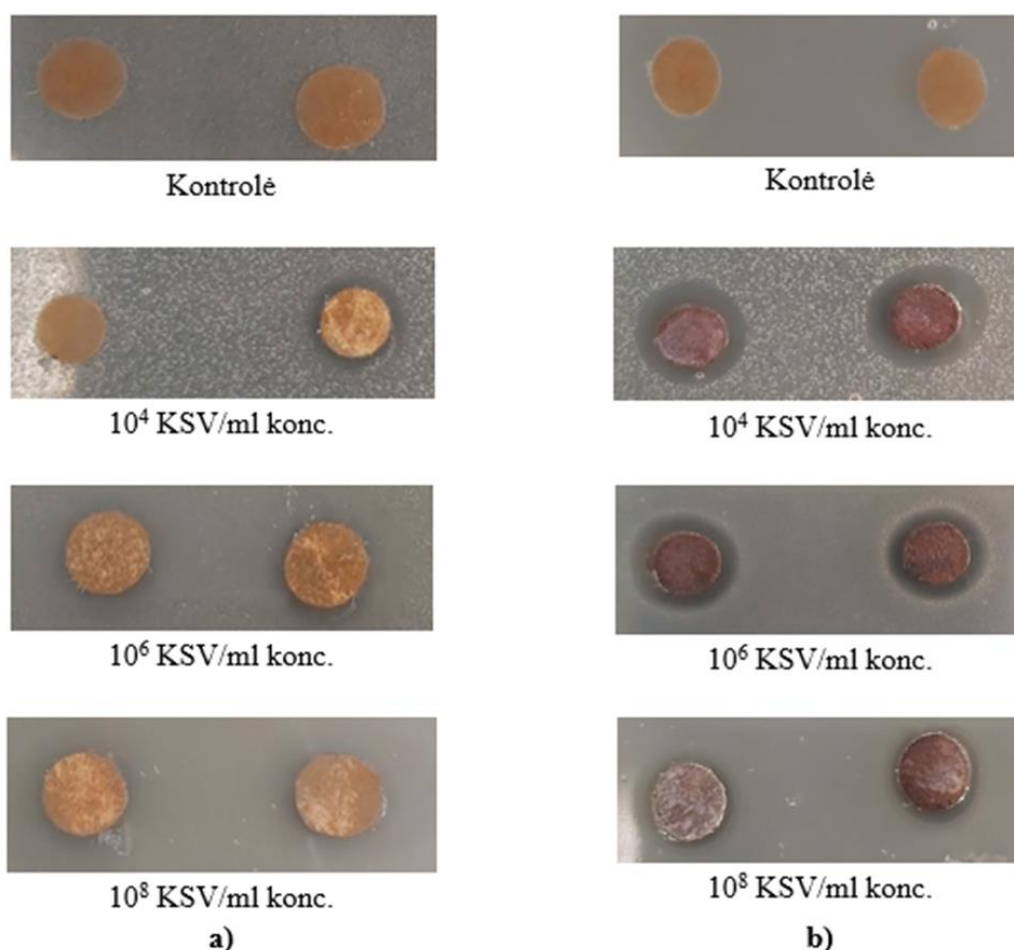
Vario ir sidabro nanodalelių, susintetintų ant popierinės pakuotės gabalėlių, antibakterinis tyrimas atliktas klasikiniu difuzijos į agarą metodu (žr. 2.3.7 skyrelio informaciją), kurio metu vertinamas tam tikro mikroorganizmo, auginamo ant mitybinės terpės arba joje, poveikis tiriamajam objektui (arba atvirkščiai). Šio darbo metu tirtų objektų – Cu ir Ag nanodalelėmis padengtų pakuočių – vaizdai pateikiami 3.10 paveiksle.





**3.10 pav.** Nanodalelėmis impregnuoti popierinės pakuotės gabalėliai: **a)** kairėje – kontrolė, dešinėje – popieriaus modifikacija Cu Nds; **b)** kairėje – kontrolė, dešinėje – popieriaus modifikacija Ag Nds

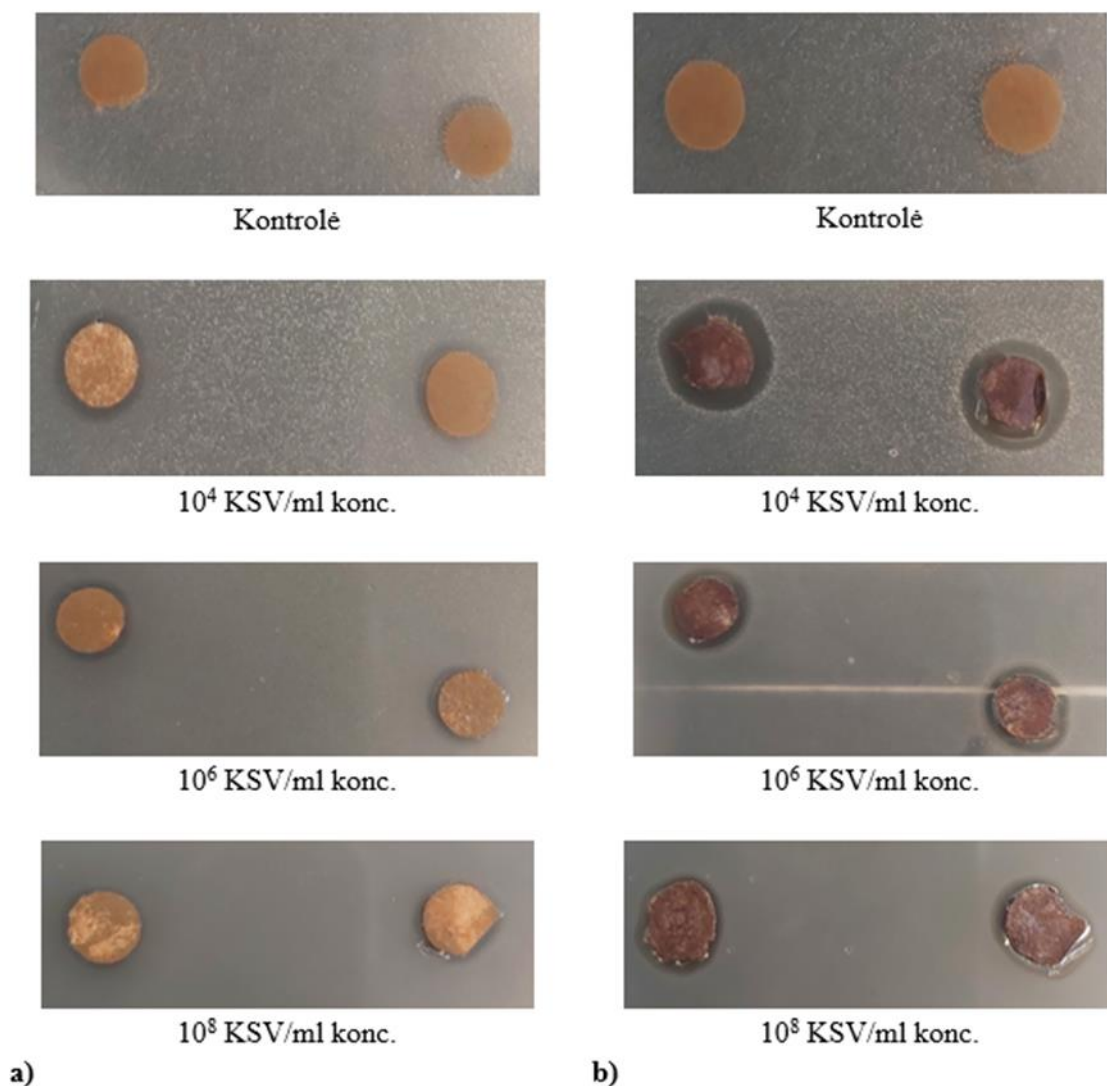
Mikrobiologiniam susintetintų nanodalelių įvertinimui pasirinktos dvi gramneigiamos (lot. *S. typhimurium* ir *E. coli*) bei dvi gramteigiamos (lot. *B. subtilis* ir *S. aureus*) bakterijų rūšys. Šios bakterijos yra dažnai nagrinėjamos literatūroje. Mokslininkų dėmesys joms yra skiriamas dėl jų savybių veikti kaip patogenai, o jų paplitimas aplinkoje yra didelis. Antibakterinių savybių tyrimų rezultatai pateikiami 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 paveiksluose.



**3.11 pav.** Antibakterinis nanodalelių poveikis prieš *S. typhimurium*: **a)** Cu Nds; **b)** Ag Nds

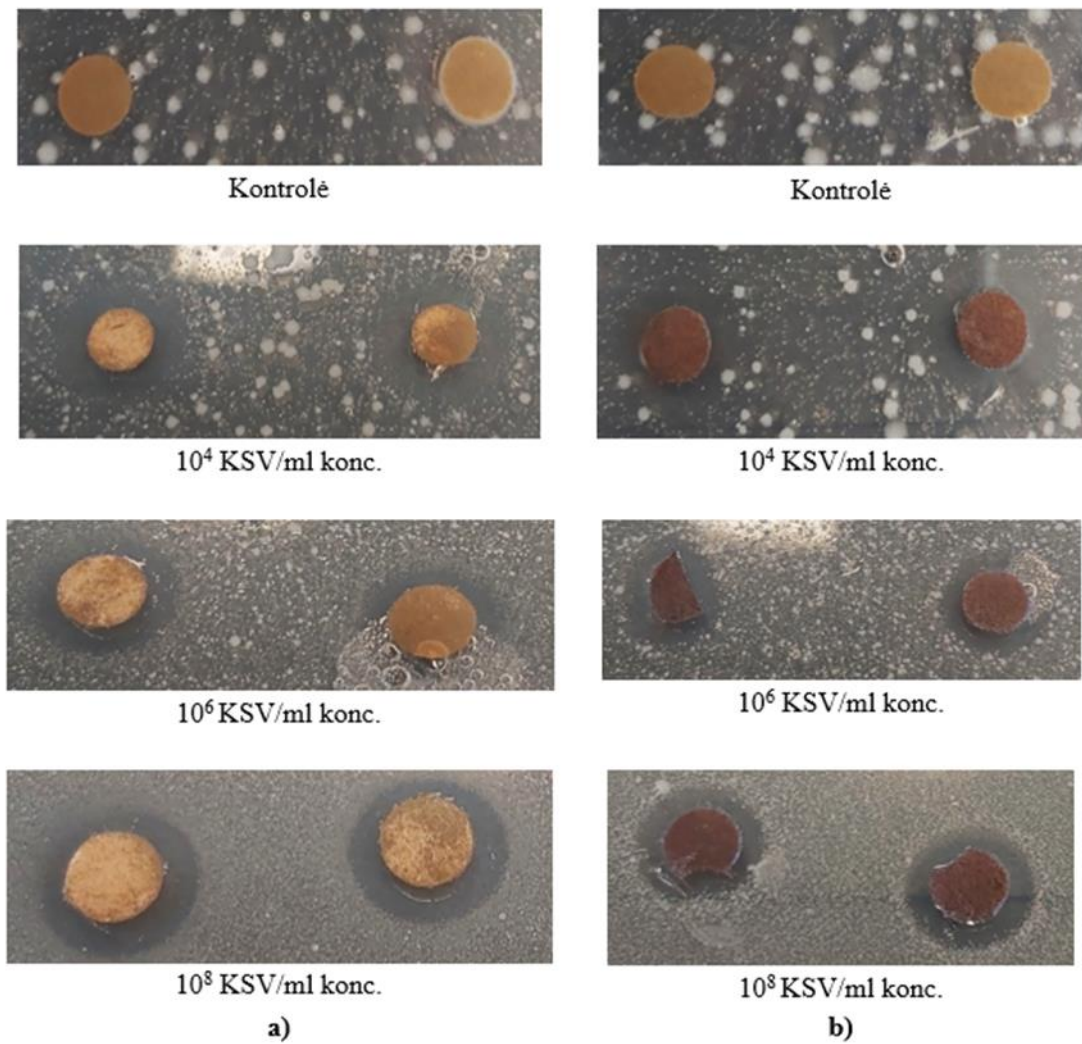
Paveiksle 3.11 pateikiami vaizdai, kuriuose matomas *S. typhimurium* bakterijos poveikis vario (a) paveikslo dalis) ir sidabro (b) paveikslo dalis) nanodalelėmis padengtiems popierinės pakuotės gabalėliams. Kaip ir tikėtasi, kontroliniai mėginių pavyzdžiai antibakterinio aktyvumo neparodė.

Tačiau nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių atvejais susiformavo skaidrios zonos. Gana akivaizdu, kad stipresnį antibakterinį poveikį *Salmonella typhimurium* bakterijai šio tyrimo metu sukėlė sidabro nanodalelėmis padengtos pakuotės gabalėliai.



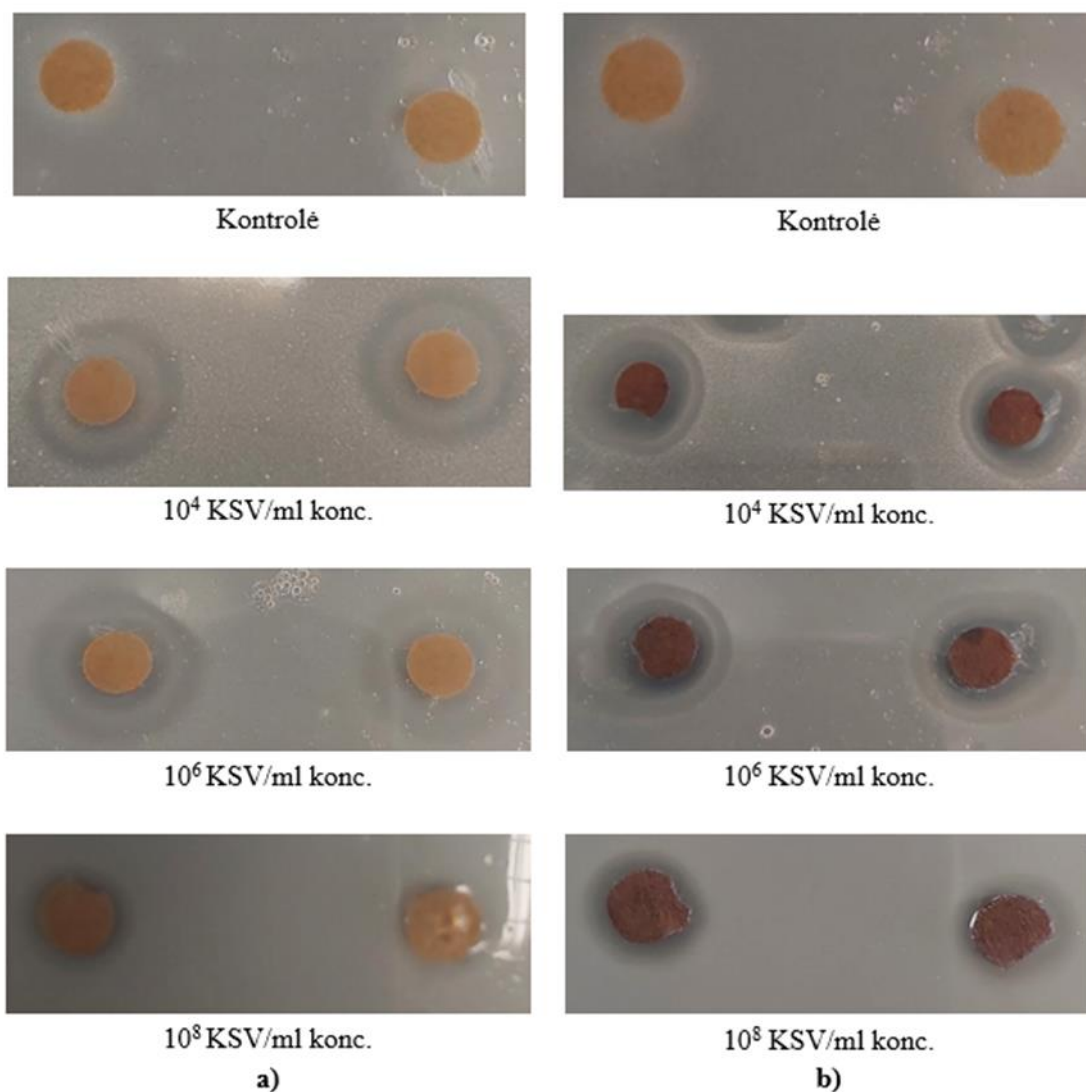
**3.12 pav.** Antibakterinis nanodalelių poveikis prieš *E. coli*: **a)** Cu Nds; **b)** Ag Nds

Kitos gramneigiamos bakterijos atveju (lot. *Escherichia coli*), matomi panašūs rezultatai: kontroliniai mėginiai antibakteriškai neaktyvūs, o nanodalelėmis padengtų pakuočių gabalėlių pavyzdžiai – aktyvūs. Kaip ir 3.11 paveikslu nuotraukose, taip ir šiame paveiksle matoma, kad geresnį antibakterinį aktyvumą prieš *E. coli* bakterijas parodė Ag nanodalelėmis padengti pakuotės gabalėliai. Beje, abiejų paveikslų nuotraukų vaizduose išryškėja tendencija, kad antibakterinis nanodalelių poveikis mažėja didėjant šių gramneigiamų bakterijų koncentracijai. Galima daryti prielaidą, kad antibakterinis nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių poveikis priklauso nuo veikiančių bakterijų koncentracijos.



**3.13 pav.** Antibakterinis nanodalelių poveikis prieš *B. subtilis*: a) Cu Nds; b) Ag Nds

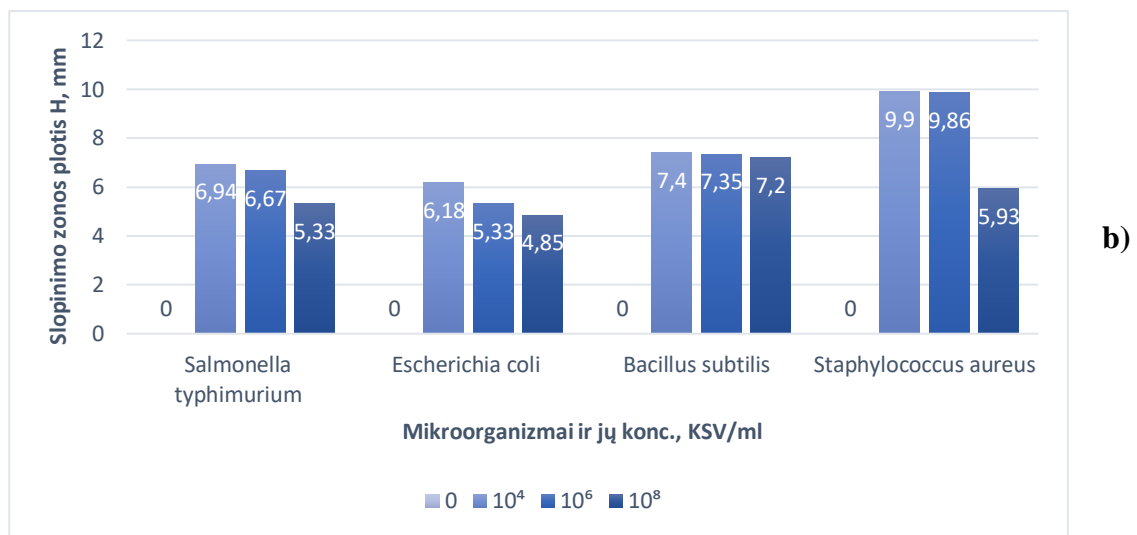
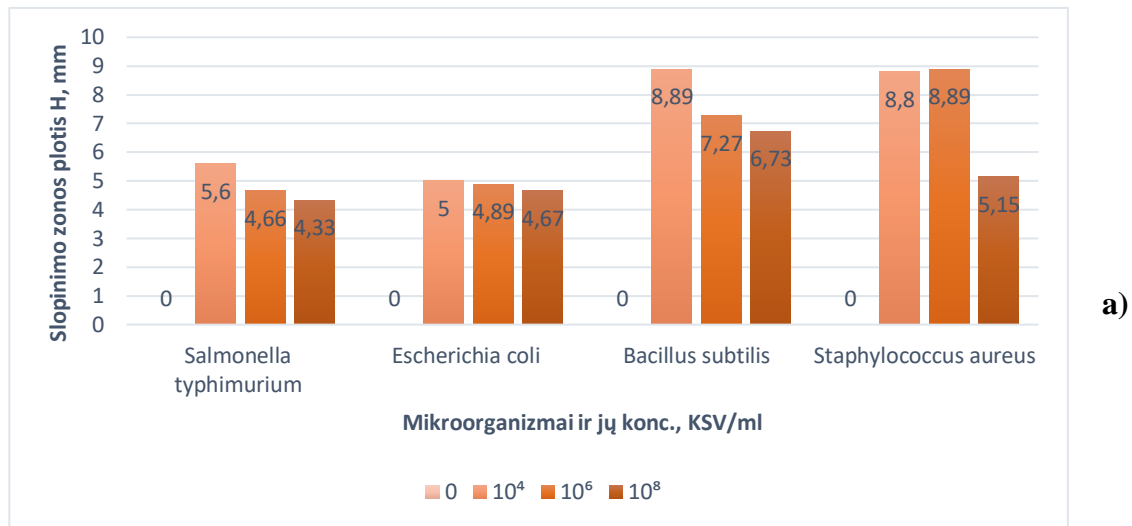
Paveiksle 3.13 pateikiama informacija apie vario (a) ir sidabro (b) nanodalelėmis padengtų pakuotės gabalėlių antibakterinį aktyvumą prieš *Bacillus subtilis*. Ir šios bakterijos atveju kontroliniuose mėginiuose skaidrios zonos nesusiformavo (antibakterinio poveikio nebuvo). Tiek Cu, tiek Ag nanodalelėmis modifikuotų pakuotės gabalėlių atveju, užfiksuotas ryškus antibakterinis aktyvumas. Beje, matomas poveikis abiem atvejais yra gana panašaus stiprumo.



**3.14 pav.** Antibakterinis nanodalelių poveikis prieš *S. aureus*: a) Cu Nds; b) Ag Nds

Atlikus tyrimus ir su *Staphylococcus aureus* bakterijomis, kurios, kaip ir *B. subtilis*, yra gramteigiamos, gauti duomenys pateikiami 3.14 paveiksle. Kontrolės atveju, antibakterinis aktyvumas neužfiksuotas. Tuo metu nanodalelėmis impregnuotų pakuotės gabalėlių pavyzdžiai suformavo skaidrias zonas. Esant bakterijos koncentracijoms  $10^4$  ir  $10^6$  KSV/ml išryškėjo žiedinės panašaus dydžio skaidrios zonos, o  $10^8$  KSV/ml koncentracijos atveju – skaidrios zonos yra menkesnės ir papildomi skaidrūs žiedai nėra pastebimi. Gali būti, kad šių tyrimų gramteigiamų bakterijų atveju, keičiantis bakterijų koncentracijoms antibakterinis nanodalelių poveikis nėra priklausomas nuo bakterijų kiekio, tačiau pasiekus tam tikrą bakterijų koncentraciją vis dėlto šis poveikis gali sumažėti. Todėl papildžius anksčiau padarytą prielaidą galima teigti, jog antibakterinis nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių poveikis priklauso nuo veikiančių tam tikrų rūšių bakterijų koncentracijos.

Tai patvirtina ir 3.15 paveiksle pateiktos stulpelinės diagramos, kuriose parodomi tyrimo metu įvertinti slopinimo zonų pločiai. Toks antibakterinio poveikio nustatymas yra gana apytikslis, tačiau šios vertės leidžia pakankamai objektyviai vertinti tirtų nanodalelių daromos įtakos skirtingoms bakterijoms santykinius rezultatus.



**3.15 pav.** Slopinimo zonų pločių įvertinimas a) Cu Nds ir b) Ag Nds paveiktoms bakterijoms

Slopinimo zonų pločių įverčiai rodo jau anksčiau paminėtą tendenciją, kad augant bakterijų koncentracijoms, vario ir sidabro nanodalelių antibakterinis poveikis silpnėja. Tirtose bakterijose šis poveikis silpnėja gana lėtai, tačiau skirtingose bakterijų kultūrose šis silpnėjimas yra skirtingas. Ryškiau išsiskiria *Staphylococcus aureus* rodmenys – bakterijos koncentracijoms esant 10<sup>4</sup> ir 10<sup>6</sup> KSV/ml, skaidrios zonos, atsiradusios paveikus Cu ir Ag Nds impregnuotos popierinės pakuotės gabalėliais, yra gana artimos viena kitai. Tačiau 10<sup>8</sup> KSV/ml koncentracijos atveju antibakterinis aktyvumas pastebimai sumažėja. Gali būti, kad tam įtakos turi specifinės šios bakterijos ypatybės, ypač tai, kad tai vienintelė apvalios globulės formos bakterija iš visų šiame darbe tirtų. 3.15 paveiksle taip pat galima pastebėti ir tai, jog tirtos gramteigiamos bakterijos šiais atvejais parodė stipresnį antibakterinį aktyvumą nei tų pačių koncentracijų tirtos gramneigiamos bakterijos. Tai galimai priklauso nuo bakterijų ląstelių sienelių savybių. Pavyzdžiui, yra žinoma, kad daugeliui antibiotikų fizinį barjerą sudaro gramneigiamų bakterijų išorinė membrana, kurios sudėtyje yra fosfolipidų bei lipopolisacharidų. Gramteigiamų bakterijų peptidoglikanų sluoksnis ir vidinė membrana yra lengviau pereinami antibakterinių komponentų turinčių antibiotikų [87]. Taigi, nanodalelių poveikio stiprumui tirtoms bakterijoms įtakos taip pat galėjo turėti ir šios membranų ypatybės.



#### **4. Rekomendacijų dalis**

1. Vario ir sidabro nanodalelių sintezei rekomenduojama naudoti ne tik augalinės, tačiau ir gyvūninės ar jūrinės kilmės maistines atliekas.
2. Rekomenduojama atlikti metalų nanodalelėmis impregnuotų pakuočių popieriaus įtakos tyrimus gerųjų bakterijų gyvybingumui nustatyti.
3. Rekomenduojama atlikti metalų nanodalelių migracijos į maisto produktą tyrimus, siekiant užtikrinti maisto produkto saugą.
4. Nanodalelių sintezei rekomenduojama naudoti šviežiai paruoštus antrinių žaliavų ekstraktus.
5. Rekomenduojama atlikti išsamius antrinių žaliavų kokybinius ir kiekybinius tyrimus, siekiant identifikuoti metalų jonus redukuojančias medžiagas.

## Išvados

1. Antrinės maistinės žaliavos tyrimams buvo pasirinktos bananų ir obuolių žievės, tačiau įvertinus jų pagamintų ekstraktų vario ir sidabro jonus redukuojančių cukrų kokybinę ir kiekybinę sudėtį, tolimesniems tyrimams pasirinktas obuolių žievelių ekstraktas, kurio sudėtyje rasta 0,258 % fruktozės ir 0,0398 % gliukozės.
2. Panaudojant obuolių žievelių ekstraktą, susintetintos vario ir sidabro nanodalelės, kurių ultravioletinės – regimosios šviesos spektroskopijos metodo absorbcijos spektrai užfiksavo būdingus paviršiaus plazmono rezonanso ruožus: vario spektro piko viršūnė buvo ties 675 nm bangos ilgio, o sidabro – ties 470 nm bangos ilgio. Vertinant nanodalelių morfologiją, naudotas skenuojančios elektroninės mikroskopijos metodas, kurio sugeneruoti vaizdai patvirtino nanodalelių sintezės faktą.
3. Atlikus literatūros analizę ir paruoštų ekstraktų kokybinius ir kiekybinius tyrimus, buvo sukurta popierinių pakuočių impregnavimo vario ir sidabro nanodalelėmis metodika.
4. Padengus popierinės pakuotės gabalėlius vario ir sidabro nanodalelėmis, jų ultravioletinės – regimosios šviesos spektroskopijos metodo atspindžio spektrais buvo nustatytos būdingų paviršiaus plazmono rezonanso pikų viršūnės: vario nanodalelėmis modifikuotos popierinės pakuotės atveju ties 480 nm bangos ilgio, o sidabro – ties 450 nm bangos ilgio. Skenuojančio elektroninio mikroskopo nuotraukos, pateikiančios informaciją apie paviršiaus morfologiją, patvirtino, kad nanodalelėmis buvo sėkmingai impregnuoti popierinės pakuotės gabalėliai.
5. Vario ir sidabro nanodalelėmis padengtų popierinės pakuotės gabalėlių antibakterinis aktyvumas buvo įvertintas prieš patogenines *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ir *Staphylococcus aureus* bakterijas, kurios visos buvo paveiktos baktericidiškai. Poveikio stiprumas nuo veikiančių tam tikrų rūšių bakterijų koncentracijos.

## Literatūros sąrašas

1. BINTSIS, T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 3(3), 529-563 [žiūrėta 2020-05-30]. Prieiga per doi: [10.3934/microbiol.2017.3.529](https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529)
2. BAJAJ, S. ir DUDEJA, P. Food poisoning outbreak in a religious mass gathering. *Medical Journal Armed Forces India* [interaktyvus]. 2019, 75(3), 339-343 [žiūrėta 2020-05-30]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2018.12.015>
3. DALLMAN, T. J. ir kiti. An Investigation of the Diversity of Strains of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Cases Associated with a Large Multi-Pathogen Foodborne Outbreak in the UK. *PLoS ONE* [interaktyvus]. 2014, 9(5), e98103 [žiūrėta 2020-05-30]. Prieiga per doi: [10.1371/journal.pone.0098103](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098103)
4. WU, G. ir kiti. Epidemiology of foodborne disease outbreaks from 2011 to 2016 in Shandong Province, China. *Medicine (Baltimore)* [interaktyvus]. 2018, 97(45), e13142. Prieiga per doi: [10.1097/MD.00000000000013142](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013142)
5. Food safety [interaktyvus]. 30/04/2020 [žiūrėta 2020-05-30]. Prieiga per: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
6. Foodborne Pathogens [interaktyvus]. 03/05/2020 [žiūrėta 2020-05-30]. Prieiga per: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>
7. HANNING, I. B. ir kiti. Chapter 26 - Probiotics and Heart Health: Reduction of Risk Factors Associated with Cardiovascular Disease and Complications Due to Foodborne Illnesses. *Bioactive Foods in Promoting Health, Probiotics and Prebiotics* [interaktyvus]. 2010, 423-439 [žiūrėta 2020-05-31]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00026-8>
8. SCHIRONE, M. ir kiti. Editorial: Foodborne Pathogens: Hygiene and Safety. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2019, 10:1974 [žiūrėta 2020-05-31]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2019.01974](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01974)
9. SMITH, J. L. ir FRATAMICO, P. M. Emerging and Re-Emerging Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease* [interaktyvus]. 2018, 15(12) [žiūrėta 2020-05-31]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2493>
10. HORN, N. ir BHUNIA, A. K. Food-Associated Stress Primes Foodborne Pathogens for the Gastrointestinal Phase of Infection. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 9, 1962 [žiūrėta 2020-05-31]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2018.01962](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01962)
11. GREEN-JOHNSON, J. M. Nonspecific host defenses against foodborne pathogens, Food Consumption and Disease Risk, (Consumer–Pathogen Interactions). *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* [interaktyvus]. 2006, 183-213 [žiūrėta 2020-06-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1533/9781845692025.2.183>
12. SAFAVIEH, M. ir kiti. Microfluidic biosensors for high throughput screening of pathogens in food, High Throughput Screening for Food Safety Assessment, (Biosensor Technologies, Hyperspectral Imaging and Practical Applications). *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and*



- Nutrition* [interaktyvus]. 2015, 327-357 [žiūrėta 2020-06-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-801-6.00015-0>
13. BARAKETI, A. ir kiti. Foodborne Pathogens Detection: Persevering Worldwide Challenge, Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis. *IntechOpen* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-06-02]. Prieiga per doi: [10.5772/intechopen.74421](https://doi.org/10.5772/intechopen.74421)
  14. CEBRIÁN, R. ir kiti. Design and Expression of Specific Hybrid Lantibiotics Active Against Pathogenic *Clostridium* spp. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2019, 10:2154 [žiūrėta 2020-06-02]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2019.02154](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02154)
  15. NUM, S. M. ir USEH, N. M., *Clostridium*: Pathogenic Roles, Industrial Uses and Medicinal Prospects of Natural Products as Ameliorative Agents against Pathogenic Species. *Jordan Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. 2014, 7(2), 81-94 [žiūrėta 2020-06-03].
  16. ALTEKRUSE, S. F. ir kiti. *Campylobacter jejuni*—An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerging Infectious Diseases* [interaktyvus]. 1999, 5(1), 28-35 [žiūrėta 2020-06-03]. Prieiga per doi: [10.3201/eid0501.990104](https://doi.org/10.3201/eid0501.990104)
  17. DASTI, J. I. ir kiti. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology* [interaktyvus]. 2010, 300(4), 205-11 [žiūrėta 2020-06-03]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ijmm.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002)
  18. GÓMEZ-ALDAPA, C. A. ir kiti. The Role of Foods in *Salmonella* Infections, *Salmonella* - A Dangerous Foodborne Pathogen. *IntechOpen* [interaktyvus]. 2012 [žiūrėta 2020-06-04]. Prieiga per doi: [10.5772/28316](https://doi.org/10.5772/28316)
  19. PANIEL, N. ir NOGUER, T. Detection of *Salmonella* in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods* [interaktyvus]. 2019, 8(9), 371 [žiūrėta 2020-06-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/foods8090371>
  20. TAYLOR, T. A. ir UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus* [atnaujinta 2019-11-26]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-06-04]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
  21. TONG, S. Y. C. ir kiti. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2015, 28(3), 603-661 [žiūrėta 2020-06-04]. Prieiga per doi: [10.1128/CMR.00134-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14)
  22. STROMBERG, Z.R. ir kiti. Pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* colonization and host inflammatory response in a defined microbiota mouse model. *Disease Models and Mechanisms* [interaktyvus]. 2018, 11(11), 035063 [žiūrėta 2020-06-05]. Prieiga per doi: [10.1242/dmm.035063](https://doi.org/10.1242/dmm.035063)
  23. CROXEN, M. A. ir kiti. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2013, 26(4), 822-880 [žiūrėta 2020-06-05]. Prieiga per doi: [10.1128/CMR.00022-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13)
  24. CLEMENTS, A. ir kiti. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* [interaktyvus]. 2012, 3(2), 71-87 [žiūrėta 2020-06-05]. Prieiga per doi: [10.4161/gmic.19182](https://doi.org/10.4161/gmic.19182)

25. NGUYEN, Y. ir SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [interaktyvus]. 2012, 2, 90 [žiūrėta 2020-06-05]. Prieiga per doi: [10.3389/fcimb.2012.00090](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090)
26. XU, J. G. ir kiti. *Escherichia Coli* O157:H7 and Shiga-like-toxin- producing *Escherichia Coli* in China. *World Journal of Gastroenterology* [interaktyvus]. 1999, 5(3), 191-194 [žiūrėta 2020-06-05]. doi: [10.3748/wjg.v5.i3.191](https://doi.org/10.3748/wjg.v5.i3.191)
27. EARL, A. M. ir kiti. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* [interaktyvus]. 2008, 16(6), 269-75 [žiūrėta 2020-06-07]. Prieiga per doi: [10.1016/j.tim.2008.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004)
28. DU, Y. ir kiti. A Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain Named WS-1 Inhibited Diarrhea and Death Caused by Pathogenic *Escherichia coli* in Newborn Piglets. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2019, 10, 1248 [žiūrėta 2020-06-07]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2019.01248](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01248)
29. LOGAN, N. A. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology* [interaktyvus]. 2012, 112(3), 417-429 [žiūrėta 2020-06-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
30. APETROAIE–CONSTANTIN, C. ir kiti. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *Journal of Applied Microbiology* [interaktyvus]. 2009, 106(6), 1976-1985 [žiūrėta 2020-06-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04167.x>
31. TODD, E. ir GRIEG, J. Viruses of foodborne origin: a review. *Virus Adaptation and Treatment* [interaktyvus]. 2015, 7, 25-45 [žiūrėta 2020-06-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2147/VAAT.S50108>
32. PETROVIĆ, T. ir D'Agostino, M. Viral Contamination of Food, *Antimicrobial Food Packaging* [interaktyvus]. 2016, 65-79 [žiūrėta 2020-06-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00005-X>
33. O'SHEA, H. ir kiti. Viruses Associated With Foodborne Infections, *Reference Module in Life Sciences* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2020-06-10]. Prieiga per doi: [10.1016/b978-0-12-809633-8.90273-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.90273-5)
34. KOOPMANS, M. Food-borne viruses from a global perspective. *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary* [interaktyvus]. 2012, A9 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114484/>
35. VELEBIT, B. ir kiti. The common foodborne viruses: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [interaktyvus]. 2019, 333, 012110 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per doi:[10.1088/1755-1315/333/1/012110](https://doi.org/10.1088/1755-1315/333/1/012110)
36. BOSCH, A. ir kiti. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 285, 110-128 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001>
37. TREVISAN, C. ir kiti. Foodborne Parasites in Europe: Present Status and Future Trends. *Trends in Parasitology* [interaktyvus]. 2019, 35(9), 695-703 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.002>

38. KOUTSOUMANIS, K. ir kiti. Public health risks associated with food-borne parasites, *EFSA journal* [interaktyvus]. 2018, 16(12), 5495 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per doi: [10.2903/j.efsa.2018.5495](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495)
39. LEE, S. C. ir kiti. Analysis of a Food-Borne Fungal Pathogen Outbreak: Virulence and Genome of a *Mucor circinelloides* Isolate from Yogurt, *mBio* [interaktyvus]. 2014, 5(4), e01390-14 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per doi: [10.1128/mBio.01390-14](https://doi.org/10.1128/mBio.01390-14)
40. BENEDICT, K. C. ir kiti. Invasive Fungal Infections Acquired from Contaminated Food or Nutritional Supplements: A Review of the Literature. *Foodborne Pathogens and Disease* [interaktyvus]. 2016, 13(7), 343-9 [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per doi: [10.1089/fpd.2015.2108](https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2108)
41. SOUZA, C. P. The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. *Brazilian archives of biology and technology* [interaktyvus]. 2008, 51(4) [žiūrėta 2020-06-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000400020>
42. DOYLE, M. P. ir kiti. The Food Industry's Current and Future Role in Preventing Microbial Foodborne Illness Within the United States, *Clinical Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2015 61(2), 252–259 [žiūrėta 2020-06-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/cid/civ253>
43. HEREDIA, N. ir GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition* [interaktyvus]. 2018, 4(3), 250-255 [žiūrėta 2020-06-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
44. GIAOURIS, E. E. ir SIMÕES, M. V. Chapter 11 - Pathogenic Biofilm Formation in the Food Industry and Alternative Control Strategies, *Foodborne Diseases, A volume in Handbook of Food Bioengineering*. 2018, 309-377.
45. LIMA, F., ir kiti. Effects of Radiation Technologies on Food Nutritional Quality, *Descriptive Food Science. IntechOpen* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-06-12]. Prieiga per doi: [10.5772/intechopen.80437](https://doi.org/10.5772/intechopen.80437)
46. EHLERMANN, D.A.E. Foods, Materials, Technologies and Risks, *Encyclopedia of Food Safety* [interaktyvus]. 2014, 3, 447-452 [žiūrėta 2020-06-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00305-X>
47. PRAKASH, A. ir ORNELAS-PAZ, J. J. Irradiation of Fruits and Vegetables. *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities* [interaktyvus]. 2019, 563-589 [žiūrėta 2020-06-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00017-1>
48. LAVILLA, M. Consumer Attitudes to Food Preservation Processes and Strategies. *Reference Module in Food Science* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2020-06-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22629-2>
49. Codex Alimentarius [žiūrėta 2020-06-08]. Prieiga per: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/#c453333>
50. ROBERTS, P. B. IRRADIATION OF FOODS | Applications. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition) [interaktyvus]. 2003, 3386-3390 [žiūrėta 2020-06-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00654-4>

51. MURANO, E. A. HEAT TREATMENT OF FOODS | Synergy Between Treatments. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition) [interaktyvus]. 2014, 181-186 [žiūrėta 2020-06-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00161-0>
52. PILLAI, S. D. ir SHAYANFAR, S. Electron Beam Technology and Other Irradiation Technology Applications in the Food Industry, *Topics in Current Chemistry* [interaktyvus]. 2017, 6, 375 [žiūrėta 2020-06-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0093-4>
53. KOCA, N. ir kiti. Ultraviolet Light Applications in Dairy Processing, Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing. *IntechOpen* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-06-15]. Prieiga per doi: [10.5772/intechopen.74291](https://doi.org/10.5772/intechopen.74291)
54. BINTSIS, T. ir kiti. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. 2000, 80(6), 637-645 [žiūrėta 2020-06-15]. Prieiga per doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000501\)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1)
55. CHEN, L. ir ALALI, W. Editorial: Recent Discoveries in Human Serious Foodborne Pathogenic Bacteria: Resurgence, Pathogenesis, and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 9, 2412 [žiūrėta 2020-06-15]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2018.02412](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02412)
56. HUSSAIN, B. ir kiti. Bioconjugated nanomaterials for monitoring food contamination. *Nanobiosensors* [interaktyvus]. 2017, 93-127 [žiūrėta 2020-06-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804301-1.00003-5>
57. JADHAV S. R. ir kiti. Detection of Foodborne Pathogens Using Proteomics and Metabolomics-Based Approaches. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 9, 3132 [žiūrėta 2020-06-16]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2018.03132](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03132)
58. PRIYANKA B. ir kiti. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research* [interaktyvus]. 2016, 144(3), 327-338 [žiūrėta 2020-06-18]. Prieiga per doi: [10.4103/0971-5916.198677](https://doi.org/10.4103/0971-5916.198677)
59. YUNUS, G. Biosensors: An Enzyme-Based Biophysical Technique for the Detection of Foodborne Pathogens. *Enzymes in Food Biotechnology, Production, Applications, and Future Prospects* [interaktyvus]. 2019, 723-738 [žiūrėta 2020-06-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00042-6>
60. SINGH, T. ir kiti. Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 8, 1501 [žiūrėta 2020-06-18]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2017.01501](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01501)
61. PAL, M. Nanotechnology: A New Approach in Food Packaging. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene* [interaktyvus]. 2017, 2, 2 [žiūrėta 2020-06-18]. Prieiga per doi: [10.4172/2476-2059.1000121](https://doi.org/10.4172/2476-2059.1000121)
62. PEREDA, M. ir kiti. Nanotechnology in Food Packaging Applications: Barrier Materials, Antimicrobial Agents, Sensors, and Safety Assessment. *Handbook of Ecomaterials* [interaktyvus]. 2018, 1-22 [žiūrėta 2020-06-19]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1\\_30-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_30-1)

63. SHARMA, C. ir kiti. Nanotechnology: An Untapped Resource for Food Packaging. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 8, 1735 [žiūrėta 2020-06-19]. Prieiga per doi: [10.3389/fmicb.2017.01735](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01735)
64. DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science* [interaktyvus]. 2011, 363(1), 1-24 [žiūrėta 2020-06-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>
65. HOSEINNEJAD, M. ir kiti. Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications. *Critical Reviews in Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 44(2), 161-181 [žiūrėta 2020-06-19]. Prieiga per doi: [10.1080/1040841X.2017.1332001](https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332001)
66. DEALBA-MONTERO, I. ir kiti. Antimicrobial Properties of Copper Nanoparticles and Amino Acid Chelated Copper Nanoparticles Produced by Using a Soya Extract. *Bioinorganic Chemistry and Applications* [interaktyvus]. 2017, 6 [žiūrėta 2020-06-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2017/1064918>
67. LADE, B. D. ir SHANWARE, A. S. Phytonanofabrication: Methodology and Factors Affecting Biosynthesis of Nanoparticles. *IntechOpen* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-06-19]. Prieiga per doi: [10.5772/intechopen.90918](https://doi.org/10.5772/intechopen.90918)
68. WANG, Z., ir kiti. Transformable masks for colloidal nanosynthesis. *Nature Communications* [interaktyvus]. 2018, 9, 563 [žiūrėta 2020-06-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02958-x>
69. CAMBEROS, E. P. ir kiti. Food Industry Applications of Phyto-Synthesized Silver Nanoparticles, *Global Journal of Nutrition and Food Science* [interaktyvus]. 2019, 2(3) [žiūrėta 2020-06-20]. Prieiga per doi: [10.33552/GJNFS.2019.02.000537](https://doi.org/10.33552/GJNFS.2019.02.000537)
70. SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. ir kiti. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* [interaktyvus]. 2020, 10, 292 [žiūrėta 2020-06-20]. Prieiga per doi: [10.3390/nano10020292](https://doi.org/10.3390/nano10020292)
71. RAMACHANDRAIAH, K. ir kiti. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Persimmon Byproducts and Incorporation in Biodegradable Sodium Alginate Thin Film. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2017, 82(10), 2329-2336 [žiūrėta 2020-06-20]. Prieiga per doi: [10.1111/1750-3841.13865](https://doi.org/10.1111/1750-3841.13865)
72. RAVINDRAN, R. ir JAISWA, A. K. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology* [interaktyvus]. 2016, 34(1), 58-69 [žiūrėta 2020-06-20]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>
73. GHOSH P. R. ir kiti. Production of High-Value Nanoparticles via Biogenic Processes Using Aquacultural and Horticultural Food Waste. *Materials* (Basel, Switzerland) [interaktyvus]. 2017, 10(8), 852 [žiūrėta 2020-06-20]. Prieiga per doi: [10.3390/ma10080852](https://doi.org/10.3390/ma10080852)
74. NASEER, B. ir kiti. Importance and health hazards of nanoparticles used in the food industry. *Nanotechnology Reviews* [interaktyvus]. 7(6), 623–641 [žiūrėta 2020-06-21]. ISSN 2191-9089. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0076>

75. SIEMER, S. ir kiti. Nanosized food additives impact beneficial and pathogenic bacteria in the human gut: a simulated gastrointestinal study. *npj Science of Food* [interaktyvus]. 2018, 2, 22 [žiūrėta 2020-06-21]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0030-8>
76. TODD, E.C.D. Foodborne Diseases: Overview of Emerging Food Technologies. *Encyclopedia of Food Safety* [interaktyvus]. 2014, 1, 253-261 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00416-9>
77. European Committee For Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast) Of The European Society Of Clinical. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Iš *Clinical Microbiology and Infection* [interaktyvus]. 2003, 9(8), 9-15 [žiūrėta 2020-06-25]. Prieiga per: doi: [10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x)
78. ŠALOMSKIENĖ, J. Metodikos, inhibitorinių medžiagų nustatymui žaliame piene modifikuotais mikrobiologiniais LPT ir LPT2 testais, parengimas. Ataskaita. [interaktyvus]. Kaunas, 2013. [žiūrėta 2020-06-26]. Prieiga per: [https://zum.lrv.lt/uploads/zum/documents/files/LT\\_versija/Veiklos\\_sritys/Mokslas\\_mokymas\\_ir\\_konsultavimas/Moksliniu\\_tyrimu\\_ir\\_taikomosios\\_veiklos\\_darbu\\_galutines\\_ataskaitos/4\\_Inhibitoriuata\\_skaita20131107.pdf?fbclid=IwAR0cyHMT4wfFtMd7UiZUlpqV3PwzCRBJF92OLiN1riJvuqI90vc2oyEgw](https://zum.lrv.lt/uploads/zum/documents/files/LT_versija/Veiklos_sritys/Mokslas_mokymas_ir_konsultavimas/Moksliniu_tyrimu_ir_taikomosios_veiklos_darbu_galutines_ataskaitos/4_Inhibitoriuata_skaita20131107.pdf?fbclid=IwAR0cyHMT4wfFtMd7UiZUlpqV3PwzCRBJF92OLiN1riJvuqI90vc2oyEgw)
79. HUSSEIN, R. A. ir EL-ANSSARY, A. A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants, Herbal Medicine. *IntechOpen* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-06-26]. Prieiga per doi: [10.5772/intechopen.76139](https://doi.org/10.5772/intechopen.76139)
80. MUKUNTHAN, K. S. ir BALAJI, S. Cashew Apple Juice (*Anacardium occidentale* L.) Speeds Up the Synthesis of Silver Nanoparticles. *International Journal of Green Nanotechnology* [interaktyvus]. 2012, 4(2), 71–79 [žiūrėta 2020-06-28]. Prieiga per: doi: [10.1080/19430892.2012.676900](https://doi.org/10.1080/19430892.2012.676900)
81. ISMAIL, M. ir kiti. Green synthesis of zerovalent copper nanoparticles for efficient reduction of toxic azo dyes congo red and methyl orange. *Green Processing and synthesis* [interaktyvus]. 2019, 8, 135–143 [žiūrėta 2020-06-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1515/gps-2018-0038>
82. DANG, T. M. D. ir kiti. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* [interaktyvus]. 2011, 2(1), 6 [žiūrėta 2020-06-28] doi:10.1088/2043-6262/2/1/015009
83. SHANG, Z. ir kiti. Random lasing assisted by CuSO<sub>4</sub> and Au nanoparticles in random gain systems. *Optical material Express* [interaktyvus]. 2017, 7(6), 1 [žiūrėta 2020-06-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1364/OME.7.001848>
84. LIU, X. ir kiti. Tunable Dipole Surface Plasmon Resonances of Silver Nanoparticles by Cladding Dielectric Layers. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2015, 12555 [žiūrėta 2020-06-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/srep12555>
85. JANA, J. ir kiti. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. *RSC Advances* [interaktyvus]. 2016, 89 [žiūrėta 2020-06-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C6RA14173K>

86. Lietuvos Energetikos Instituto internetinis puslapis [žiūrėta 2021-04-26]. Prieiga per: <http://apc.lei.lt/lt/iranga-ir-paslaugos/energijos-akumuliavimas/vandenilio-energetika/1/skenuojantis-elektroninis-mikroskopas-sem-83>
87. HEESTERBEEK, D. A. C. ir kiti. Complement-dependent outer membrane perturbation sensitizes Gram-negative bacteria to Gram-positive specific antibiotics. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2019, 3074(9) [žiūrėta 2021-05-24]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38577-9>