



Politechnika Wroclawska

DZIEDZINA: Nauki inżynieryjno-techniczne

DYSCYPLINA: Inżynieria biomedyczna

ROZPRAWA DOKTORSKA

Modulacja aktywności pomp efflux i jej wpływ na skuteczność antybakteryjnej terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem ilościowej analizy na poziomie pojedynczej komórki

mgr inż. Aleksandra Talarczyk

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Ulatowska-Jarża, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Igor Buzalewicz, prof. uczelni

Słowa kluczowe: inhibitory pomp efflux, kombinowana terapia antybakteryjna, fotouczulacze, terapia fotodynamiczna, cyfrowa holotomografia

WROCŁAW 2026

Serdecznie dziękuję wszystkim osobom, bez których ta praca nie miałaby szansy powstać.

Przede wszystkim dziękuję **Mamie**, bez której wsparcia moja edukacja nie przybrałaby takiej formy. Dziękuję za motywowanie, wspieranie i zrozumienie – na każdym etapie.

Chciałabym również podziękować **Siostrze** oraz **Mężowi**, którzy zawsze byli obok, za cierpliwość i wyrozumiałość.

Dziękuję również koleżankom i kolegom z laboratorium – **Ola**, **Ania**, **Przemek** i **Mateusz** – bez Was byłoby zdecydowanie trudniej.

Chciałabym również złożyć serdeczne podziękowania Promotorom: **dr hab. inż. Agnieszce Ulatowskiej-Jarży**, **prof. uczelni** oraz **dr hab. inż. Igorowi Buzalewiczowi**, **prof. uczelni** – za szansę, zaufanie oraz poświęcony mi czas.

Dziękuję **dr hab. Annie Matczuk**, **prof. uczelni** oraz **mgr Agacie Kublickiej** – za 4 lata owocnej współpracy.

Spis treści

Streszczenie	9
Abstract.....	12
Wykaz skrótów	15
1. Cel oraz hipotezy pracy	17
2. Wstęp	20
2.1. Zagrożenia płynące z lekooporności bakteryjnej	20
2.2. Mechanizmy oporności bakteryjnej.....	21
2.3. Przeciwbakteryjna terapia fotodynamiczna	23
2.4. Pompy efflux.....	24
2.5. Inhibitory bakteryjnych pomp efflux	27
2.6. Wpływ inhibitorów pomp efflux na komórki bakteryjne i możliwość zastosowania ich w terapii antybakteryjnej.....	32
3. Opis prac	34
3.1. Publikacja 1 – <i>The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of Escherichia Coli by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging</i>	35
3.2. Publikacja 2 – <i>Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology</i>	56
3.3. Publikacja 3 – <i>Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against Bacillus cereus and Escherichia coli</i>	74
4. Podsumowanie i kierunek przyszłych badań	98
Bibliografia	102
Wykształcenie	116
Tytuły zawodowe	116
Dorobek naukowy.....	117
Publikacje	117
Konferencje.....	119
Projekty badawcze.....	121
Ukończone szkolenia i kursy	122
Praktyka zawodowa	123
Nagrody/stypendia	124

Niniejsza rozprawa opiera się na cyklu powiązanych tematycznie artykułów, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym:

Praca 1: Pietrowska, A., Hołowacz, I., Ulatowska-Jarża, A., Guźniczak, M., Matczuk, A. K., Wieliczko, A., Wolf-Baca, M., & Buzalewicz, I. (2022). The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of Escherichia Coli by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6137. <https://doi.org/10.3390/ijms23116137>

IF₂₀₂₂: 5,6

MNiSW₂₀₂₂: 140 pkt

Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 5

Mój udział polegał na współudziale w przeprowadzeniu pomiarów z wykorzystaniem cyfrowego holotomografu oraz skaningowego mikroskopu konfokalnego, eksporcie zarejestrowanych danych pomiarowych, współudziale w przygotowaniu oryginalnej i ostatecznej wersji publikacji, przygotowaniu wizualizacji wykorzystanych jako grafiki, przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników uzyskanych w ramach pomiarów mikroskopowych oraz współudziale w przygotowaniu dyskusji wyników.

Praca 2: Pietrowska, A., Guźniczak, M., Kublicka, A., Matczuk, A., Wieliczko, A., Ulatowska-Jarża, A., & Buzalewicz, I. (2025). Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology. *Industrial Crops and Products*, 233, 121378. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121378>

IF₂₀₂₄: 6,2

MNiSW₂₀₂₄: 200 pkt

Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 0

Mój udział polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji publikacji i pozyskaniu finansowania na realizację badań w ramach Minigrantu dla doktorantów Politechniki Wrocławskiej, nadzorowaniu projektu, w ramach którego wykonywano pomiary, opracowaniu procedury obrazowania rozwoju skupisk bakteryjnych na cienkiej warstwie agarowej za pomocą cyfrowego holotomografu, wykonaniu testów MIC, przeprowadzeniu pomiarów z wykorzystaniem cyfrowego holotomografu oraz bioreaktora, eksporcie i analizie zarejestrowanych danych pomiarowych przy pomocy bioreaktora, analizie ilościowej kinetyki wzrostu bakterii wraz z wyznaczeniem kluczowych parametrów (czas trwania logarytmicznej fazy wzrostu, maksymalne tempo wzrostu, czas

podwojenia oraz maksymalne OD), współdziałe w przygotowaniu oryginalnej i ostatecznej wersji publikacji, przygotowaniu wizualizacji, przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników, współdziałe w przygotowaniu dyskusji wyników oraz kontakcie z wydawnictwem jako autor korespondencyjny.

Praca 3: Talarczyk, A., Kublicka, A., Matczuk, A., Wieliczko, A., Ulatowska-Jarża, A., & Buzalewicz, I. (2026). Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 797, 153214. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.153214>

IF₂₀₂₄: 2,2

MNiSW₂₀₂₄: 100 pkt

Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytoowań): 0

Mój udział polegał na współdziałe w opracowaniu koncepcji publikacji i pozyskaniu finansowania na realizację badań w ramach Minigrantu dla doktorantów Politechniki Wrocławskiej nadzorowaniu projektu, w ramach którego wykonywano pomiary, wykonaniu testów MIC i pomiarów spektroskopowych, przeprowadzeniu pomiarów z wykorzystaniem czytnika płytek, cyfrowego holotomografu oraz skaningowego mikroskopu konfokalnego, eksporcie i ilościowej analizie informacji obrazowej na podstawie samodzielnie przygotowanych algorytmów komputerowych, współdziałe w przygotowaniu oryginalnej i ostatecznej wersji publikacji, przygotowaniu grafik, przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników uzyskanych w ramach pomiarów, współdziałe w przygotowaniu dyskusji wyników, kontakcie z wydawnictwem jako autor korespondencyjny, a także zaplanowaniu i wykonaniu dodatkowych pomiarów wymaganych w procesie recenzyjnym.

Streszczenie

Obecność lekoopornych gatunków bakterii i infekcje przez nie wywołane są ogromnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Zgodnie z danymi udostępnionymi w 2025 r. przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, z ang. *World Health Organization*) oporność jest bezpośrednio związana z ponad milionem zgonów rocznie, natomiast pośrednio z prawie 5 milionami. Stale poszukuje się nowych strategii terapeutycznych, pozwalających przezwyciężyć tę barierę.

Obiecującą alternatywą dla obecnie dostępnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych jest przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna (aPDT, z ang. *antimicrobial PhotoDynamic Therapy*). Jej ogromną zaletą jest brak możliwości wytworzenia przez bakterie oporności procesy prowadzące do śmierci komórki lub jej fotoinaktywacji. Jednakże na efektywność aPDT znaczący wpływ ma ilość substancji, jaka zostanie zakumulowana wewnątrz komórki bakteryjnej.

Popularność zyskują również fotodynamiczne terapie kombinowane, które polegają na wykorzystaniu fotouczulacza (PS, z ang. *PhotoSensitizer*) w połączeniu z dodatkowymi związkami chemicznymi, np. inhibitorami pomp efflux (EPIs, z ang. *Efflux Pump Inhibitors*), antybiotykami lub cytostatykami. Takie podejście pozwala na uzyskanie efektu addytywnego, bądź synergistycznego, w porównaniu z efektami każdej terapii z osobna. Przyczynia się to również do zmniejszenia dawki leków i ograniczenia skutków ubocznych terapii. Połączenie PS z EPI może mieć realny wpływ na jeden z mechanizmów indukowania oporności i doprowadzić do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia substancji leczniczych.

Ogromnym zainteresowaniem cieszą się EPIs pochodzenia naturalnego. W okresie ostatnich 30 lat blisko 75% zatwierdzonych produktów antybakteryjnych było pochodzenia naturalnego. Wiele badań wskazuje, że takie substancje mogą odgrywać rolę EPI, przyczyniając się do wzmocnienia efektu zastosowanej terapii i do ponownego uwrażliwienia bakterii na substancje, na które wykazywały oporność.

W niniejszej rozprawie podjęłam próbę opracowania alternatywnych, skojarzonych procedur terapeutycznych aPDT, opartych na związkach pochodzenia naturalnego, znajdujących zastosowanie zarówno w terapii aPDT, jak i w ograniczaniu rozwoju struktur bakteryjnych. Ponadto wykazałam, że cyfrowa holotomografia (DHT, ang. *Digital HoloTomography*) może być z powodzeniem stosowana jako ilościowa technika pomiarowa do monitorowania efektów indukowanych przez te substancje oraz terapię, w których są one wykorzystywane, na poziomie pojedynczych komórek bakteryjnych. Pracę doktorską stanowi cykl trzech publikacji.

W pierwszej przedstawiłam strategię łączenia dwóch odpowiednio dobranych PSs (Chlorin e6 i Pheophorbide a) w celu zwiększenia ich wewnątrzkomórkowej akumulacji oraz uzyskania co najmniej addytywnego efektu terapeutycznego. Wykazałam, że kombinacja PSs o uzupełniających się właściwościach fizykochemicznych (anionowy Chlorin e6 i kationowy Pheophorbide a) prowadzi do zwiększonej akumulacji PSs wewnątrz komórek bakteryjnych (*Escherichia coli*) oraz wyższej efektywności terapii. Weryfikacja eksperymentalna z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz technika ilościowego obrazowania fazy DHT potwierdziła, że skuteczność terapii kombinowanej (29,45%) przewyższa skuteczność monoterapii (13,77% w przypadku Chlorin e6 i 16,15% w przypadku Pheophorbide a). Zaproponowane podejście stanowi innowacyjny kierunek rozwoju terapii fotodynamicznej i monitorowania jej skutków, wpisujący się w światowe trendy poszukiwania skutecznych strategii zwalczania zakażeń bakteryjnych.

W drugiej publikacji skoncentrowałam się na zbadaniu wpływu EPI pochodzenia naturalnego (berberyna, palmatyna, piperyna, kurkumina, kapsaicyna i kumaryna) na rozwój populacji bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) i procesu formowania się struktur komórkowych. Wykazałam, że inhibicja aktywności pomp efflux prowadzi do zaburzenia mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój hodowli bakteryjnej i tworzenie się struktur przestrzennych przez bakterie. Zastosowanie bioreaktora z odwróconym wirowaniem pozwoliło na ilościowy opis parametrów krzywej wzrostu hodowli. Szczególnie wyraźny efekt zaobserwowałam w przypadku komórek *E. faecalis* inkubowanych z berberyną, dla których średnia wartość maksymalnej szybkości wzrostu uległa redukcji o 53,8%. DHT umożliwiła ilościową, trójwymiarową analizę zmian współczynnika załamania światła (RI, z ang. *Refractive Index*), suchej masy skupisk bakteryjnych oraz objętości zajmowanej przez te struktury. Eksperymentalnie wykazałam, że zaproponowana procedura terapeutyczna prowadzi do ograniczenia dynamiki podziałów komórkowych, a w przypadku *B. cereus* do jej zahamowania, czemu towarzyszyło wydłużanie się komórek, charakterystyczne w przypadku indukowanych efektów stresujących. W przypadku bakterii *B. cereus* wykazałam, że wdrożona procedura terapeutyczna ograniczyła przyrost objętości struktur przestrzennych formowanych przez bakterie świadczący o spowolnieniu lub zahamowaniu dynamiki ich rozwoju. Oznacza to, iż zaproponowana procedura może przeciwdziałać kolonizacji powierzchni przez bakterie.

W trzeciej publikacji skupiłam się na zastosowaniu naturalnych EPI w połączeniu z PS, co stanowi skuteczną strategię zwiększania efektywności aPDT. Badania przeprowadziłam na modelowych bakteriach: Gram-dodatniej: *Bacillus cereus* i Gram-ujemnej: *Escherichia coli*, koncentrując się na analizie wewnątrzkomórkowej akumulacji PS Chlorin e6. Wykorzystanie niskich stężeń wybranych EPIs ($< 0,25$ MIC) prowadziło do bardziej efektywnej akumulacji PS

wewnątrz komórek bakteryjnych, co potwierdziłam eksperymentalnie za pomocą mikroskopii konfokalnej i DHT. Zwiększona akumulacja PS przekładała się bezpośrednio na wyraźny wzrost skuteczności aPDT, umożliwiając potencjalną redukcję stężeń stosowanych związków aktywnych i ograniczenie niepożądanych skutków terapii. W przypadku *Bacillus cereus* połączenie piperyny z Chlorin e6 prowadziło do wzrostu skuteczności terapii o 273,90%, a w przypadku *Escherichia coli* zastosowanie berberyny w kombinacji z Chlorin e6 skutkowało zwiększeniem efektu terapeutycznego o 227,72% w porównaniu z terapią opartą wyłącznie na PS. Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują, że włączenie EPI do schematów leczenia przeciwbakteryjnego umożliwia osiągnięcie lepszych efektów terapeutycznych.

Opublikowane wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został zrealizowany. Wskazano alternatywne, kombinowane terapie antybakteryjne oparte na EPI pochodzenia naturalnego, znajdujące zastosowanie zarówno w terapii aPDT, jak i w ograniczaniu rozwoju struktur bakteryjnych. Ponadto w trakcie prowadzonych prac badawczych zaproponowano całkiem nowe, bezznacznikowe i nieniszczące procedury pomiarowe, oparte na ilościowym obrazowaniu fazy – DHT, które mogą stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych klasycznych technik mikrobiologicznych. Warto również podkreślić, że powszechne wdrożenie zaproponowanych procedur terapeutycznych może przyczynić się do ograniczenia kolonizacji powierzchni przez bakterie, zahamowania ich rozwoju, fotoinaktywacji lub też ograniczenia lekooporności nie tylko w praktyce klinicznej, ale również w przemyśle spożywczym i kosmetycznym.

Abstract

The presence of drug-resistant bacterial species and the infections caused by them constitute a serious threat to public health. According to data released in 2025 by the World Health Organization (WHO), antimicrobial resistance is directly associated with over a million deaths annually and indirectly with nearly 5 million deaths. New therapeutic strategies that enable overcoming this barrier are continuously being sought.

A promising alternative to currently available methods for combating bacterial infections is antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). Its major advantage is the inability of bacteria to develop resistance to the processes leading to cell death or photoinactivation. However, the effectiveness of aPDT is significantly influenced by the amount of substance that accumulates inside the bacterial cell.

Combined photodynamic therapies are also gaining popularity; these involve the use of a photosensitizer (PS) in combination with additional chemical compounds, such as efflux pump inhibitors (EPIs), antibiotics, or cytostatics. This approach allows for obtaining an additive or synergistic effect compared to the effects of each therapy applied separately. It also contributes to a reduction in drug dosage and limitation of side effects. The combination of a PS with an EPI may have a real impact on one of the mechanisms inducing resistance and lead to an increase in the intracellular concentration of therapeutic substances.

Natural EPIs have attracted considerable interest. Over the last 30 years, nearly 75% of approved antibacterial products have been of natural origin. Numerous studies indicate that such substances may play the role of EPIs, contributing to enhancement of the applied therapy and to the resensitization of bacteria to substances to which they exhibited resistance.

In this dissertation, I aimed to develop alternative, combined aPDT therapeutic procedures based on compounds of natural origin, applicable both in aPDT therapy and in limiting the development of bacterial structures. Moreover, I demonstrated that digital holotomography (DHT) can be successfully applied as a quantitative measurement technique to monitor the effects induced by these substances and by the therapies in which they are used, at the level of individual bacterial cells. The doctoral dissertation consists of a cycle of three publications.

In the first, I presented a strategy for combining two appropriately selected PSs (Chlorin e6 and Pheophorbide a) in order to increase their intracellular accumulation and to obtain at least an additive therapeutic effect. I demonstrated that a combination of PSs with complementary physicochemical properties (anionic Chlorin e6 and cationic Pheophorbide a) leads to increased accumulation of PSs inside bacterial cells (*Escherichia coli*) and higher therapeutic efficiency.

Experimental verification using confocal microscopy and the quantitative phase imaging technique DHT confirmed that the effectiveness of the combined therapy (29.45%) exceeded the effectiveness of monotherapy (13.77% in the case of Chlorin e6 and 16.15% in the case of Pheophorbide a). The proposed approach constitutes an innovative direction in the development of photodynamic therapy and monitoring of its effects, fitting into global trends in the search for effective strategies to combat bacterial infections.

In the second publication, I focused on investigating the influence of natural EPIs (berberine, palmatine, piperine, curcumin, capsaicin, and coumarin) on the development of bacterial populations (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) and on the process of cellular structure formation. I demonstrated that inhibition of efflux pump activity leads to disruption of the mechanisms responsible for bacterial culture development and the formation of spatial structures by bacteria. The application of a bioreactor with reversed rotation enabled a quantitative description of growth curve parameters. A particularly pronounced effect was observed in the case of *E. faecalis* cells incubated with berberine, for which the mean value of the maximum growth rate was reduced by 53.8%. DHT enabled quantitative, three-dimensional analysis of changes in the refractive index (RI), dry mass of bacterial clusters, and the volume occupied by these structures. I experimentally demonstrated that the proposed therapeutic procedure led to a limitation of cell division dynamics and, in the case of *B. cereus*, to its inhibition, accompanied by cell elongation characteristic of stress-induced effects. In the case of *B. cereus*, I demonstrated that the implemented therapeutic procedure limited the increase in the volume of spatial structures formed by bacteria, indicating a slowdown or inhibition of the dynamics of their development. This indicates that the proposed procedure may counteract bacterial surface colonization.

In the third publication, I focused on the application of natural EPIs in combination with a PS, which constitutes an effective strategy for increasing the efficiency of aPDT. The studies were conducted on model bacteria: Gram-positive *Bacillus cereus* and Gram-negative *Escherichia coli*, focusing on the analysis of intracellular accumulation of the PS Chlorin e6. The use of low concentrations of selected EPIs (< 0.25 MIC) led to more efficient accumulation of the PS inside bacterial cells, which was experimentally confirmed using confocal microscopy and DHT. Increased PS accumulation translated directly into a clear increase in aPDT effectiveness, enabling potential reduction of the concentrations of active compounds used and limitation of undesirable therapeutic effects. In the case of *Bacillus cereus*, the combination of piperine with Chlorin e6 led to an increase in therapeutic effectiveness of 273.90%, whereas in the case of *Escherichia coli*, the application of berberine in combination with Chlorin e6 resulted in an increase in therapeutic effect

of 227.72% compared to therapy based exclusively on the PS. The conducted studies clearly indicate that inclusion of EPIs in antibacterial treatment regimens enables the achievement of improved therapeutic effects.

The published results of the conducted studies confirm that the primary objective of the doctoral dissertation has been achieved. Alternative, combined antibacterial therapies based on EPIs of natural origin were identified, applicable both in aPDT therapy and in limiting the development of bacterial structures. Moreover, during the conducted research work, novel, label-free and non-destructive measurement procedures based on quantitative phase imaging – DHT were proposed, which may constitute an alternative to currently applied classical microbiological techniques. It is also worth emphasizing that widespread implementation of the proposed therapeutic procedures may contribute to limiting bacterial surface colonization, inhibiting their development, inducing photoinactivation, or reducing antimicrobial resistance not only in clinical practice but also in the food and cosmetic industries.

Wykaz skrótów

ABC	(z ang. <i>ATP-Binding Cassette</i>)
AcrAB-TolC	(z ang. <i>Acriflavine resistance A/B + Tolerance to Colicins</i>)
ATTC	(z ang. <i>American Type Culture Collection</i>), Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych
aPDT	(z ang. <i>antimicrobial PhotoDynamic Therapy</i>), przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna
ATP	(z ang. <i>Adenosine TriPhosphate</i>), adenozyntrifosforan
CCCP	(z ang. <i>Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenylhydrazone</i>), m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu
CmeABC	(z ang. <i>Campylobacter multidrug efflux A/B/C</i>)
DHT	(z ang. <i>Digital HoloTomography</i>) cyfrowa holotomografia
DinF	(z ang. <i>Damage-inducible Flux protein</i>)
DMSO	(z ang. <i>DiMethyl SulfOxide</i>), dimetylosulfotlenek
EbrAB	(z ang. <i>Ethidium bromide resistance A/B</i>)
EfrAB	(z ang. <i>Enterococcus faecalis resistance A/B</i>)
EGCG	(z ang. <i>EpiGalloCatechin 3-Gallate</i>), 3-galusan epigallokatechiny
EmrE	(z ang. <i>Ethidium multidrug resistance E</i>)
EPI	(z ang. <i>Efflux Pump Inhibitor</i>) inhibitor pompy efflux
EPS	(z ang. <i>Extracellular Polymeric Substance</i>), zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa
FDA	(z ang. <i>Food and Drug Administration</i>), Agencja ds. Żywności i Leków
Lde	(z ang. <i>Listeria drug efflux</i>)
MacAB-TolC	(z ang. <i>Macrolide accommodation proteins A/B + Tolerance to Colicins</i>)
MATE	(z ang. <i>Multidrug And Toxin Extrusion</i>)
MexAB-OprM	(z ang. <i>Multiple efflux protein A/B + Outer membrane protein M</i>)
MFS	(z ang. <i>Major Facilitator Superfamily</i>)
MIC	(z ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>), minimalne stężenie hamujące

MRSA	(z ang. <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>), gronkowiec złocisty oporny na metycylinę
MtrCDE	(z ang. <i>Multiple transfer resistance C/D/E</i>)
NMP	(z ang. <i>1-(Naphthalen-1-ylMethyl)Piperazine</i>), 1-(1-naftylo metylo)-piperazyna
NorA	(z ang. <i>Norfloxacin resistance protein A</i>)
NorM	(z ang. <i>Norfloxacin outflow resistance Multidrug transporter</i>)
OD	(z ang. <i>Optical Density</i>), gęstość optyczna
PAβN	(z ang. <i>Phenylalanine-Arginine β-Naphthylamide</i>), fenyloalanina-arginina-β-naftyloamid
PACE	(z ang. <i>Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux</i>)
PBS	(z ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>), sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PCM	(z ang. <i>Polish Collection of Microorganisms</i>), Polska Kolekcja Mikroorganizmów
PS	(z ang. <i>PhotoSensitizer</i>), fotouczulacz
RI	(z ang. <i>Refractive Index</i>), współczynnik załamania światła
RND	(z ang. <i>Resistance-Nodulation Division</i>)
ROS	(z ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>), reaktywne formy tlenu
SMR	(z ang. <i>Small Multidrug Resistance</i>)
SsmE	(z ang. <i>Staphylococcal small multidrug efflux pump</i>)
TetB	(z ang. <i>Tetracycline efflux pump B</i>)
TetK	(z ang. <i>Tetracycline efflux pump K</i>)
TSB	(z ang. <i>Tryptic Soy Broth</i>), bulion tryptono-sojowy
WHO	(z ang. <i>World Health Organization</i>), Światowa Organizacja Zdrowia

1. Cel oraz hipotezy pracy

Infekcje powodowane przez patogeny, w tym bakterie, stanowią ogromne wyzwanie dla ochrony zdrowia publicznego. Oporność wywoływana przez nadużywanie i niewłaściwe stosowanie antybiotyków (terapia bez uprzedniego wykonania antybiogramu, bądź kontroli postępów leczenia) i innych środków antybakteryjnych (Llor & Bjerrum, 2014; Sora et al., 2026) znacznie ogranicza skuteczność prowadzonych terapii. Możliwość tworzenia biofilmów, będących znacznie bardziej odpornych na działanie związków bakteriobójczych w porównaniu z komórkami planktonicznymi, ze względu na ich strukturę i warstwę ochronną, jaką stanowi zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa (EPS, z ang. *Extracellular Polymeric Substance*) (Omwenga & Awuor, 2024; Otter et al., 2015), wymaga stosowania nowych strategii walki z bakteriami wielolekoopornymi.

Zagrożenia płynące z występowania wielolekoopornych gatunków bakterii zauważane są nie tylko w praktyce klinicznej, lecz również w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Przykładem może być tutaj potwierdzenie, że standardowe procedury dezynfekcji nie pozwalają na eradykację biofilmu bakteryjnego zgromadzonego w obu kanałach endoskopu. Zarówno czyszczenie chemiczne, jak i mechaniczne nie przynosi oczekiwanych rezultatów (Pajkos et al., 2004). Alarmujący jest również fakt, iż biofilm bakteryjny może występować na suchych powierzchniach, a niektóre z gatunków są w stanie przetrwać bez dostępu do substancji odżywczych nawet 12 miesięcy. Potwierdzono, że 50-krotne wycieranie z wykorzystaniem standardowej procedury pozwoliło na usunięcie ok. 97% biofilmu (Parvin et al., 2019). Dodatkowo, w przypadku przemysłu spożywczego (Alves et al., 2021; Sunarti, 2024; Zavišić et al., 2024) oraz kosmetycznego (Alshehrei, 2024; Kim et al., 2020; Nusrat et al., 2023) może dojść do kontaminacji na każdym etapie produkcji, co jest dużym wyzwaniem w utrzymaniu bezpieczeństwa i jakości mikrobiologicznej produktów.

Obiecującą alternatywą dla dostępnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych jest przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna (aPDT, z ang. *antimicrobial PhotoDynamic Therapy*), wobec której bakterie nie są w stanie wytworzyć mechanizmów oporności (Alenazy, 2022; Khan et al., 2020). W związku z tym w ostatnich latach cieszy się ona coraz większym zainteresowaniem i popularnością w środowisku naukowym. Zastosowanie tej strategii staje się alternatywnym narzędziem w zwalczaniu bakterii. Procedury aPDT stale się rozwijają, a jednym z jej udoskonaleń jest podejście kombinowane (Youf et al., 2021). Umożliwia to wzajemną synergję PDT i innych terapii w celu zwiększenia jej skuteczności, przeciwdziałania oporności bakterii oraz niwelowania skutków ubocznych samej terapii.

Obecnie duży nacisk kładziony jest na wykorzystywanie w strategiach terapeutycznych substancji pochodzenia naturalnego – ze względu na szereg zalet, do których zalicza się aktywność przeciwbakteryjną przeciwko szerokiej gamie bakterii i możliwość wykorzystania ich w terapiach kombinowanych (Khameneh et al., 2019; Stavri et al., 2007). Wśród tych związków, wykazujących działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne, znajdują się inhibitory pomp efflux (EPIs, z ang. *Efflux Pump Inhibitors*). Wynika to z faktu, iż uważa się, że to właśnie aktywność pomp efflux jest odpowiedzialna za jeden z mechanizmów oporności bakterii. Ich rola jest złożona, pełnią istotne zadania w fizjologii komórek bakteryjnych (regulacja wypływu substancji z wnętrza komórki), a także biorą udział w tworzeniu biofilmu m.in. poprzez transport cząsteczek sygnałowych quorum sensing (Alav et al., 2018). Wzajemna synergia EPI i terapii kombinowanej może wpływać nie tylko na zwiększenie skuteczności akumulacji substancji wewnątrz komórek bakteryjnych, co w konsekwencji doprowadzi do zwiększenia skuteczności terapii, ale także może mieć wpływ na rozwój bakterii zarówno w środowisku płynnym, jak i na stałym podłożu.

Nadrzędnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była identyfikacja i opracowanie alternatywnych kombinowanych metod antybakteryjnych w oparciu o związki pochodzenia naturalnego, mających zastosowanie zarówno w terapii aPDT, jak i ograniczeniu rozwoju struktur bakteryjnych, oraz wykazanie, że DHT może zostać z powodzeniem wykorzystana jako ilościowa technika pomiarowa do oceny skuteczności działania opracowanych procedur terapeutycznych, która dotychczas nie była standardowo wykorzystywana w badaniach oceny skuteczności aPDT i wpływu EPI na namnażanie się bakterii.

Do badań wykorzystalam bakterie klasyfikowane jako organizmy patogenne kategorii II, zgodnie z załącznikiem nr 1 do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 29 listopada 2002 r. (poz. 1798) ze względu na współpracę z laboratoriami mikrobiologicznymi Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Współpracowałam z panią dr hab. Anną Matczuk, prof. uczelni z Zakładu Mikrobiologii Katedry Patologii z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej oraz panią prof. dr hab. Aliną Wieliczko z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Badania bazowały na związkach naturalnego pochodzenia: dwóch fotouczulaczach (PSs, z ang. *PhotoSensitizers*) – Chlorin e6 i Pheophorbide a oraz sześciu inhibitorach pomp efflux: berberynie, palmatynie, piperynie, kurkuminie, kapsaicynie i kumarynie.

Przeprowadziłam charakterystykę właściwości absorpcyjnych wymienionych wcześniej związków chemicznych z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-VIS, które uzupełniłam o pomiary fluorescencji. Do określenia wpływu EPI na rozwój bakterii posłużyłam się dwoma standardowo stosowanymi w mikrobiologii testami: minimalnego stężenia hamującego (MIC, z ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) oraz resazurynowym. Pomiary dynamiki namnażania się

bakterii w pożywce płynnej, prowadzone z wykorzystaniem bioreaktora z odwróconym wirowaniem, umożliwiły uzyskanie ilościowej informacji dotyczącej kluczowych parametrów krzywych wzrostu wybranych gatunków bakterii. Ważną innowacją metodologiczną było wykorzystanie ilościowej techniki obrazowania fazy – cyfrowej holotomografii (DHT, z ang. *Digital HoloTomography*) do monitorowania zmian składu chemicznego wnętrza komórki, czyli jej gęstości, a tym samym współczynnika załamania światła (RI, z ang. *Refractive Index*) komórek bakteryjnych. Zaproponowana została zatem nowa metoda oceny oddziaływania inhibitorów oraz fotouczulaczy na poziomie pojedynczych komórek.

W niniejszej pracy postawiłam trzy hipotezy, których udowodnienie umożliwiło realizację nadrzędnego celu rozprawy doktorskiej:

- **H1:** kombinacja dwóch odpowiednio dobranych fotouczulaczy zwiększa ich akumulację wewnątrz komórek bakteryjnych oraz prowadzi do uzyskania co najmniej addytywnego efektu terapii fotodynamicznej;
- **H2:** zastosowanie celowanych inhibitorów pomp efflux (EPIs) ogranicza dynamikę formowania się struktur przestrzennych tworzonych przez bakterie;
- **H3:** zastosowanie wybranych inhibitorów pomp efflux (EPIs) zwiększa wewnątrzkomórkową akumulację fotouczulacza.

2. Wstęp

2.1. Zagrożenia płynące z lekooporności bakteryjnej

Infekcje bakteryjne są wciąż powszechne. Szczególnie niebezpieczne są infekcje wywołane przez lekooporne szczepy bakterii, które nawet w obecności antybiotyków zachowują zdolność do przeżycia i dalszego rozprzestrzeniania się (Fongang et al., 2023). Nadużywanie antybiotyków, w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt oraz rolnictwie, znacznie przyczyniło się do takiego stanu rzeczy (Galgano et al., 2025). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, z ang. *World Health Organization*) wskazuje, że potrzebna jest racjonalizacja antybiotykoterapii poprzez wdrożenie diagnostyki profilaktycznej i przedterapeutycznej, aby wyeliminować jej nadmierne wykorzystywanie, a przede wszystkim, by stosować celowane antybiotyki, dopasowane do konkretnego patogenu (World Health Organization, 2024).

W 2019 r. 13,6% wszystkich zgonów na świecie związanych było z patogenami bakteryjnymi, co stanowi drugą najczęstszą przyczynę zgonów, po chorobie niedokrwiennej serca (Ikuta et al., 2022). Szacuje się, że na świecie do 2050 r. przyczyną śmierci 10 mln osób rocznie będą infekcje wywołane przez bakterie antybiooporne, zarówno pośrednio, jak i bezpośrednio (Dadgostar, 2019; Sora et al., 2026). Niebezpieczeństwo to zostało zauważone przez WHO, która opublikowała listę gatunków bakterii, będących największym zagrożeniem dla zdrowia, określonych jako ESKAPE (Mulani et al., 2019; Tacconelli et al., 2018). To właśnie wymienione tam gatunki: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. są odpowiedzialne za ponad 50% wszystkich zgonów wywołanych przez zakażenia bakteryjne (Soni et al., 2024). Warto wspomnieć, że istotne w kontekście infekcji bakteryjnych są również zakażenia szpitalne, które znacznie częściej powodowane są przez odporne gatunki bakterii w porównaniu do zakażeń pozaszpitalnych (Arnold, 2026).

Wielolekooporność bakterii jest nie tylko problemem zdrowotnym, ale również ekonomicznym. Leczenie zakażeń wielolekoopornych jest znacznie droższe niż zakażeń wywołanych przez bakterie wrażliwe na antybiotyki, co wynika z dłuższego okresu leczenia, konieczności dodatkowych badań i wykorzystywania droższych leków (Poudel et al., 2023; Pulingam et al., 2022). Bank Światowy szacuje, że jeżeli nie zostaną podjęte żadne działania, to do 2030 r. roczne globalne wydatki związane z zakażeniami spowodowanymi przez bakterie antybiooporne wyniosą 3,4 miliarda dolarów (Allel et al., 2024).

2.2. Mechanizmy oporności bakteryjnej

Odkrycie penicyliny do zwalczania bakterii stało się niewątpliwym przełomem w medycynie (Fleming, 1929; Lobanovska & Pilla, 2017) i zapoczątkowało serię badań nad środkami przeciwbakteryjnymi. Wagę tego odkrycia podkreśla fakt, że w 1945 r. Alexander Fleming, Ernst Boris Chain oraz Howard Walter Florey otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny „za odkrycie penicyliny i jej leczniczego działania w różnych chorobach zakaźnych”¹. Niestety, pierwsze doniesienia o oporności na ten antybiotyk pojawiły się już w 1940 r. i dotyczyły szczepu *Escherichia coli*, który inaktywował penicylinę poprzez produkcję penicylinazy. Kolejno, w 1942 r. udokumentowano oporność czterech szczepów *Staphylococcus aureus* (Lobanovska & Pilla, 2017). Oporność rozprzestrzeniała się w takim tempie, że pod koniec lat sześćdziesiątych XX w. ponad 80% szczepów *Staphylococcus aureus* było opornych na penicylinę (Lowy, 2003). Podjęte zostały próby wprowadzenia nowych antybiotyków, jednakże również w ich przypadku z czasem pojawiła się oporność, przez co skuteczność leczenia drastycznie malała.

Oporność bakteryjna jest niezwykle skomplikowanym zjawiskiem i można ją podzielić na wrodzoną lub nabytą. W przypadku tej pierwszej wskazać można fenotyp oporności wielolekowej u bakterii Gram-ujemnych, co spowodowane jest obecnością błony zewnętrznej i jej zmniejszonej przepuszczalności związanej z obecnością lipopolisacharydów oraz nadekspresją pomp efflux (Cox & Wright, 2013; Reygaert, 2018). Oporność nabyta natomiast powstaje w wyniku mutacji lub narażenia komórki na środki o działaniu przeciwbakteryjnym (Gajic et al., 2025).

Oporność bakteryjna nie powstaje w wyniku jednego prostego mechanizmu. Jest to zjawisko wielomechanizmowe, obejmujące m.in.:

- modyfikację struktury poryn, co wpływa na ograniczenie akumulacji leków poprzez zmniejszenie ich napływu. Kanaly białkowe – poryny, które znajdują się w błonie komórkowej odpowiedzialne są za pasywny transport różnych cząsteczek, w tym antybiotyków. Zmiana struktury lub mutacje w genach tych kanałów skutkują modyfikacją przepuszczalności błony, co bezpośrednio umożliwia bakteriom rozwinięcie oporności na antybiotyki. Poryny są zatem uważane za potencjalne cele dla nowych związków antibakteryjnych, szczególnie w przypadku bakterii Gram-ujemnych (Dé et al., 2001; Khameneh et al., 2019);
- przeprogramowanie struktury miejsca wiązania leku. Może odbywać się to w wyniku mutacji (spontaniczne mutacje w genie kodującym białko, będącym celem leku), modyfikacji enzymatycznych (prowadzących do metylacji genu) lub osłaniania (zastąpienia

¹ <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>

celu inną cząsteczką pełniącą taką samą funkcję) (Belay et al., 2024). Wówczas powinowactwo antybiotyków do miejsca aktywnego ulega znacznemu zmniejszeniu;

- modyfikację leków poprzez zmiany grup funkcyjnych, co jest charakterystyczne dla antybiotyków należących do aminoglikozydów. Zmiany te spowodowane są działaniem odpowiednich enzymów, a zmodyfikowane produkty charakteryzują się niższym powinowactwem do RNA, blokując syntezę białek, co wynika z braku zdolności do wiązania się z rybosomami (Belay et al., 2024; Khameneh et al., 2019);
- całkowity rozkład antybiotyku. Klasyczna degradacja określonych fragmentów cząsteczki antybiotyków (z grupy penicylin, cefalosporyn i karbapenemów) wywołana jest przez enzym hydrolityczny – β -laktamazę (Olsen, 2015). Każda cząsteczka enzymu jest w stanie zhydrolizować 10^3 cząsteczek antybiotyku na sekundę, co czyni terapię nieskuteczną (Khameneh et al., 2019);
- aktywne wydalanie leków z wnętrza komórki, w którym bakterie wykorzystują pompy efflux, jest najbardziej interesujące w kontekście przeprowadzonych badań. Są one podzielone na różne rodziny i odpowiadają za oporność na szeroką gamę antybiotyków, co omówione zostanie w dalszej części rozprawy (2.4 *Pompy efflux*). W konsekwencji tego działania wewnątrzkomórkowe stężenie leków jest niewystarczające, by osiągnąć zakładany efekt terapeutyczny (Khameneh et al., 2019; Soni et al., 2024).

W praktyce klinicznej oznacza to, że bakterie mogą równocześnie wykorzystywać kilka strategii obronnych, co znacząco utrudnia skuteczne leczenie infekcji i sprzyja rozprzestrzenianiu się szczepów lekoopornych. Uwzględniając różnice w strukturze bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, tj. obecność dodatkowej błony zewnętrznej w przypadku bakterii Gram-ujemnych, można stwierdzić, że to właśnie bakterie Gram-ujemne mogą wykorzystywać wszystkie mechanizmy, co czyni je większym zagrożeniem. W przypadku bakterii Gram-dodatnich brak błony zewnętrznej sprawia, że brakuje naturalnej bariery dla przenikania leku, a dodatkowo liczba potencjalnych pomp efflux obecnych w błonie cytoplazmatycznej jest ograniczona, co sprawia, że te dwa mechanizmy pełnią ograniczoną rolę w oporności bakterii należących do tej grupy (Reygaert, 2018). W efekcie, coraz częściej bakterie, zarówno Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne, są w stanie przetrwać bez zahamowania wzrostu po zastosowaniu środków antybakteryjnych (Almutairy, 2024).

Celem działania środków przeciwbakteryjnych jest ograniczenie lub zablokowanie kluczowych mechanizmów funkcjonowania komórki bakterii takich jak: hamowanie syntezy ściany komórkowej, depolaryzacja błony komórkowej, zakłócanie syntezy białek i kwasów nukleinowych oraz blokowanie wybranych szlaków metabolicznych (Mancuso et al., 2021; Reygaert, 2018).

Jednakże, jak już wspomniano wcześniej, bakterie są w stanie skutecznie wytworzyć mechanizmy przeciwdziałające tym efektom. Potrzebne są zatem nowe strategie terapeutyczne, które pozwolą przewyciężyć mechanizmy adaptacyjne komórek bakteryjnych, służące wytworzeniu lekooporności. Szczególną uwagę poświęca się terapiom łączonym, polegającym na jednoczesnym stosowaniu co najmniej dwóch związków o działaniu przeciwbakteryjnym w celu zwiększenia skuteczności leczenia. Związane jest to z mniejszym prawdopodobieństwem rozwinięcia przez patogen oporności na obie substancje w porównaniu z monoterapią oraz możliwością uzyskania synergistycznego efektu terapii kombinowanej (Mulani et al., 2019). Najczęściej spotyka się połączenia antybiotyków z dodatkową substancją lub czynnikiem np. bakteriofagami (Domingo-Calap & Delgado-Martínez, 2018; Peng et al., 2024), peptydami przeciwdrobnoustrojowymi (Sharafi et al., 2024; Téllez et al., 2018), nanocząsteczkami (Moradialvand et al., 2024) czy terapią fotodynamiczną. Należy jednak podkreślić, że w przypadku terapii kombinowanych największym wyzwaniem jest dobór odpowiednich związków lub czynników, które wzmocnią jej efektywność, tak aby końcowy efekt terapii był co najmniej addytywny, co zostało udowodnione w dalszej, eksperymentalnej części tej rozprawy.

2.3. Przeciwbakteryjna terapia fotodynamiczna

Szczególną alternatywą dla standardowych terapii farmakologicznych jest terapia fotodynamiczna, wobec której bakterie nie są w stanie wytworzyć skutecznych mechanizmów oporności ze względu na zbyt krótki czas pomiędzy podaniem PS, a jego działaniem oraz nakierunkowanie na wiele celów komórkowych jednocześnie (Al-Mutairi et al., 2018; Surur et al., 2024). Zwyczajowo aPDT opiera się na trzech filarach: promieniowaniu o odpowiednich parametrach, PS i tlenie cząsteczkowym (Sabino et al., 2020). Proces fotodynamiczny przebiega głównie w obecności tlenu. Promieniowanie o określonej długości fali wzbudza selektywnie zgromadzony PS, co prowadzi do powstania rodników i reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. *Reactive Oxygen Species*), w tym tlenu singletowego (Mahmoudi et al., 2018; Rajesh et al., 2011). W warunkach ograniczonej dostępności tlenu PS może również działać poprzez reakcje bezpośrednie z substratami komórkowymi.

Fotouczulacze we wzbudzonym stanie trypletowym podlegają dwóm typom reakcji fotochemicznych. W mechanizmie typu I, opartym na transferze elektronów, powstają aniony ponadtlenkowe (O_2^-), co prowadzi do wytwarzania rodników hydroksylowych (OH^\bullet) oraz nadtlenku wodoru (H_2O_2). Zaburza to integralność błony komórkowej, prowadząc do jej uszkodzeń. W przypadku reakcji II typu, bazującej na transferze energii, produktem jest wysoce reaktywny tlen singletowy. W wyniku zachodzących reakcji w obu mechanizmach zaobserwować

można m.in.: indukowanie uszkodzeń oksydacyjnych błon i ściany komórkowej, uszkodzenia DNA i rybosomów oraz utlenianie białek (Buzalewicz, Hołowacz, et al., 2021; Cieplik et al., 2018; Piksa et al., 2023; Rajesh et al., 2011).

Na powodzenie aPDT wpływ ma wiele czynników, jednakże najistotniejsze są: PS i jego właściwości oraz zastosowane źródło promieniowania (Abrahamse & Hamblin, 2016; Piksa et al., 2023). Od wykorzystanego PS zależy również sposób penetracji komórki i skuteczność jego akumulacji. Kationowe PS korzystają z oddziaływań elektrostatycznych i samoczynnych szlaków wychwytu. Mogą również, po połączeniu z lipopolisacharydami, wypierać jony Ca^{2+} i Mg^{2+} , zaburzając integralność błony zewnętrznej. Anionowe PS są transportowane w wyniku połączenia oddziaływań elektrostatycznych i transporterów białkowych (Pietrowska et al., 2022).

Kluczowe znaczenie ma umiejscowienie fotouczulacza, ponieważ ROS mają bardzo krótki promień dyfuzji i krótkotrwały czas życia (Cui et al., 2024; Lange et al., 2021; Przygoda et al., 2023; Redmond & Kochevar, 2006). Występujące w komórce związki (lipidy, białka i kwasy nukleinowe) reagują z tlenem singletowym i powodują jego wygaszenie. Ich oddziaływanie jest zatem ograniczone do bezpośredniego otoczenia, w którym są one generowane, a średni promień dyfuzji w środowisku komórkowym wynosi od 100 nm do 150 nm (Cui et al., 2024). Tym samym, efektywność aPDT jest ograniczona przez konieczność bliskiego kontaktu ROS z celami komórkowymi, a także przez stopień ich akumulacji i lokalizację wewnątrz komórki bakteryjnej. W przypadku tej terapii konieczne jest również, by wykorzystany PS nie był usuwany przez bakteryjne pompy efflux lub by znacznie ograniczyć ten proces.

2.4. Pompy efflux

Pompy efflux to białka błonowe, które są odpowiedzialne za aktywny transport różnorodnych substancji z wnętrza bakterii do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Powiązane są z jednym z mechanizmów oporności bakterii (Nishino et al., 2021), lecz pełnią też inne funkcje, m.in.: związane z formowaniem się biofilmu, wirulencją bakterii oraz regulacją fizjologii gospodarza.

Pompy efflux można podzielić na pierwotne i wtórne, w zależności od źródła energii, które jest wykorzystywane do wypompowania cząsteczek (Sharma et al., 2019). Energia może być pozyskiwana z hydrolizy adenosynotrifosforanu (ATP, z ang. *Adenosine TriPhosphate*), wówczas te pompy należą do pierwotnych pomp efflux (Gaurav et al., 2023). W przypadku czerpania energii z siły napędowej protonów, mówi się o wtórnych pompach efflux (Gaurav et al., 2023). W literaturze wyróżnia się 6 rodzin pomp efflux:

- ABC (z ang. *ATP-Binding Cassette*) – rodzina ABC jako jedyna należy do pierwotnych pomp efflux. Pompy należące do tej rodziny mogą pełnić rolę zarówno eksporterów (usuwanie

toksyn, antybiotyków i polisacharydów), jak i importera (transport aminokwasów i jonów). Wyróżnić można również trzeci typ, który jest zaangażowany w naprawę lub translację DNA (Davidson et al., 2008). Biorą one udział w dostarczaniu do wnętrza komórki składników odżywczych, w tym peptydów, witamin, aminokwasów, co wspomaga wirulencję (Akhtar & Turner, 2022). Pompy należące do tej rodziny spotykane są zarówno w przypadku bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich. Najlepiej poznaną pompą z rodziny ABC, w przypadku bakterii Gram-ujemnych, jest pompa MacAB-TolC (z ang. *Macrolide accommodation proteins A/B + Tolerance to Colicins*) (*Escherichia coli*) (Fitzpatrick et al., 2017; Huo et al., 2025; Jo et al., 2017). W przypadku bakterii Gram-dodatnich, pompy ABC przyjmują postać pojedynczego białka błonowego, a przykładem może być pompa EfrAB (z ang. *Enterococcus faecalis resistance A/B*) w *Enterococcus faecalis*, która została wykryta we wszystkich wielolekoopornych szczepach (Lavilla Lerma et al., 2014);

- SMR (z ang. *Small Multidrug Resistance*) – to najmniejsze pompy efflux, które mają postać czterech transbłonowych α -helis. Transportować mogą związki lipofilowe, antybiotyki lub też środki antyseptyczne i detergenty (Bay et al., 2008; Bay & Turner, 2009). W rodzinie SMR wyróżnić można dwa podtypy, które wykazują dużą zbieżność sekwencji aminokwasów. Pierwsza grupa powiązana jest z czwartorzędowymi kationami amoniowymi np. etydyna i metylowiologen. Druga natomiast odpowiada za transport antyporterów guanidynowych (Chetri, 2023; Kermani et al., 2020). Przykłady pomp efflux z rodziny SMR to EmrE (z ang. *Ethidium multidrug resistance E*) w komórkach bakterii gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, EbrAB (z ang. *Ethidium bromide resistance A/B*) w komórkach bakterii gatunku *Bacillus subtilis*, SsmE (z ang. *Staphylococcal small multidrug efflux pump*) w komórkach bakterii gatunku *Serratia marcescens* i EmrE z *Escherichia coli* (Srinivasan et al., 2009);
- MATE (z ang. *Multidrug And Toxin Extrusion*) – do eksportu pompy z tej rodziny wykorzystują gradient elektrochemiczny H^+ lub Na^+ , co wyróżnia je na tle innych pomp wtórnych (Lu, 2016). Na podstawie sekwencji aminokwasów można dokonać ich podziału na następujące podrodziny: NorM (z ang. *Norfloxacin outflow resistance Multidrug transporter*), DinF (z ang. *Damage-inducible Flux protein*) oraz podrodziny eukariotyczne. W przypadku tej ostatniej podrodziny, są to pompy zależne od H^+ (Masuda et al., 2006). W większości scharakteryzowane pompy należące do rodziny MATE są niezdolne do ekstruzji związków o ładunku ujemnym (Lu, 2016). Pompy NorM odpowiadają za ochronę przed uszkodzeniami spowodowanymi przez ROS, a dodatkowo są odpowiedzialne za usuwanie związków kationowych (De Gaetano et al., 2023). Pompy z rodziny DinF odpowiadają

za oporność na szereg antybiotyków, np. moksyflokscynę, cyprofloksacynę i lewofloksacynę w przypadku bakterii gatunku *Streptococcus pneumoniae* (Tocci et al., 2012);

- MFS (z ang. *Major Facilitator Superfamily*) – jest to największa scharakteryzowana rodzina pomp efflux w przypadku bakterii Gram-ujemnych. Zbudowane są one z 12 lub 14 helis transblonowych (Du et al., 2015). W obrębie tej rodziny można wyróżnić: uniportery, które do transportu nie wykorzystują jonów; symportery, które transportują substrat i jony w tym samym kierunku; antyportery, które przenoszą substrat i jony, ale w przeciwnych kierunkach (Du et al., 2018). Jako przykładowe pompy z tej rodziny można wymienić Lde (z ang. *Listeria drug efflux*) w komórkach bakterii gatunku *Listeria monocytogenes*, NorA (z ang. *Norfloxacin resistance protein A*) w przypadku bakterii gatunku *Staphylococcus aureus* (Huang et al., 2022). Poza procesem ekstruzji, pompy z rodziny MFS pełnią również inne istotne role w szlakach metabolicznych komórek. Przyczyniają się do wywoływania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, podtrzymywania stabilności ściany komórkowej, mają również wpływ na ruchliwość i wirulencję patogenów (Pasqua et al., 2021);
- RND (z ang. *Resistance-Nodulation Division*) – rodzina RND jest najistotniejsza pod kątem oporności na leki u bakterii Gram-ujemnych. Te pompy mogą wydalać szeroką gamę antybiotyków i innych związków toksycznych dla bakterii. Cechują się charakterystyczną trójdzielną budową: białko błony zewnętrznej, peryplazmatyczne białko adaptorowe oraz białko błony wewnętrznej (Nikaido, 2010). Im częściej bakterie narażane są na stres związany ze stosowaniem środków antybakteryjnych, tym bardziej zwiększa się częstotliwość mutacji pomp. Potencjalne mutacje, w którejkolwiek domenie pomp, mogą prowadzić do zmian powinowactwa pomp do ich substratów, a w konsekwencji – do wzrostu lekooporności (Zwama & Nishino, 2021). Wśród pomp z rodziny RND można wyróżnić również pompy oporności wielolekowej AcrAB-TolC (z ang. *Acriflavine resistance A/B + Tolerance to Colicins*), MexAB-OprM (z ang. *Multiple efflux protein + Outer membrane protein M*), CmeABC (z ang. *Campylobacter multidrug efflux A/B/C*), MtrCDE (z ang. *Multiple transfer resistance C/D/E*), które zaangażowane są w modulację przeżywalności i patogeniczności bakterii (Piddock, 2006). W przypadku komórek bakterii gatunku *Escherichia coli* pompy RND biorą także udział w ekstruzji metali ciężkich. Jony metali ciężkich również wpływają na wzrost i przeżywalność bakterii, jednakże bakterie, wykorzystując działanie pomp efflux mogą stać się odporne również na ten czynnik (Huang et al., 2022);
- PACE (z ang. *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*) – to niedawno odkryta rodzina pomp efflux (Hassan et al., 2015). Pierwszym zidentyfikowanym białkiem z tej rodziny jest

Acel w komórkach bakterii gatunku *Acinetobacter baumannii* (Bolla et al., 2020), niedawno opisano kolejną: PA2889 u *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao et al., 2022). W przypadku obu pomp potwierdzono, że mogą one transportować chlorheksydynę (De Gaetano et al., 2023). Pompy z tej rodziny biorą udział w transporcie biosyntetycznych biocydów, które stosowane są jako środki o właściwościach dezynfekujących (Hassan et al., 2018), co istotnie kodowane są przez wysoce konserwatywne geny, co podkreśla istotność pełnionych przez nie funkcji (De Gaetano et al., 2023). Te pompy nie występują w przypadku wszystkich gatunków bakterii, np. nie stwierdzono genów kodujących białka z rodziny PACE w materiale genetycznym *Escherichia coli* (Gaurav et al., 2023).

Nadekspresja pomp efflux, należących do różnych rodzin, jest często spotykana u opornych patogenów, co znacznie obniża wewnątrzkomórkowe stężenie substancji mającej właściwości antybakteryjne, a co za tym idzie – również skuteczność całej terapii. Hamowaniem aktywności bakteryjnych pomp efflux można sterować na co najmniej sześć sposobów (Pagès & Amaral, 2009; Sharma et al., 2019; Zhang et al., 2023):

- 1) obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę pomp poprzez regulację genetyczną – zakłócenie transkrypcji lub translacji tego genu. Do tego celu wykorzystywane są oligonukleotydy antysensowne, interferujące RNA lub inne cząsteczki antysensowne;
- 2) hamowanie montażu poszczególnych elementów pomp, w wyniku czego blokowane jest powstanie funkcjonalnej pompy efflux;
- 3) chemiczna modyfikacja substancji, by pompa nie odbierała ich jako substratów. W ten sposób zmniejsza się ich powinowactwo i blokuje się wypływ substancji;
- 4) blokowanie kanału błony zewnętrznej za pomocą cząsteczki wykazującej silne powinowactwo do tego obszaru. Wykorzystać można go jedynie w przypadku bakterii Gram-ujemnych;
- 5) blokowanie pompy w jej miejscu aktywnym za pomocą cząsteczki nieantybiotykowej i uniemożliwienie związania się substratu;
- 6) przekształcenie mechanizmu energetycznego pomp efflux. Odbywać może się poprzez ingerencję w źródło energii zasilającej pompę poprzez blokowanie syntezy ATP lub zaburzenie siły protonowej.

2.5. Inhibitory bakteryjnych pomp efflux

Inhibitory pomp efflux to substancje, które blokują aktywność wspomnianych pomp. Ich zastosowanie może zablokować pompy efflux i wyeliminować jeden z czynników ograniczających skuteczność aPDT. W ostatnich latach można zaobserwować tendencję do poszukiwania EPI

pochodzenia naturalnego do zastosowań w terapii przeciwbakteryjnej, w szczególności w przypadku bakterii wielolekoopornych. Ich niewątpliwą zaletą jest bezpieczeństwo i korzystniejszy profil toksyczności dla komórek gospodarza, niski koszt, wysoka skuteczność i ogromne możliwości rozwoju w zastosowaniach aplikacyjnych (Zhang et al., 2024). Korzyści płynące z zastosowania EPI w terapii przeciwbakteryjnej, również kombinowanej, jest wiele. Wyróżnić można m.in. zwiększenie stężenia leku wewnątrz komórek, ponowne uwrażliwienia bakterii na leki oraz ograniczenie możliwości rozwoju szczepów opornych (Mahamoud et al., 2007).

Podziału EPI można dokonać na kilka sposobów. Pierwszym z nich jest klasyfikacja na podstawie różnych mechanizmów działania. Wśród nich można wyróżnić m.in. zakłócenie ekspresji genów związanych z pompami efflux, modyfikację chemiczną substratów, hamowanie wiązania substratu poprzez związanie z pompą efflux innego związku, blokowanie zewnętrznej części pompy efflux, zaburzenie integralności błony i ingerencję w źródło energii zasilającej pompę (Askoura et al., 2011; Ren et al., 2024; Zhang et al., 2023). Jednakże dokładny mechanizm działania większości EPI nie jest do końca znany, stąd powszechnie stosowanym podziałem jest ten, który uwzględnia ich pochodzenie. Wyróżnić można zatem EPI pochodzenia naturalnego oraz syntetyczne. Poniżej przedstawione zostaną wybrane przykłady związków należących do obu grup.

W przypadku pierwszej grupy, tj. EPI pochodzenia naturalnego, można wymienić metabolity wtórne (np. flawonoidy, polifenole i alkaloidy) pochodzące z roślin leczniczych. Substancje te są przedmiotem zainteresowania wielu naukowców ze względu na wpisujący się w trendy model leczenia związkami naturalnymi, których wykorzystanie zwiększa bezpieczeństwo terapii (Liu et al., 2025; Uc-Cachón et al., 2025). Wiele badań skupia się również na produktach pochodzenia roślinnego, takich jak owoce, przyprawy i nasiona, doceniając brak ich toksyczności wobec komórek eukariotycznych, co odróżnia EPI pochodzenia naturalnego od związków syntetycznych (Seukep et al., 2020). Dużym zainteresowaniem cieszą się również olejki eteryczne, ze względu na synergiczne działanie z antybiotykami, możliwość ponownego uwrażliwiania bakterii na terapię i zakłócanie procesu tworzenia biofilmu (Ghazal et al., 2022; Iskandar et al., 2025; Mouwakeh et al., 2019; Sharifi et al., 2021). Do EPI pochodzenia naturalnego należy:

- kapsaicyna, która pozyskiwana jest głównie z papryki chili z rodzaju *Capsicum*. Posiada zdolność do wiązania się z miejscem aktywnym pomp efflux, co uniemożliwia ekstruzję substancji antybakteryjnych (Zhang et al., 2023). Udowodniono, że jest ona inhibitorem pompy NorA u *Staphylococcus aureus* i wykazano, że łącząc kapsaicynę z cyprofloksacyną możliwe jest osiągnięcie wzmocnionego efektu terapeutycznego w porównaniu z samym antybiotykiem. Dodatkowo zaobserwowano ograniczenie pojawiania się szczepów opornych *Staphylococcus aureus* (Kalia et al., 2012);

- piperyna, będąca alkaloidem znajdującym się w zewnętrznej warstwie ziaren pieprzu *Piper nigrum*, znalazła się na liście związków „ogólnie uznawanych za bezpieczne”, stworzonej przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, z ang. *Food and Drug Administration*). Jej mechanizm działania opiera się na bezpośrednim wiązaniu z miejscem aktywnym pomp efflux (Liu et al., 2023). Potwierdzono działanie piperyny na pompy NorA i MdeA u *Staphylococcus aureus*, co w połączeniu z cyprofloksacyną (NorA) i mupirocyną (MdeA) przyniosło zadowalającą skuteczność terapii. Znalazło to również odzwierciedlenie w obniżeniu MIC antybiotyku (Mirza et al., 2011; Zhang et al., 2024). Potwierdzono, że piperyna może modyfikować działanie również innych pomp efflux z rodziny MFS (Seukep et al., 2020);
- berberyna, znajdująca się w korzeniach, liściach bądź owocach kilku roślin, w tym berberysu *Berberis* i gorzknika kanadyjskiego *Hydrastis canadensis*. Uważana jest w medycynie chińskiej i zachodniej za środek przeciwbakteryjny, chociaż jej spektrum działania jest zdecydowanie szersze, tj. wykazuje również aktywność przeciwwirusową, przeciwpasożytniczą i przeciwgrzybiczną (Zhang et al., 2024). Jej wpływ na inhibicję aktywności pomp efflux jest spowodowany zmniejszeniem ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę elementów pomp efflux (Zhang et al., 2023). Interesujące jest również działanie terapeutyczne jej metabolitów, co także wpływa na skuteczność terapii (Feng et al., 2021). Przeprowadzone badania potwierdziły, że połączenie berberyny i cyprofloksacyny zwiększa wrażliwość *Klebsiella pneumoniae* na ten antybiotyk (Zhou et al., 2016). Udowodniona została również aktywność berberyny wobec pompy NorA u *Staphylococcus aureus* oraz MexAB-OprM u *Pseudomonas aeruginosa* (Aghayan et al., 2017; Seukep et al., 2020);
- kurkumina, którą znaleźć można w kłączach ostryżu długiego *Curcuma longa*, zwanego potocznie kurkumą. Mechanizm jej działania opiera się na zmniejszeniu ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę pomp efflux (Zhang et al., 2023). Jej zastosowanie w terapii może przyczynić się do zmniejszenia ekspresji TetK (z ang. *Tetracycline efflux pump K*) u bakterii gatunku *Escherichia coli*, co przekłada się na zwiększenie skuteczności terapii tetracykliną (Zhang et al., 2023). Ponadto wykazuje działanie wobec pomp efflux *Pseudomonas aeruginosa* (Negi et al., 2014) oraz NorA, MdeA, TetK i MsrA *Staphylococcus aureus* (Joshi et al., 2014);
- galusan epigallokatechiny (EGCG, z ang. *EpiGalloCatechin 3-Gallate*) to polifenol pozyskiwany głównie z liści zielonej herbaty *Camellia sinensis*. Przeprowadzone badania wskazują na jego aktywność zarówno w przypadku pomp efflux występujących u gatunków

Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich (Duda-Madej et al., 2025), co świadczy o kilku możliwych mechanizmach działania. Jego skuteczność jako EPI została potwierdzona w przypadku pompy MexAB-OprM u bakterii gatunku *Pseudomonas aeruginosa* w połączeniu z chloramfenikolem i tetracykliną (Kanagaratnam et al., 2017). EGCG może blokować również pompy występujące u bakterii gatunku *Staphylococcus aureus* (NorA, TetB (z ang. *Tetracycline efflux pump B*) i TetK) (Roccaro et al., 2004) i powodować wzrost wrażliwości na antybiotyki u bakterii gatunku *Enterococcus faecium*, u których zachodzi ekspresja pomp efflux z rodziny MATE (Fiedler et al., 2016). EGCG może również hamować wzrost *Bacillus subtilis* w wyniku oddziaływań z białkami powierzchniowymi komórek bakteryjnych (Nakayama et al., 2015);

- bajkalina jest naturalnym związkiem flawonoidowym, pozyskiwanym z korzeni tarczycy bajkalskiej *Scutellaria baicalensis*. Ma działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe (Moore et al., 2016). Działa poprzez zakłócenie syntezy ATP (Zhang et al., 2023). Może blokować pompy wypływowe szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA – z ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), w tym pompę NorA (Chan et al., 2011; Fujita et al., 2005). Inne badania wykazały również potencjał tego związku do modulacji oporności na tetracyklinę u bakterii gatunku *Staphylococcus aureus* (Moulick & Roy, 2024), a w przypadku połączenia bajkaliny z meropenemem lub polimyksyną E osiągnięto efekt synergistyczny w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy *Klebsiella pneumoniae* (Qin et al., 2024). Ten bioflawonoid hamuje również proliferację bakterii, zaburza integralność błony i zwiększa ich przepuszczalność, co zostało udowodnione dla MRSA oraz *Stenotrophomonas maltophilia* (Chen et al., 2025).

W przypadku syntetycznych EPI uwaga skupiona została na trzech najpopularniejszych związkach, są to:

- fenyloalanina-arginina- β -naftyloamid (PA β N, z ang. *Phenylalanine-Arginine β -Naphthylamide*), który był pierwszym, odkrytym w 2001 r., EPI (Sharma et al., 2019). Jest to najlepiej udokumentowany inhibitor w przypadku bakterii Gram-ujemnych i zalicza się go do grupy związków peptydomimetycznych. Znalazł zastosowanie w zwalczaniu wielolekoopornych szczepów *Klebsiella pneumoniae* w połączeniu z szeroką gamą antybiotyków: chloramfenikolu, tetracykliny i chinolonów (Hasdemir et al., 2004; Zhang et al., 2024). Udowodniono również, że wzmacnia aktywność antybakteryjną lewofloksacyliny i erytromycyny przeciwko *Pseudomonas aeruginosa*, u których wykryto nadekspresję pomp MexAB-OprM (Lomovskaya et al., 2001). Związek ten wykorzystuje różne mechanizmy inhibicji w tym zmniejszenie ekspresji genów związanych z pompami efflux i zmianę

przepuszczalności błony bakteryjnej (Compagne et al., 2023; Lamers et al., 2013). Pomimo obiecujących właściwości PAβN charakteryzuje się toksycznością wobec komórek ssaków, co znacznie ogranicza możliwości zastosowania go w warunkach klinicznych (Zhang et al., 2023);

- m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (CCCP, z ang. *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenylhydrazone*) dzięki blokowaniu siły protonomotorycznej i zakłócaniu syntezy ATP posiada zdolności do hamowania większości pomp efflux (Zhang et al., 2023). Udowodniono, że CCCP może wzmocnić aktywność antybakteryjną antybiotyków (Sanchez-Carbonel et al., 2021), a nawet ponownie uwrażliwić bakterie na antybiotyki, np. *Enterobacteriaceae* odporne na kolistynę (Sekyere & Amoako, 2017). Jest najbardziej popularnym laboratoryjnym EPI, jednakże pojawiły się wątpliwości, czy jego skuteczność spowodowana jest dezaktywacją pomp efflux czy faktem, iż komórki bakteryjne stają się metabolicznie nieaktywne w wyniku zakłócenia siły protonowej (Sharma et al., 2019). Ponownie, główną przeszkodą w rozwoju zastosowań klinicznych okazała się toksyczność dla komórek eukariotycznych;
- 1-(1-naftylo metylo)-piperazyna (NMP, z ang. *1-(Naphthalen-1-ylMethyl)Piperazine*) opisana po raz pierwszy w 2005 roku przez Bohnerta i Kerna. Mechanizm jego działania opiera się na wiązaniu EPI z pompami efflux, przez co zmniejszona zostaje zdolność do interakcji z substratami (Sharma et al., 2019). Potwierdzono, że NMP uwrażliwia komórki *Escherichia coli* z nadekspresją AcrAB i AcrEF (pompy z rodziny RND) na lewofloksacyne. Obserwowano wówczas zwiększoną akumulację antybiotyku w komórkach bakteryjnych (Bohnert & Kern, 2005). Podobnie jak PAβN i CCCP, również i NMP może wykazywać toksyczność dla komórek ssaków (Sharma et al., 2019).

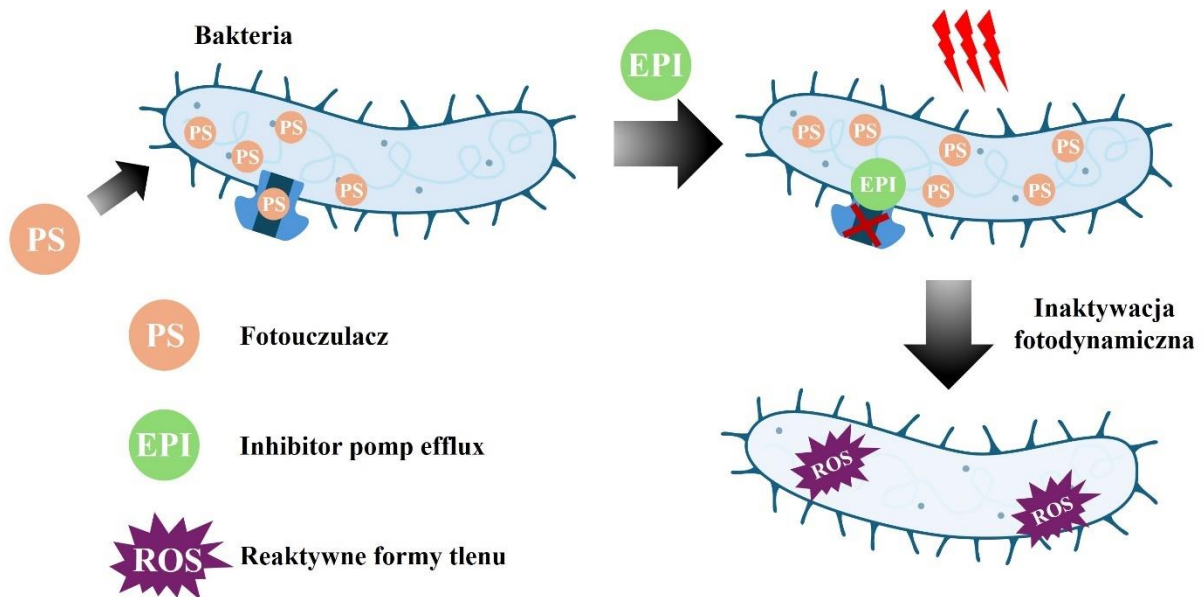
Mnogość EPI pozwala na precyzyjny dobór związków do konkretnych gatunków bakterii, by blokowanie pomp było jak najbardziej efektywne. Zdecydowaną przewagę nad syntetycznymi EPI mają związki pochodzenia naturalnego, gdyż jak wspomniano wyżej PAβN, CCCP i NMP mogą wykazywać toksyczność wobec komórek. W przypadku zastosowania EPI w terapii antybakteryjnej najistotniejsze jest dopasowanie ich do pomp efflux, których ekspresję wykazują bakterie będące celem terapii. Mogą one w znaczący sposób wpłynąć na efektywność terapii fotodynamicznej (fotoinaktywację bakterii), ale też antybiotykoterapii. Dobór EPI w przeprowadzonych przeze mnie badaniach uwarunkowany był różnorodnością mechanizmów blokowania pomp efflux oraz powinowactwa do inhibicji pomp z określonych rodzin.

2.6. Wpływ inhibitorów pomp efflux na komórki bakteryjne i możliwość zastosowania ich w terapii antybakteryjnej

Pompy efflux, jak wcześniej omówiono, są odpowiedzialne za oporność bakterii na środki przeciwbakteryjne. Potwierdzono jednak, że te białka są zaangażowane również w tworzenie struktur bakteryjnych, więc zakłócenie ich funkcji może ten proces utrudnić (Ren et al., 2024). Ekspresja pomp efflux może zarówno promować tworzenie biofilmu i innych struktur bakteryjnych, jak i przeciwdziałać temu procesowi. Niezwykle ważną rolę w rozwoju struktur bakteryjnych pełni również quorum sensing. Pozwala ono na komunikację między bakteriami poprzez cząsteczki sygnałowe – autoinduktory i kontrolowanie zagęszczenia komórek. Wzrost populacji bakterii wywołuje produkcję autoinduktorów aż do osiągnięcia ich określonego stężenia. Następnie wiążą się one z odpowiednimi receptorami, powodując zmianę ekspresji genów, co przyczynia się do powstawania struktur przestrzennych formowanych przez bakterie (Giannakara & Koumandou, 2022; Omwenga & Awuor, 2024). Zidentyfikowano przynajmniej cztery zadania, w które zaangażowane są pompy efflux przy rozwoju struktur bakteryjnych, w tym biofilmów: ułatwianie tworzenia matrycy zewnątrzkomórkowej, komunikowanie się komórek za pomocą wytwarzanych przez nie związków chemicznych w celu regulacji genów odpowiedzialnych za zagęszczenie populacji oraz zakłócenie tej komunikacji (quorum sensing i quorum quenching) oraz usuwanie szkodliwych substancji, jak również udział w pośredniej regulacji genów odpowiedzialnych za tworzenie struktur, początkowanie i zahamowywanie procesu adhezji (Alav et al., 2018; Knight et al., 2018; Lamarche & Déziel, 2011; Ren et al., 2024; Richmond et al., 2016; Zhu et al., 2011). Widzimy zatem, że EPI, wpływając na proces formowania się struktur bakteryjnych, mogą również ogrywać znaczącą rolę w kontroli dynamiki rozwoju biofilmów oraz kolonizacji powierzchni przez bakterie.

Kolejną cechą EPI, ważną z punktu ograniczenia lekooporności bakterii, jest możliwość zahamowania niektórych mechanizmów, pozwalających bakteriom na wytworzenie oporności. Tym samym zastosowanie EPI w terapii może przyczynić się do zwiększenia jej skuteczności. Jednym z rozwiązań może być ich połączenie z omawianą wcześniej terapią fotodynamiczną, której zalety zostały wcześniej omówione, z innymi substancjami (Youf et al., 2021), w tym EPIs (Tegos et al., 2008). Schematycznie mechanizm kombinowanej terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem PS i EPI przedstawiono na Rysunku 1. Cząsteczki PS mogą zostać rozpoznane przez bakterie jako toksyczne, a w konsekwencji usunięte z wnętrza komórki właśnie poprzez pompy efflux na drodze aktywnego transportu przez błony komórkowe. Wykorzystanie EPI może przyczynić się do zwiększenia akumulacji PS we wnętrzu komórki bakteryjnej poprzez ograniczenie ekstruzji

substancji do przestrzeni międzykomórkowej. Oznacza to, że wyższe stężenie PS podczas naświetlania promieniowaniem o odpowiedniej długości fali, charakterystycznej dla pasm absorpcji Q wykorzystanego fotouczulacza, może skutkować bardziej efektywną inaktywacją bakterii w wyniku produkcji ROS. Tym samym, poprzez odpowiedni dobór zestawów PS i EPI, możliwe jest zwiększenie skuteczności terapii przeciwbakteryjnych, co było jednym z głównych celów prowadzonych przeze mnie prac badawczych, które zostaną przedstawione w kolejnym rozdziale mojej rozprawy doktorskiej.



Rysunek 1 Kombinowana terapia fotodynamiczna w oparciu o PS i EPI.

3. Opis prac

Rozprawa doktorska podsumowuje wyniki badań zawarte w cyklu trzech publikacji, których celem była identyfikacja i opracowanie alternatywnych skojarzonych metod antybakteryjnych, w oparciu o związki pochodzenia naturalnego, mających zastosowanie zarówno w terapii aPDT, jak i ograniczeniu rozwoju struktur przestrzennych formowanych przez bakterie, oraz wykazanie, że DHT może zostać z powodzeniem wykorzystana jako ilościowa technika pomiarowa, która dotychczas nie była standardowo wykorzystywana w badaniach oceny skuteczności kombinowanej aPDT i wpływu substancji na namnażanie się bakterii.

Każdy z opublikowanych artykułów odnosi się do eksperymentalnej weryfikacji postawionych w rozprawie doktorskiej hipotez badawczych. Próbki mikrobiologiczne pozyskałam w ramach współpracy z dr hab. Anną Matczuk, prof. uczelni z Zakładu Mikrobiologii Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz prof. dr hab. Aliną Wieliczko z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Do badań wykorzystałam bakterie klasyfikowane jako organizmy patogenne kategorii II, zgodnie z załącznikiem nr 1 do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 29 listopada 2002 r. (poz. 1798). Wskazane szczepy bakteryjne pochodziły z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (ATTC, z ang. *American Type Culture Collection*) lub Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM, z ang. *Polish Collection of Microorganisms*):

- *Proteus mirabilis* ATCC 25212,
- *Bacillus cereus* PCM 1948,
- *Escherichia coli* ATCC 25922,
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Wybór uwarunkowany był przynależnością gatunków zarówno do grupy bakterii Gram-ujemnych (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*), jak i Gram-dodatnich (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*), co umożliwiło ocenę skuteczności badanych związków oraz terapii kombinowanej w odniesieniu do bakterii o odmiennej budowie ściany komórkowej. Dodatkowo, w obrębie bakterii Gram-dodatnich uwzględniono organizmy o różnej morfologii: *E. faecalis* – ziarniak oraz *B. cereus* – laseczka. Wybrane gatunki charakteryzują się ponadto obecnością zróżnicowanych i dobrze opisanych systemów pomp efflux, odgrywających kluczową rolę w oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe oraz w tworzeniu biofilmów, co czyni je odpowiednimi modelami do badań nad modulacją aktywności pomp efflux i jej znaczeniem dla skuteczności aPDT.

W badaniach wykorzystałam związki pochodzenia naturalnego: dwa PSs – Chlorin e6 i Pheophorbide a oraz sześć EPIs: berberynę, palmatynę, piperynę, kurkuminę, kapsaicynę i kumarynę.

3.1. Publikacja 1 – *The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of Escherichia Coli by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging*

Artykuł ten przedstawia eksperymentalną weryfikację hipotezy badawczej **H1**, tj. „kombinacja dwóch odpowiednio dobranych fotouczulaczy zwiększa akumulację związków wewnątrz komórek bakteryjnych oraz prowadzi do uzyskania co najmniej addytywnego efektu terapii fotodynamicznej”.

W ramach przeprowadzonych badań skoncentrowałam się na ocenie możliwości zwiększenia skuteczności aPDT poprzez zastosowanie kombinacji dwóch odpowiednio dobranych PS w odniesieniu do modelowego mikroorganizmu, jakim były bakterie gatunku *Escherichia coli*. aPDT, mimo udokumentowanego potencjału jako alternatywa wobec klasycznych antybiotyków, wykazuje ograniczoną skuteczność wobec bakterii Gram-ujemnych. Wynika to przede wszystkim z obecności zewnętrznej błony komórkowej oraz aktywności systemów efflux odpowiedzialnych za usuwanie substancji z wnętrza komórki, co utrudnia akumulację PS. W związku z tym podjęłam próbę zaproponowania nowej strategii terapeutycznej pozwalającej na zwiększenie wewnątrzkomórkowej akumulacji PS, a w konsekwencji na zwiększenie efektywności terapii.

Pierwszym etapem tej pracy był dobór odpowiedniego zestawu PSs dla kombinowanej terapii aPDT i charakteryzacja ich właściwości absorpcyjnych. Wybrałam dwa PS: kationowy Pheophorbide a (będący również EPI) oraz anionowy Chlorin e6. Ze względu na kationowy charakter Pheophorbide a moduluje transport błonowy i ogranicza aktywność pomp efflux, co w konsekwencji sprzyja zwiększonej akumulacji Chlorin e6 w komórkach bakteryjnych ([Hurst et al., 2019](#); [Sharma et al., 2019](#)).

Wykorzystując spektroskopię UV-VIS zdefiniowałam pasma absorpcji roztworów obu związków. Zarejestrowane widma absorpcyjne wykazały, że oba analizowane PSs wykazują silną absorpcję dla długości fali ok. 405 nm. Pozwoliło to na określenie warunków wzbudzenia fluorescencji, umożliwiających charakteryzację akumulacji PSs w komórkach bakterii (mikroskopia konfokalna, $\lambda_{ex}=405$ nm). Z kolei drugie pasmo absorpcji położone przy długości fali ok. 655 nm wykorzystane zostało do indukcji efektu fotodynamicznego i generacji ROS. W eksperymencie wykorzystano *Escherichia coli* wysiewane na agarze tryptynowo-sojowym w temperaturze 37°C i zawieszane w 0,9% NaCl o stężeniu 0,5 McFarlanda. Próbkę zostały przygotowane na szalkach μ -Dish 35 mm. PS rozpuszczone zostały w NaCl, w celu uzyskania stężenia 0,84 mM. Eksperyment

obejmował trzy etapy. Pierwszym z nich było dodanie roztworu jednego PS lub ich kombinacji do części próbek, przygotowano również próbki kontrolne jasne/ciemne. Wszystkie próbki poddane zostały 24 godz. inkubacji w 37°C. Kolejno, każda próbka została przepłukana dwukrotnie 0,9% NaCl w celu usunięcia PS, który nie wszedł w interakcje z bakteriami. Tak przygotowane próbki zobrazowałam, wykorzystując cyfrowy holotomograf i mikroskop konfokalny. Następnie, część próbek poddałam naświetlaniu laserem 655 nm i wraz z pozostałymi umieściłam je w temperaturze 4°C na 24 godz. W ostatnim etapie ponownie przepłukałam próbki i zobrazowałam.

Badanie interakcji PS z komórkami po 24 godz. inkubacji przeprowadziłam przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Pozwoliło to na jakościową ocenę lokalizacji i poziomu akumulacji PSs w komórkach *E. coli*. Analiza kolokalizacji natężenia sygnału fluorescencyjnego w pojedynczych komórkach bakteryjnych potwierdziła, że zastosowanie kombinacji Chlorin e6 i Pheophorbide a prowadzi do wyraźnie zwiększonej akumulacji związków wewnątrz komórek w porównaniu z zastosowaniem każdego PS osobno.

Kluczowym elementem metodologicznym przeprowadzonych badań było zastosowanie cyfrowej holotomografii jako ilościowej, bezznacznikowej techniki obrazowania pojedynczych żywych komórek. Zarejestrowane hologramy umożliwiły rekonstrukcję tomogramu 3D-RI fragmentu próbki. Metoda ta umożliwiła trójwymiarową analizę RI komórek, który bezpośrednio koreluje z gęstością suchej masy komórki oraz jej zmianami strukturalnymi. RI jest wskaźnikiem zmian biofizycznych zachodzących w komórkach (Buzalewicz, Ulatowska-Jarża, et al., 2021). Dzięki temu możliwe było ilościowe monitorowanie zmian zachodzących w komórkach bakteryjnych zarówno na etapie akumulacji fotosensybilizatorów, jak i po przeprowadzeniu terapii fotodynamicznej, czyli ich fotoinaktywacji.

Analiza rozkładów wartości RI składała się z kilku kroków. W pierwszym numerycznie zrekonstruowane tomogramy 3D-RI zaimportowano z oprogramowania STEVE do oprogramowania MATLAB. Kolejno wybrano pojedynczy tomogram 2D-RI, reprezentujący przekrój tomogramu 3D-RI, dla którego uzyskano najlepszy kontrast badanych komórek. Zastosowany algorytm opierał się na filtrze medianowym, który zredukował artefakty obecne na wybranych tomogramach. Następnie utworzono maskę konturową w oparciu o algorytm progowania histogramu RI. Maskę konturową została nałożona na oryginalne dane, umożliwiając automatyczne rozróżnienie obszarów zajmowanych przez komórki i bezpośrednie określenie wartości RI komórek obecnych w próbce. W rezultacie uzyskano wartości RI pikseli obszarów zajmowanych przez komórki. Dla każdego tomogramu określono medianę wartości RI (Pietrowska et al., 2022). Na jej podstawie wyznaczono kolejny parametr, jakim jest gęstość suchej masy komórek (Friebel & Meinke, 2006). Takiej analizie poddano 20 tomogramów z każdej grupy.

We wszystkich analizowanych próbkach inkubowanych przez 24 godz. z PS lub ich kompozycją, zaobserwowałam wzrost wartości RI, który wywołany był lokalnymi zmianami w gęstości zależnymi od stopnia akumulacji PS wewnątrz komórek. Największy wzrost wartości RI zarejestrowałam dla kombinacji PSs, co wskazuje na najefektywniejszą penetrację komórek przez zaproponowany zestaw. W analizie tomogramów przeprowadziłam również analizę statystyczną pomiędzy grupami eksperymentalnymi. Przyjęłam za punkt odniesienia wartość mediany RI komórek w warunkach kontrolnych (bez PS) oraz wartości RI uzyskane po ekspozycji na pojedyncze PS i ich kombinację. Różnice pomiędzy tymi warunkami, analizowane przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji, pozwoliły na obiektywną ocenę wpływu kombinacji PS na ich wewnątrzkomórkową akumulację. Otrzymane wyniki testów statystycznych potwierdziły, że występują istotne różnice pomiędzy analizowanymi grupami komórek. Uzyskana wartość p była istotnie mniejsza ($6,827 \times 10^{-11}$) od przyjętego poziomu istotności (0,05), co oznacza, że analiza wariancji odrzuciła hipotezę zerową, że wszystkie średnie były równe.

Analiza tomogramów zarejestrowanych 48 godz. po rozpoczęciu eksperymentu pozwoliła na pozyskanie danych na temat efektywności aPDT na podstawie analizy porównawczej próbek podanych działaniu fotoinaktywacji i kontrolnych. W przypadku próbek bez dodanego PS i niepoddanych naświetlaniu, wartość RI maleje w czasie, co świadczy o obumieraniu komórek z powodu braku składników odżywczych. Z kolei próbki z PS, ale nienaświetlane, miały większą wartość RI, co świadczy o tym, że zakumulował się w nich PS. W przypadku naświetlanych próbek z PS zaobserwowałam spadek wartości RI, co mogło być wywołane przez ich fotoinaktywację. Lokalne zmniejszenie gęstości wewnątrzkomórkowej, objawiające się zmianą wartości RI w obrębie pojedynczych komórek bakterii, mogą być spowodowane przez fotoinaktywację, która przejawia się zmianami ultrastrukturalnymi w komórkach. W wyniku efektu fotodynamicznego zniszczeniu ulegają struktury komórkowe bakterii (DNA, ściana komórkowa, rybosomy), ROS/wolne rodniki wywołują również denaturację białek i enzymów, zahamowanie syntezy białek lub agregację makrocząsteczek cytoplazmatycznych (Alves et al., 2014). Największą różnicę w wartości przed naświetlaniem oraz 24 godz. po nim zaobserwowałam w przypadku kombinacji PS, co sugerować może, że w przypadku połączenia dwóch substancji proces fotoinaktywacji przebiegł najefektywniej. Korzystając z wyznaczonych wartości RI komórek na poszczególnych tomogramach obliczyłam kolejny parametr, jakim jest gęstość suchej masy. Fotoinaktywacja ma wpływ na skład chemiczny struktur komórkowych, a w konsekwencji na gęstość suchej masy (Lam et al., 2014). Spadek gęstości suchej masy zaobserwowano w przypadku wszystkich grup poddanych naświetlaniu po dodaniu PS, największą wartość uzyskałam dla kombinacji PS, co oznacza, że proces fotoinaktywacji w tej grupie zachodził z największą skutecznością.

Porównawcza analiza danych ilościowych jednoznacznie wskazała, że skuteczność terapii fotodynamicznej opartej na kombinacji Chlorin e6 i Pheophorbide a była porównywalna z sumą efektów uzyskiwanych dla każdego fotosensybilizatora stosowanego oddzielnie, co pozwala uznać uzyskany efekt za co najmniej addytywny. Bazując na zmianach gęstości suchej masy komórek bakteryjnych, która odzwierciedla zmiany zachodzące w wyniku fotoinaktywacji, wyznaczyłam efektywność terapii: w przypadku mieszanki PS wyniosła ona 29,45%, natomiast dla pojedynczych PS 13,77% (Chlorin e6) oraz 16,15% (Pheophorbide a). Warto również podkreślić, że jeden z zastosowanych PS – Pheophorbide a zaliczany jest do EPIs, co pozwala na zwiększenie penetracji komórek przez PS, która jest ograniczona w przypadku bakterii Gram-ujemnych, a tym samym osiągnięcie lepszego efektu terapeutycznego. Uzyskane rezultaty stanowią uzasadnienie hipotezy **H1**, zgodnie z którą kombinacja dwóch odpowiednio dobranych PSs przyczynia się do zwiększenia akumulacji związków wewnątrz komórek bakteryjnych i wpływa na osiągnięcie co najmniej addytywnego efektu terapii fotodynamicznej.

Innowacyjność zaproponowanego rozwiązania polega nie tylko na zastosowaniu strategii terapii kombinowanej, lecz przede wszystkim na ilościowym potwierdzeniu jej skuteczności z wykorzystaniem DHT, co znacząco wykracza poza standardowe podejścia stosowane w klasycznych badaniach nad aPDT. Warto podkreślić, że analiza tomogramów RI dostarczyła informacji niedostępnych w klasycznych technikach obrazowania fluorescencyjnego czy konfokalnego, ponieważ umożliwiła ilościowe i bezznacznikowe porównanie właściwości fizycznych komórek w czasie rzeczywistym, z zachowaniem ich żywotności. Taki poziom szczegółowości i ilościowego opisu zmian w odpowiedzi na terapię fotodynamiczną stanowi istotny krok naprzód w badaniach nad mechanizmami akumulacji PS i ich wpływu na efekt terapeutyczny, znacznie przewyższając tradycyjne metody. W odróżnieniu od większości doniesień literaturowych opartych na testach przeżywalności populacyjnej (Salam et al., 2023; van Dun et al., 2025), przeprowadzone przeze mnie badania umożliwiły analizę mechanizmów działania terapii na poziomie pojedynczych komórek, dostarczając nowych informacji na temat zależności pomiędzy akumulacją PS a efektem terapeutycznym.



Article

The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of *Escherichia Coli* by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging

Aleksandra Pietrowska ¹, Iwona Hołowacz ¹, Agnieszka Ulatowska-Jarża ¹, Mateusz Guźniczak ¹, Anna K. Matczuk ², Alina Wieliczko ³, Mirela Wolf-Baca ⁴ and Igor Buzalewicz ^{1,*}

- ¹ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Science and Technology, 27 Wybrzeże S. Wyspiańskiego St., 50-370 Wrocław, Poland; aleksandra.pietrowska@pwr.edu.pl (A.P.); iwona.holowacz@pwr.edu.pl (I.H.); agnieszka.ulatowska-jarza@pwr.edu.pl (A.U.-J.); 249986@student.pwr.edu.pl (M.G.)
- ² Department of Pathology, Division of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 31 C.K. Norwida St., 51-375 Wrocław, Poland; anna.matczuk@upwr.edu.pl
- ³ Department of Epizootiology and Veterinary Administration with Clinic of Infectious Diseases, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 45 Grunwaldzki Square, 50-366 Wrocław, Poland; alina.wieliczko@upwr.edu.pl
- ⁴ Department of Environmental Protection Engineering, Faculty of Environmental Engineering, Wrocław University of Science and Technology, 27 Wybrzeże S. Wyspiańskiego St., 50-370 Wrocław, Poland; mirela.wolf-baca@pwr.edu.pl
- * Correspondence: igor.buzalewicz@pwr.edu.pl



Citation: Pietrowska, A.; Hołowacz, I.; Ulatowska-Jarża, A.; Guźniczak, M.; Matczuk, A.K.; Wieliczko, A.; Wolf-Baca, M.; Buzalewicz, I. The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of *Escherichia Coli* by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6137. <https://doi.org/10.3390/ijms23116137>

Academic Editor: Manuel Simões

Received: 8 May 2022
Accepted: 27 May 2022
Published: 30 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The prevention of biofilm formation is crucial for the limitation of bacterial infections typically associated with postoperative infections, complications in bedridden patients, and a short-term prognosis in affected cancer patients or mechanically ventilated patients. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) emerges as a promising alternative for the prevention of infections due to the inability of bacteria to become resistant to aPDT inactivation processes. The aim of this study was to demonstrate the use of a functionalized combination of Chlorin e6 and Pheophorbide as a new approach to more effective aPDT by increasing the accumulation of photosensitizers (PSs) within *Escherichia coli* cells. The accumulation of PSs and changes in the dry mass density of single-cell bacteria before and after aPDT treatment were investigated by digital holotomography (DHT) using the refractive index as an imaging contrast for 3D label-free live bacteria cell imaging. The results confirmed that DHT can be used in complex examination of the cell–photosensitizer interaction and characterization of the efficiency of aPDT. Furthermore, the use of Pheophorbide as an efflux pump inhibitor in combination with Chlorin e6 increases photosensitizers accumulation within *E. coli* and overcomes the limited penetration of Gram-negative cells by anionic and neutral photosensitizers.

Keywords: antimicrobial photodynamic therapy; photodynamic inactivation; digital holotomography; quantitative phase imaging; Chlorin e6; Pheophorbide a; *E. coli*

1. Introduction

Biofilms are responsible for up to 80% of all causes of chronic and recurrent bacterial infections in humans [1]. The presence of biofilms has been confirmed on more than 90% of dry healthcare surfaces in intensive care units [2]. Currently, the presence of antibiotic-resistant bacteria and the infections caused by them are a huge threat to public health. This condition is mainly due to the overuse of antibiotics [3]. Microbes are capable of attaching to surfaces and forming a biofilm. Mature biofilms are up to 1000 times less susceptible to dehydration, phagocytosis, metal toxicity, acid exposure, antibiotics, and

biocides than bacteria in planktonic culture [4]. Biofilms are generally associated with wet and damp surfaces and may be difficult to remove with the current decontamination process [5]. These complex three-dimensional structures may comprise the same or different bacteria species. Microbial cells constitute 2–5% of the biofilm, other major components are water (up to 97%), polysaccharides, proteins and enzymes, DNA, and RNA. Approximately 80% of surgical site infections (SSIs) are caused by biofilm-forming bacteria. *E. coli* belongs to the group of microorganisms related to this common postoperative occurrence [6]. In particular, Gram-negative bacteria are considered more pathogenic, since Gram-positive bacteria are more susceptible to antibiotics because they do not contain an outer membrane. The main difference between these types of bacteria is that Gram-positive bacteria have a thick cell wall made of peptidoglycans, with teichoic acid found in some bacteria, while Gram-negative bacteria have a relatively thin wall without said acid. Additionally, lipopolysaccharide chains are a characteristic feature of the outer membrane of Gram-negative bacteria [7].

The mechanism of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is based on the selective accumulation by the bacterial cell of a nontoxic dye called photosensitizer (PS), its activation by light of a specific wavelength in the visible range in the presence of oxygen resulting in the formation of highly harmful and reactive oxygen species [8]. In the context of the worldwide rise of bacterial antibiotics, photodynamic therapy may be a beneficial alternative to the conventional treatment method [9]. Moreover, photodynamic therapy is considered to be a novel strategy to control biofilm-associated SSIs [6]. Over 50% of the bacteria on the NIAID list of critical pathogens have been treated with this strategy at least one time [10]. Its main advantage is the inability of bacteria to become resistant to inactivation processes [11–13]. It is commonly assumed that the bacteria inactivation from aPDT is resulting by either cytoplasmic membrane or DNA damage, depending on place of PS accumulation. In [14], three hypotheses on damage to bacterial cells were described:

- The photosensitizer is in close proximity to the bacteria but is not related in any way. In this way, damage to the structural elements of the bacteria is limited.
- The photosensitizer binds to the bacteria as a result of electrostatic, van der Waals, or hydrogen bonding interactions. Then the chance of damage to even the outer membrane increases.
- The photosensitizer penetrates the bacteria in several steps. The first is membrane binding, then active transport or diffusion into the cytoplasm. Such a location even allows DNA damage.

Recently, the main objective of aPDT is to increase the efficiency of bacteria cells by PSs, which depends not only on the structure and chemophysical properties of PSs, but also on the structure of the bacterial cell, mainly the structure of the cell wall. Not all available photosensitizers can be used for aPDT. There are many properties of photosensitizers that affect their accumulation in cells and the efficiency of aPDT, including chemical purity, stability, low price, highest absorption in the visible range, high quantum efficiency, and, most importantly, it cannot be toxic in the dark [15]. New compounds that could be used in photodynamic therapy are constantly searched for. One of the promising prospects is the use of metallodrugs as photosensitizers. Ru(II) polypyridyl complexes are characterized by a variety of electronic configurations of the metal in the excited state accessible with near-infrared and visible light. Furthermore, configurations may be tunable by ligand tailoring [16]. Ruthenium-based metal complexes and ruthenium nanoparticles have also found application in photodynamic antimicrobial studies [17,18].

However, the mechanisms of cell penetration by PS also differ significantly in the context of planktonic cells or biofilms. In the case of the biofilm structure, its penetration by PS is limited by extracellular polymeric substances [19]. In the 1990s, a difference in the effectiveness of photodynamic therapy was observed in the case of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Anionic and neutral photosensitizers bind to Gram-positive bacteria and therapies are highly effective, but in the case of Gram-negatives, they do not bring the expected results. It is related to the structure of bacteria. Gram-positive cells have

a cytoplasmic membrane with porous peptidoglycan and lipoteichoic acid, which allows noncharged molecules to bind to them. Negatively charged lipopolysaccharide molecules weaken the possibility of adsorption of neutral photosensitizers on the membrane and repel anionic photosensitizers as a result of electrostatic interactions. Therefore, they are not inactivated [20]. For these reasons, numerous studies are being carried out in order to develop new PSs that will be able to accumulate more effectively in Gram-negative bacteria cells.

The cell wall of Gram-negative bacteria is characterized by low permeability, so only selected photosensitizers have the ability to penetrate the cell wall. This is related to the electric charge of the PS and the cell membrane. Cationic porphyrin can be adsorbed on the anionic outer membrane; amphiphilic porphyrin has the ability to interact with parts of the outer and inner membranes. Ultimately, the compound has the potential to pass through both membranes and into bacteria [21]. In addition, the penetration of the photosensitizer into bacteria may be related to a specific uptake pathway (self-promotion mechanism). The cationic photosensitizer binds to lipopolysaccharides, which displaces Ca^{2+} and Mg^{2+} cations and creates gaps in the outer membrane. It is with their help that the cationic compound is incorporated into the bacteria. It was also confirmed that increasing the amount of Mg^{2+} cations reduces photosensitizer uptake [19]. Therefore, control of the mechanism of action of membrane efflux pumps required for the extrusion of substrates from the cellular interior to the surrounding medium can also affect the accumulation of PS.

The main objective of this study was to demonstrate the increase in PS accumulation within bacteria single-cells by using the functionalized combination of anionic Chlorin e6 (Ce6) and cationic Pheophorbide a (Pheo) PS instead of each individual. As will be demonstrated, Pheo exhibits a lower accumulation within the cell than Ce6, but, being the efflux pump inhibitor (EPI) [22,23] it can be used in combination with anionic Ce6 to improve Ce6 accumulation within the bacteria cell and consequently also to perform a more effective aPDT. The examination was carried out on *Escherichia coli* bacteria belonging to Gram-negative bacteria, as its cell membrane restricts cell penetration by anionic and neutral photosensitizers [24]. The accumulation of PSs was investigated by digital holotomography (DHT) using the refractive index (RI) as an imaging contrast for 3D label-free live bacteria cell imaging, since RI is related to the optical density of cells related to their mass and the cellular concentration of individual components [25]. As confirmed, the accumulation of photosensitizers within bacteria cells leads to changes in cell density and, consequently, to changes in RI values [25,26]. In a recent study, it was demonstrated that DHT is able to indicate, in a quantitative, nondestructive, and label-free manner, the difference in PS accumulation inside the bacteria cells with the use of each PS individually and in combination. Furthermore, DHT-derived RI data will be demonstrated to provide insight into differences in the dry mass density of individual cells related with the effectiveness of aPDT treatment. The results suggest that the use of functionalized photosensitizer mixtures can contribute to an increase in the efficiency of bacterial cell penetration and can create new perspectives for more efficient aPDT in the case of Gram-negative bacteria species, which was confirmed based on *E. coli* examination.

2. Results and Discussions

2.1. Photosensitizers' Spectroscopic Properties

The representative absorption spectra of the PS are presented in Figure 1. For Ce6 and Pheo, the relevant spectral bands were used for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) of cells, and the photodynamic diagnosis (PDD). PDD was used for evaluation of the efficiency of cells penetration by PS, since the intensity of the photosensitizer fluorescence is directly correlated with its concentration and can be examined by confocal fluorescence microscopy.

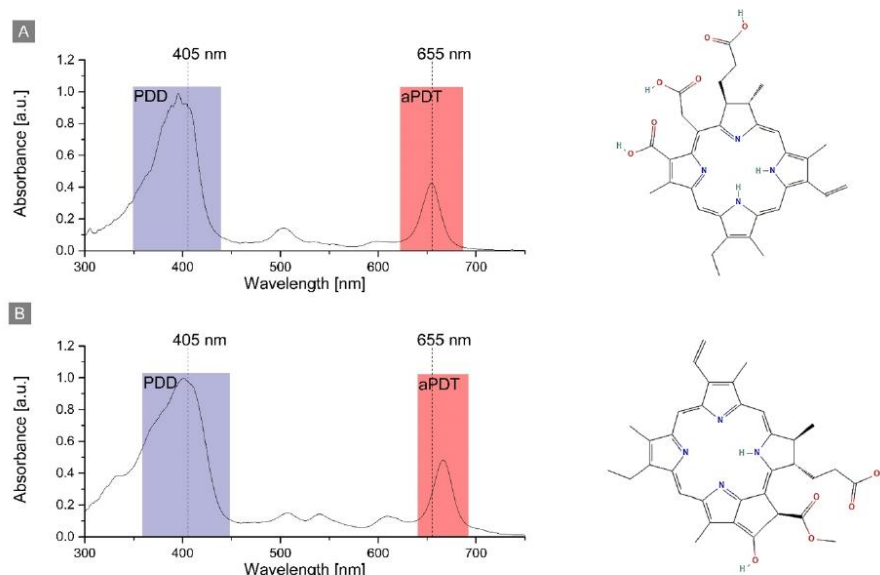


Figure 1. The structure and absorption of (A) Chlorin e6 and (B) Pheophorbide a in PBS buffer with indication of the used wavelengths for PDD and aPDT.

The absorption spectrum of Ce6 and Pheo shows a strong band at 397 nm and 402 nm, respectively. This allowed the visualization of PS accumulation inside the cell by fluorescence imaging with a 405 nm laser. The second absorption band was used for aPDT treatment and photosensitizer excitation by the laser diode ($\lambda = 655$ nm). The PS photoexcitation wavelength used for aPDT was the same in the case of all photosensitizers: Ce6, Pheo, and Ce6 + Pheo.

2.2. Study of the Photosensitizers Interaction with Bacteria by Confocal Microscopy

Examination of the photosensitizer interaction with cells was performed by scanning fluorescence confocal microscopy. *E. coli* cells incubated for 24 h with PS were examined to prove whether PSs were accumulated on the cell's wall or inside cell. The colocalization of fluorescence and bacteria cell is in this case used as an indicator of PS's accumulation inside the bacteria cell. As can be seen, PS fluorescence was observed in all samples with added PS solution, which confirms the presence of the nonaggregated form of PS. Selected slices from the Z-scan are shown in Figure 2.

The results confirm the ability of all the used PSs to penetrate the bacteria cells, but with different efficiency. Pheo belongs to the cationic PS and its transport is mediated by electrostatic interactions and self-promoted uptake pathways [27]. Anionic PSs (Ce6) can be mediated into bacterial cells through a combination of electrostatic charge interaction and protein transporters. The lowest fluorescence in the case of Pheo indicates that cell penetration by this PS was significantly lower than in the case of Ce6 or combination of PS. The highest fluorescence signal and accumulation inside the cell were observed in case of the combination of PSs. Moreover, the confocal microscopic examination did not indicate changes in the morphology of bacteria cells under 405 nm radiation in the DIC mode, which corresponds also to the lack of changes in the cell density or dry mass density due to the possible photoinactivation.

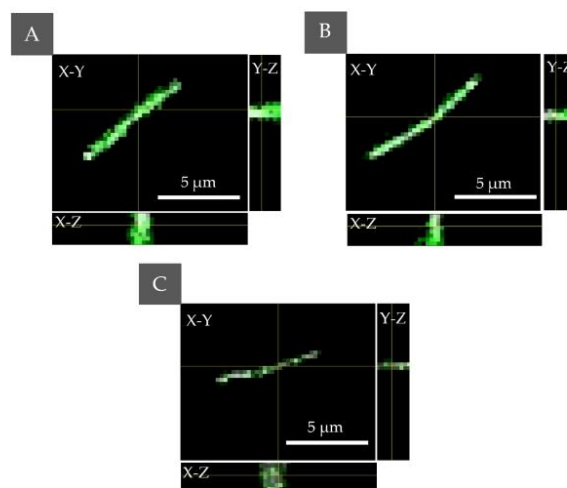


Figure 2. The PS localization performed by fluorescence confocal microscopy for *E. coli* with accumulated (A) Ce6 + Pheo, (B) Ce6, (C) Pheo—the combined fluorescence–DIC images with axial cross sections: X–Z/Y–Z (the yellow lines indicate the cross section through a cell).

2.3. Bacterial Cell Penetration by Photosensitizers

2.3.1. The Examination of the Possible PSs Accumulation Inside the Bacteria Cells by DHT

The impact of accumulation of PSs on the cell wall or penetration of the cell interior and aPDT on the averaged RI value of the cells was analyzed. Variation of local RI values is associated with the examined cell physiology but also with local fluctuations of its density, dependent on the chemical composition and external factors. In our approach, the increase in the average RI value of bacteria cells was related to the increase in cell density caused by the accumulation of PS. The accumulation of PS in the cell interior or cell membranes leads to an increase in RI value but can also be associated with physiological processes such as cell division [26]. To obtain a representative set of data for this analysis, 20 tomograms (3D-RI) of each group were examined. For all examined photosensitizers, an increase in the averaged RI values of cells was observed (see Figure 3). The averaged RI value was higher in the case of cells with PSs rather than the control sample without PS, what suggest that such significant increase in RI value has to be related with the accumulation of PS and not cell division. Furthermore, the greatest difference in the averaged RI value was observed for Ce6 + Pheo, indicating a more effective cell penetration by such a combination of PSs. This process may be caused by the use of Pheo as an efflux pump inhibitor [22,23], which contributed to a more effective accumulation of photosensitizers within bacteria cells. Differences in medians between PS– and Pheo + Ce6, Ce6, Pheo were 0.00108, 0.00088, 0.00053, respectively.

For confirmation of PS (Ce6 + Pheo, Ce6, Pheo) inside bacteria cells after 24 h of incubation, 2D-RI maps were used to colocalize the region of cells with the highest RI values. Each 2D-RI map represents the lateral RI distribution in the plane corresponding to the maximum of a single bacteria cell. The results are shown in Figure 4. As a reference, single *E. coli* cells not incubated with any photosensitizers were used (see Figure 4A). For all examined cells incubated with photosensitizers, an increase in RI values was observed in the intracellular region. Representative 2D-RI maps confirm that the highest RI values were obtained for the combination of both photosensitizers Ce6 + Pheo (see Figure 4B), which is related to the increase in density inside the cells caused by accumulation of PSs. The DHT results correlate with the results of the confocal microscopic examination.

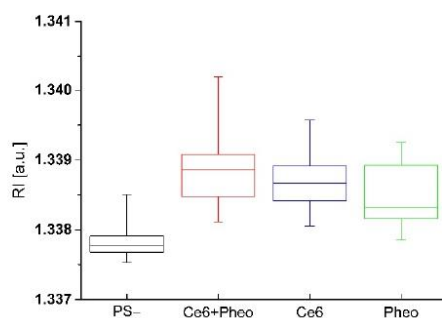


Figure 3. The change of RI values of cells with and without PS after 24 h incubation.

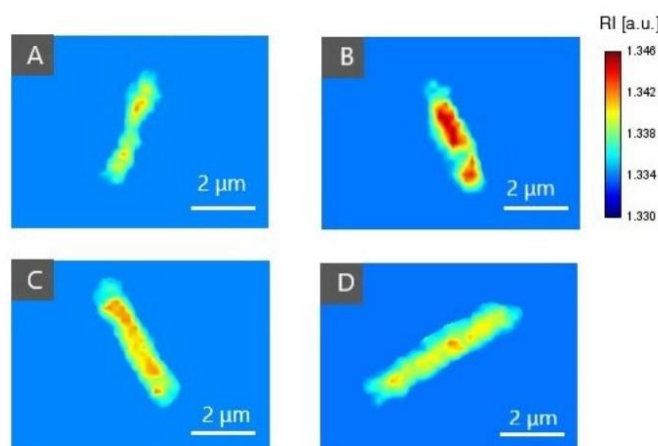


Figure 4. The representative 2D-RI maps of *E. coli* cells incubated without PS (A) and incubated with Ce6 + Pheo (B), Ce6 (C), or Pheo (D).

To determine whether the observed changes in the averaged RI value of cells caused by the interaction of PS with cells were statistically significant, a one-way ANOVA was performed. The normality assumption of the average RI values of cells was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test at the 5% significance level. The ANOVA results are shown in Table 1. The estimated p -value for the F-statistic is significantly smaller (6.827×10^{-11}) than the significance level (0.05), which means that the test rejected the null hypothesis that all means of the group were equal.

Table 1. The results of the ANOVA, where each of the 4 groups (Ce6 + Pheo, Ce6, Pheo, PS–) represent the set of average RI of *E. coli* cells after 24 h incubation.

Source of Variability	SS ¹	df ¹	MS ¹	F ¹	Prob > F
Group (between)	1.254×10^{-5}	3	4.180×10^{-6}	23.586	<<0.05
Error (within)	1.347×10^{-5}	76	1.772×10^{-7}		
Total	2.601×10^{-5}	79			

¹ SS—is a sum of squares due to each source, df—degree of freedom associated with each source, MS—mean squares for each source, F—F-statistics, Prob > F— p -value which is the probability that F-statistic can take a value larger than computed F-statistic value.

Furthermore, the variability between groups was higher than the variability within the groups. It indicates that the accumulation of the PSs significantly influenced the averaged RI value of the bacterial cells. Therefore, the analysis performed showed that the 3D-RI data provided by DHT could be used to visualize local density changes related to the accumulation of PS inside the cells.

2.3.2. The Examination of Antibacterial Efficiency of PSs by DHT

The examinations were performed before and 24 h after the irradiation of the bacterial cells. The 3D-RI values of the bacteria cells (the averaged 3D-RI values of the voxels of the cell) were determined by averaging the RI values of the pixels of the region occupied by bacteria cells for each of the 2D-RI maps (cross sections) through the cell. It should be noted that bacteria cells are an object in which the spatial distribution of the refractive index is related not only to the specific concentration of chemical components, such as proteins or sugars, but also made of the structures such as DNA material, cell walls/membranes, flagella, pili, etc. However, the determination of the minimal local changes of the RI values that indicate these structures is limited by the lateral/axial resolution of the DHT which was already indicated in [28,29].

The variation of the 3D-RI values among different kinds of analyzed samples is shown in Figure 5. The black boxes represent the distribution of the RI values before irradiation after 24 h of incubation with (see Figure 5B–D) or without photosensitizer (see Figure 5A) and the red boxes are 24 h after irradiation (hv+) or dark-control (hv−).

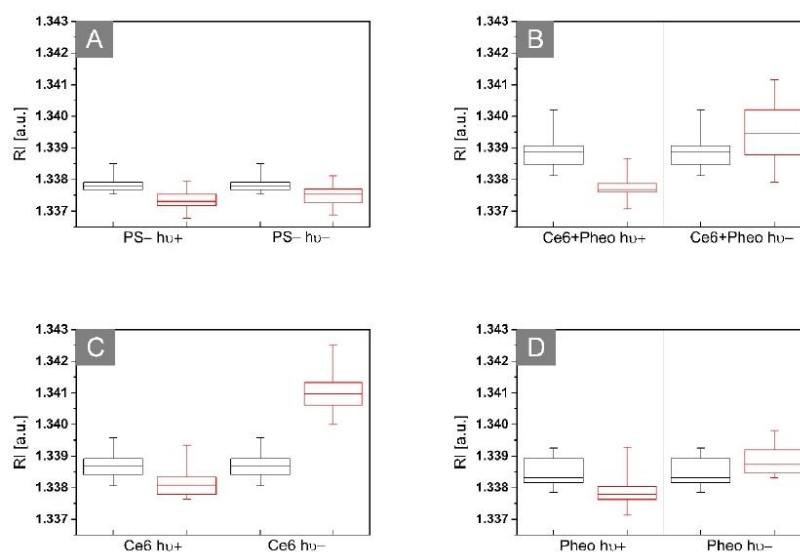


Figure 5. Representative box plots of 3D-RI values of *E. coli* cells 24 h (black boxes) and 48 h (red boxes) after incubation without PS (A) or with Ce6 + Pheo (B), Ce6 (C), and Pheo (D) (hv+: irradiated, hv−: non irradiated).

In case of non-irradiated samples without PS, it can be seen that the average RI value of bacteria cells present in this sample is slightly decreasing over time, which may be related to the beginning of the process of death of bacterial cells. Some population of bacteria cells started to die due to the lack of any nutrients in the NaCl solution, which led to the decrease of the averaged RI of these cells. For the nonirradiated samples with PS, the opposite tendency is observed. The increase in the averaged RI value may suggest further process of accumulation of PS over time, but not only, which will be discussed

further in this section. However, in the case of irradiated samples with PS (after aPDT treatment), the decrease of the averaged RI values in time can be observed. This decrease related to the decrease in cellular density can be caused by the photodynamic inactivation of bacteria. This local decrease in intracellular density caused by aPDT may be related to ultrastructural changes in bacterial cells such as reactive oxygen species (ROS)/free radical-induced destruction of bacteria cell structures (DNA, cell wall, or ribosomes), protein and enzyme denaturation, inhibition of protein synthesis, or the aggregation of cytoplasmic macromolecules [14]. Therefore, it is possible to distinguish photoinactivated cells by their RI value [24].

Moreover, the change of RI values before and after irradiation can be used to evaluate the efficiency of bacteria photoinactivation. Comparison of the averaged RI values of bacteria cells (incubated with PS) before and 24 h after irradiation is shown in Figure 6. The greatest change in the averaged RI values was observed in cells before irradiation and 24 h after irradiation for Ce6 + Pheo. The differences for Pheo + Ce6, Ce6, and Pheo were 0.00116, 0.00050, and 0.00058, respectively. Only for Ce6 + Pheo do the error bars not overlap. The lower averaged RI value corresponds to the lower intracellular density related to the more effective photoinactivation of bacteria cells by this PS combination.

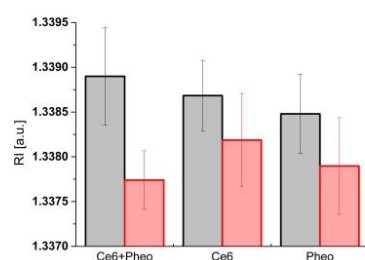


Figure 6. Column plot with error bar (standard deviation) showing the average RI values of cells before irradiation (black column) and 24 h after irradiation (red column).

Some additional observations occur after the analysis of the time-dependent differences of RI values between the samples. After 48 h of incubation with PS and without irradiation for all examined samples, an increase in the average RI of cells was observed. However, the greatest change was observed between the average RI value between 24 and 48 h of incubation for Ce6 and the smallest change was observed for Pheo (see Figure 7).

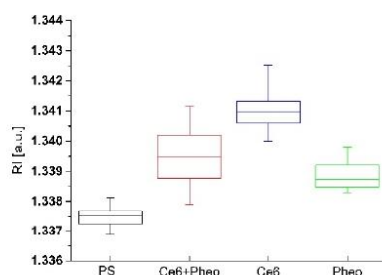


Figure 7. The changes of RI values of cells with accumulated photosensitizer and without PS after 48 h incubation in the case of non-irradiated samples.

This large change in RI in the case of Ce6 samples may be related not only to the more effective accumulation of PS within bacteria cells, as previously suggested, but also with the process of aggregation of PS in the case of the use of aqueous solvents. After 48 h of

incubation with Ce6 a significant concentration of aggregated PS was observed near the bacterial cells. It was most visible in the case of the Ce6 group (see Figure 8A), while in the case of Ce6 + Pheo, and Pheo, this process was weaker since only large aggregates were present (see Figure 8B,C). On the basis of this observation, it can be concluded that PS aggregates located in the immediate surroundings of cells may overestimate the obtained averaged RI value. This effect can be limited in the case of Ce6 + Pheo, and Pheo, when large aggregates make it easier to eliminate them from the analysis. However, in the case of Ce6, which forms smaller aggregates, the limited lateral resolution of DHT can lead to artificial increase in the average RI value of cells, but not related to the accumulation of PS.

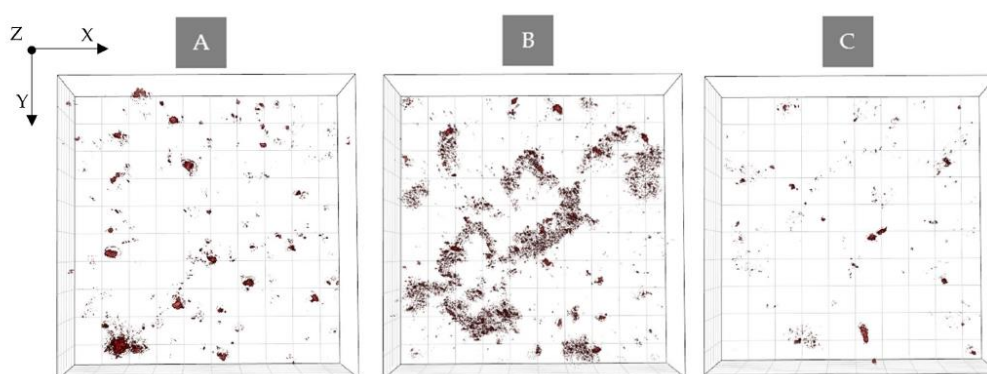


Figure 8. Digitally stained (based on the RI values) photosensitizer aggregates (A) Ce6 + Pheo, (B) Ce6, and (C) Pheo after 48 h incubation with PS.

This effect can be explained by the mutual adhesion of cells and Ce6. The greater number of PS aggregates observed in the case of Ce6 may be caused by the mechanism of action of the efflux pump mechanism, which removes toxic substances from the cell into the surrounding medium and forms aggregates in the surroundings of the cells. Tetrapyrrolic compounds usually aggregate in aqueous media due to their low water solubility. This process is co-related with aggregation-caused quenching, the intensity of fluorescence, and the effectiveness of aPDT decreases. The aggregate states are caused by π - π stacking [30]. As can be seen in Figure 9, PS fluorescence was not observed in photosensitizer aggregates (non-emissive black structures). It should be noted that PS's aggregation process can be limited by the use of different solvents.

To determine whether the observed changes of the averaged RI of cells caused by irradiation were statistically significant, a one-way ANOVA was performed. The normality assumption of the average RI values of cells was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test at 5% significance level. The ANOVA results are depicted in Table 2.

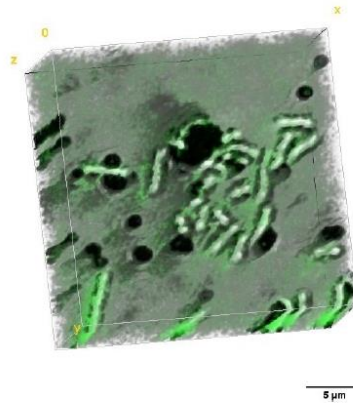


Figure 9. Ce6 aggregates localization performed by fluorescence confocal microscopy for *E. coli* cells after 48 h incubation with PS.

Table 2. The results of the ANOVA, where each from 2 groups represent the set of average RI of *E. coli* cells after irradiation/bright-control (hv+) and dark-control (hv−) samples.

PS−					
Source of variability	SS ¹	df ¹	MS ¹	F ¹	Prob > F
Group (between)	2.337×10^{-7}	1	2.337×10^{-7}	2.538	0.119
Error (within)	3.499×10^{-6}	38	9.207×10^{-8}		
Total	3.732×10^{-6}	39			
Ce6 + Pheo					
Source of variability	SS ¹	df ¹	MS ¹	F ¹	Prob > F
Group (between)	2.903×10^{-5}	1	2.903×10^{-5}	57.539	<<0.05
Error (within)	1.917×10^{-5}	38	5.045×10^{-7}		
Total	4.820×10^{-5}	39			
Ce6					
Source of variability	SS ¹	df ¹	MS ¹	F ¹	Prob > F
Group (between)	8.265×10^{-5}	1	8.265×10^{-5}	249.346	<<0.05
Error (within)	1.260×10^{-5}	38	3.315×10^{-7}		
Total	9.525×10^{-5}	39			
Pheo					
Source of variability	SS ¹	df ¹	MS ¹	F ¹	Prob > F
Group (between)	9.604×10^{-6}	1	9.604×10^{-6}	36.623	<<0.05
Error (within)	9.965×10^{-6}	38	2.622×10^{-7}		
Total	1.957×10^{-5}	39			

¹ SS—is a sum of squares due to each source, df—degree of freedom associated with each source, MS—mean squares for each source, F—F-statistics, Prob > F—*p*-value which is the probability that F-statistic can take a value larger than computed F-statistic value.

The estimated *p*-value for the F-statistic is significantly lower than the significance level (0.05) for the Ce6 + Pheo, Ce6, and Pheo groups, which means that the test rejected the null hypothesis that all the means of the group were equal. For PS group, the estimated *p*-value for the F-statistic is higher (0.119, see Table 2) than the significance level (0.05). The test cannot reject the null hypothesis that the means of two groups are equal. It indicates that irradiation has no stimulating effect on the growth of bacterial cells, because the significant change in the RI value after irradiation related to the cell division process (local increase in density) is not observed.

2.4. Analysis of the Dry Mass Density of Bacteria Cells

To determine the efficiency of the antimicrobial photodynamic therapy after photoexcitation of the cells incubated with PS, the 3D-RI distributions of *E. coli* biofilms that were reconstructed by DHT were used. The exemplary visualization of the digitally stained cells based on RI values of single cells are shown in Figure 10. The efficiency of aPDT is based on photoinactivation of cells by the laser-induced release of free radicals by accumulated PS. It is directly related to the dry mass density before and after photoexcitation. Based on the reconstructed 3D-RI tomograms by DHT and proposed algorithm for processing to obtain median RI value of cells, it was possible to determine the dry mass density of cells.

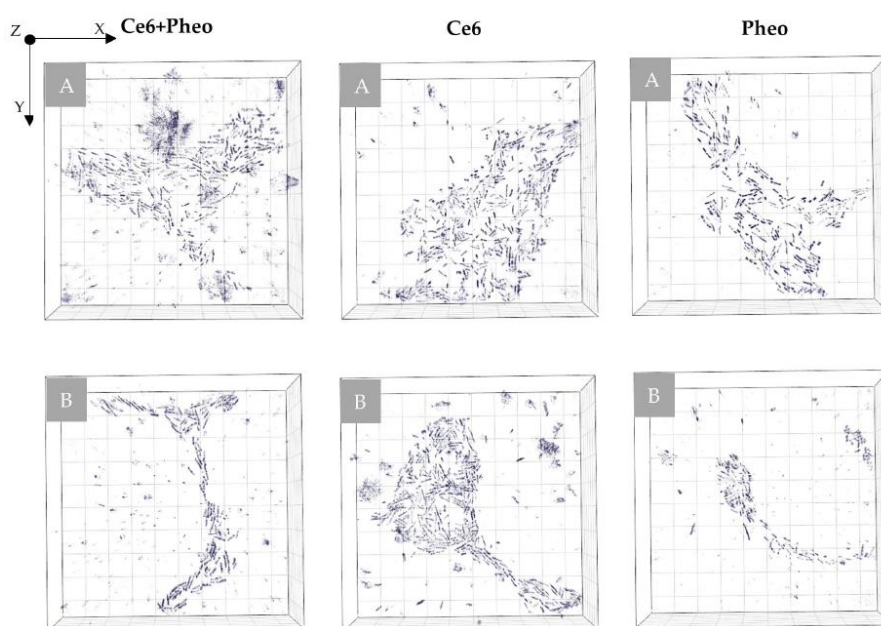


Figure 10. Representative digitally stained (based on the RI values) *E. coli* cells incubated with photosensitizers before (A) and 24 h after irradiation (B).

Photoinactivation of bacterial cells by PS leads to changes in the morphology of cellular structures. aPDT has an impact on the concentration of substances related to the chemical composition of these structures and, consequently, also the dry mass density of the cells. The cell survival rate can be confirmed by the dry mass test [31]. The results obtained from the dry mass density analysis are shown in Figure 11. The black boxes represent the density of the dry mass before irradiation (after 24 h of incubation with (see Figure 11B–D) or without photosensitizer (see Figure 11A)) and the red boxes are 24 h after irradiation ($h\nu+$) or dark-control ($h\nu-$). The average dry mass densities are shown in Table 3.

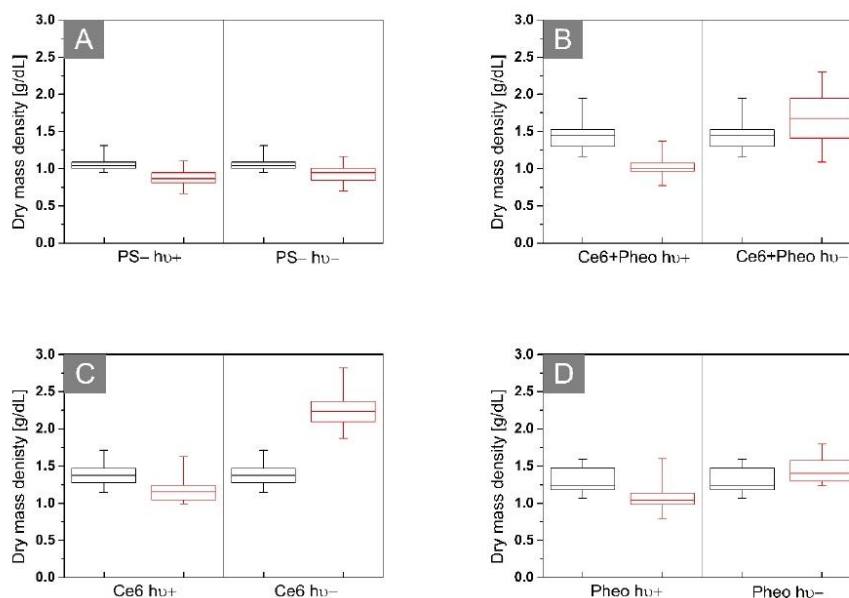


Figure 11. Representative box plots of dry mass density of biofilms of *E. coli* after incubation (A) without PS or with (B) Ce6 + Pheo, (C) Ce6, (D) Pheo, hv+: irradiated, hv−: not irradiated. The black boxes represent the distribution of RI values after 24 h, and the red boxes 48 h after the start of the experiment.

Table 3. The averaged dry mass density with standard deviation before and after irradiation for all analyzed photosensitizers.

Photosensitizers	Ce6 + Pheo		Ce6		Pheo	
	Before irradiation	After irradiation	Before irradiation	After irradiation	Before irradiation	After irradiation
Mean dry mass density (g/dL)	1.46 ± 0.20	1.03 ± 0.12	1.38 ± 0.15	1.19 ± 0.20	1.30 ± 0.17	1.09 ± 0.20

Antimicrobial photodynamic therapy is accompanied by a change in the dry mass density of the cell [31], which is related to cell membrane damage and loss of cell integrity or to the DNA damage caused by the free radical. The decrease in dry mass density could be observed only in the case of the Ce6 hv+, Ce6 + Pheo hv+, and Pheo hv+ groups after laser light irradiation. Dark-control (hv−) groups are characterized by an increase in dry mass density between 24 h (black box) and 48 h (red box) of the experiment. It is related to processes such as cell division and further accumulation of PS within the bacteria. This demonstrates the lack of toxicity without irradiation. In the case of the PS group, it can be shown, as in the case of changes in bacterial RI, that irradiation has no stimulating effect on bacterial cells, which is manifested by the lack of significant differences in dry mass density between irradiated and non-irradiated cells (see Figure 11A).

Based on the averaged dry mass density before and 24 h after irradiation, it was possible to evaluate the aPDT efficiency that was expressed as the difference between the dry mass density before irradiation and after irradiation, which is normalized, respectively, to the dry mass density before irradiation. For all analyzed samples with obtained aPDT, efficiency was equal to 29.45% for Ce6 + Pheo, 13.77% for Ce6, and 16.15% for Pheo. It

can be seen that the aPDT efficiency was highest for the combination of PSs, and lowest for Pheo.

3. Materials and Methods

3.1. Bacterial Sample Preparation

In all experiments, the bacterial culture of *E. coli* (ATCC 25922) was used. *E. coli* was inoculated in tryptic soy agar (TSA) medium at 37 °C. The overnight culture stock was dissolved in NaCl (0.9% solution, Poch Basic, Gliwice, Poland), and the MacFarland scale (McF) was measured with a densitometer (DEN-1B, Biosan, Jozefow k Otwocka, Poland). A total of 0.5 McF was taken, which is approximately 1.5×10^8 bacterial cells per mL. The bacteria culture was suspended in NaCl. For cell culture, the dish μ -Dish 35 low (IBIDI GmbH, Gräfelting, Germany), was used. The refractive index of NaCl (0.9%) in which bacteria were suspended was equal to 1.335 and was measured with the Abbe refractometer (NAR-2T, minimum scale: 0.001, ATAGO Co. Ltd., Tokyo, Japan) at 20 °C.

Chlorin e6 (Ce6) [32], Pheophorbide a (Pheo) [33] (manufacturer Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), and their combination were used as photosensitizers (PSs). Stock solutions of 0.84×10^{-3} M photosensitizer were prepared by dissolving the photosensitizer in NaCl. In this study, eight groups were examined: Ce6 hv+ (photoexcited), Ce6 hv− (dark-control), Ce6 + Pheo hv+ (photoexcited), Ce6 + Pheo hv− (dark-control), Pheo hv+ (photoexcited), Pheo hv− (dark-control), PS− hv+ (bright-control), and PS− hv− (dark-control). For each group, 24 samples were examined. The experiment was divided into three parts. On the first day, photosensitizing solutions were added to the parts of the samples. For samples with one photosensitizer, 100 μ L of PS solution was added; when using a mixture of photosensitizers, 100 μ L of each (Ce6 and Pheo) were added. In the next step, all samples were incubated for 24 h at 37 °C. Before imaging by digital holotomography and confocal microscopy, each sample was rinsed twice with 0.9% NaCl solution to remove PS from the medium. It was assessed whether the photosensitizer interacted with the cells. After assessment, part of the samples had been exposed to laser light (655 nm—wavelength used for aPDT). Subsequently, all samples were placed in a refrigerator for 24 h at 4 °C. The samples were rinsed again, and then the samples were imaged.

3.2. Spectrophotometric Measurements

All absorption spectra were recorded in the wavelength range 200–1100 nm by means of the AVA-Spec 3648 spectrophotometer (Avantes Inc., Apeldoorn, The Netherlands) equipped with a deuterium–halogen lamp (Avalight-DH-S-BAL, Avantes Inc., Apeldoorn, The Netherlands) as a light source. As the excitation source in the luminescence measurement, the continuous wave semiconductor laser $\lambda = 405$ nm (TOPGaN, Warsaw, Poland) was used. For spectroscopic studies, the PSs solutions in PBS were measured in standard UV cuvettes.

3.3. Irradiation Source for Bacteria Photoinactivation

The photoexcitation setup included a laser diode ($\lambda = 655$ nm) with an adjustable power control unit coupled to the optical fiber system (FC-655nm-1W-15070826, New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., Changchun, China). Exposure parameters have been determined experimentally. The most important element was that the sample ($r = 7$ mm) was exposed throughout the surface. The distance from the light source from the sample was set at 55 mm. The duration of exposure was set at 240 s; this is the longest possible time without heating the sample. The power density emitted by the laser was equal to 420 mW/cm² and the energy density was equal to 12.5 J/cm².

The energy density H and the power density E were set experimentally. The power density was measured by integrating a sphere photodiode power sensor (S142C, 350–1000 nm, 1 μ W–5 W, Thorlabs, Newton, NJ, USA) and a compact power and energy meters console (PM100D, Thorlabs, Newton, NJ, USA). All exposures were continuously monitored by

temperature measurement with a thermal imaging camera (FLIR E6, FLIR Systems, Inc., Wilsonville, OR, USA).

3.4. Confocal Laser Microscopy

Fluorescent or confocal microscopes are commonly used in studies of course, uptake of photosensitive compounds, and the effectiveness of photodynamic therapy; in addition, the morphology of bacterial cells is evaluated [19,34,35]. In comparison to digital holotomography (DHT), these microscopes are much more expensive because it is necessary to use fluorescence markers/probes and it is much more time-consuming since the process of scanning the sample takes longer.

The images of bacterial cells were collected on a Leica TCS SPE confocal laser microscope (Leica, Wetzlar, Germany) using a $63\times$ high-numerical-aperture oil-immersion objective. This microscope was working in the fluorescence and differential interference contrast (DIC) modes. Furthermore, X-Z and Y-Z cross sections were recovered to obtain 3D information indicating PS uptake. The image size was set to 512×512 pixels. For excitation of the PS laser line at 405 nm, it was operated at 10% of the maximum power.

In the first stage of the study, the bacterial samples were examined by confocal microscopy to confirm the lack of the autofluorescence of bacterial biofilm. After photoexcitation of the PS by laser light with the wavelength equal to 405 nm (corresponding to the PDD absorption bands of both photosensitizers), confocal microscopic images indicating the cell penetration by PS were registered.

3.5. Digital Holographic Tomography and RI Data Processing

In this study, a DHT was used for examination of the accumulation of photosensitizers inside the bacteria cells and changes in cell density related to the aPDT treatment, since, contrary to the fluorescence confocal microscopy, it allows for a quick and non-invasive process of scanning a sample, and the obtained results in the form of a spatial distribution of the refractive index may give equally interesting results.

A digital holotomograph (3D Cell Explorer, Nanolive, Ecublens, Switzerland) using a dry microscope objective ($60\times$, numerical aperture NA = 0.8, Nikon) was used to visualize the spatial distribution of the refractive index (RI) in the form of 3D-RI tomograms. During the scanning of the sample, multiple two-dimensional RI measurements are made, which, when numerically reconstructed, give a 3D distribution of the RI examined sample.

Numerically reconstructed 3D-RI tomograms were imported from STEVE software (version 1.6.3496, Nanolive, Ecublens, Switzerland) to MATLAB[®] software (version R2021b, MathWorks, Natick, MA, USA). To obtain the RI values of the bacteria cells, a single 2D-RI tomogram was selected, representing the single slice of 3D-RI tomogram for which the best contrast of the examined cells was obtained. The applied algorithm performed median filtering to reduce artifacts that were present in the selected 2D-RI tomograms. In the next step, a contour mask was created that was based on the specified polygonal region of interest. This region was matched by appropriately specifying a threshold for the RI values, which exceeded the RI of the medium. The contour mask was fitted on the original data (a series of 2D-RI tomograms), enabling automatic distinguishing of the regions that were occupied by the cells and to directly determine the RI values of each cell that is present in the sample. As a result, the RI values of the pixels of the regions that were occupied by cells were obtained. A median RI value was determined for each tomogram. To obtain a representative set of data for this analysis, 20 tomograms (3D-RI) of each group were examined. Then, the data were analyzed.

RI is one of the physical parameters that can be correlated with biophysical parameters such as dry mass density. Significant changes in protein composition and other cell components can be detected by changes in the RI values. This could be related to abnormality and dysfunction, showing intrinsic dynamics in cells [36].

The dry mass density of the cell (M_{dry}) can be expressed as [37,38]:

$$M_{dry} = \left(\frac{RI}{RI_{NaCl}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{k} \quad (1)$$

where RI is the median of the refractive index of the cells, RI_{NaCl} is RI of the environment (1.335), and k is the absorption constant; for material that has no specific light absorbance characteristic, $k = 0.002$.

3.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Origin 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). The significance of RI value was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA). A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

4. Conclusions

A combined therapy becomes the most common strategy in modern treatment. Its greatest advantages are using different pathways, achieving higher efficacy and minimizing side effects. Furthermore, the possibility of developing resistance is reduced. This strategy allows to obtain the additive or synergistic effect of treatment using smaller doses of each substance. The use of two photosensitizers in a single treatment is considered to be a basic aPDT combination. Other strategies are based on combinations of aPDT with antibiotics, other antimicrobial compounds, or physical treatments (sonodynamic therapy and electrochemotherapy) [10].

The results obtained in this in vitro study show that the use of the functionalized combination of two photosensitizers, Ce6 and Pheo, in which Pheo acts as an efflux pump inhibitor, enables the penetration of increase of the *E. coli* (Gram-negative bacteria) cells by PSs, which is significantly higher than in case of the use of each of PS individually. The increase in PS accumulation was indicated by the increase of the RI values of individual cells related to the increase in cell density in the presence of PSs, which was confirmed by the additional confocal fluorescence microscopy. Moreover, the decrease of the RI values of bacteria cells after aPDT treatment can indicate the efficiency of *E. coli* inactivation related to the decrease of the cell density and dry mass density obtained from RI data, which may be correlated with the loss of the integrity of cells membrane, increase in membrane permeability, or DNA damage characteristic for aPDT. The results suggest that when a functionalized combination of PSs was used, the efficacy of the photodynamic effect was significantly higher than when each of the sensitizers was used alone. Furthermore, the use of the developed functional combination of PSs can contribute to a more efficient photoinactivation of Gram-negative bacteria cells, which have a lower permeability to single anionic and neutral photosensitizers compared to those of Gram-positive bacteria cells. However, the results indicate the PS aggregation in the used NaCl suspension, so future works should focus on the elimination of this effect by the use of a different solvent that can enhance the photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria.

Digital holotomography (DHT), using the refractive index as an imaging contrast for 3D label-free live bacteria cell imaging and providing quantitative information about biophysical properties of the specimen, can be used in complex examination of the single-cell-photosensitizer interaction and characterization of the efficiency of aPDT as a low-cost, label-free, nondestructive alternative to commonly used techniques such as confocal microscopy.

Author Contributions: Conceptualization, I.B. and A.U.-J.; methodology, I.B. and A.U.-J.; software, M.G. and A.P.; data validation, A.U.-J. and I.B.; optical investigation, A.P. and I.H.; microbiological investigation, A.K.M., A.W., and M.W.-B.; resources, I.B., A.W., and M.W.-B.; data curation, A.P., I.H., A.U.-J., and I.B.; writing—original draft preparation, A.P., A.U.-J., and I.B.; writing—review and editing, A.P., A.U.-J., A.K.M., A.W., M.W.-B. and I.B.; visualization, A.P., I.H., and M.G.; supervision,

I.B.; project administration, I.B.; funding acquisition, I.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in whole by National Center of Science, Poland, grant number 2021/41/B/ST7/04002.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data can be obtained from authors on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Parvin, F.; Hu, H.; Whiteley, G.S.; Glasbey, T.; Vickery, K. Difficulty in Removing Biofilm from Dry Surfaces. *J. Hosp. Infect.* **2019**, *103*, 465–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fotinos, N.; Convert, M.; Piffaretti, J.C.; Gurny, R.; Lange, N. Effects on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5-Aminolevulinic Acid and 5-Aminolevulinic Acid Derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1366–1373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Otter, J.A.; Vickery, K.; Walker, J.T.; de Lancey Pulcini, E.; Stoodley, P.; Goldenberg, S.D.; Salkeld, J.A.G.; Chewins, J.; Yezli, S.; Edgeworth, J.D. Surface-Attached Cells, Biofilms and Biocide Susceptibility: Implications for Hospital Cleaning and Disinfection. *J. Hosp. Infect.* **2015**, *89*, 16–27. [[CrossRef](#)]
- Pajkos, A.; Vickery, K.; Cossart, Y. Is Biofilm Accumulation on Endoscope Tubing a Contributor to the Failure of Cleaning and Decontamination? *J. Hosp. Infect.* **2004**, *58*, 224–229. [[CrossRef](#)]
- Hrynshyn, A.; Simões, M.; Borges, A. Biofilms in Surgical Site Infections: Recent Advances and Novel Prevention and Eradication Strategies. *Antibiotics* **2022**, *11*, 69. [[CrossRef](#)]
- Panawala, L. Difference between Gram Positive and Gram Negative Bacteria Stunning Images of Cells Discover How Scientists Use Main Difference—Gram Positive vs Gram Negative Bacteria. *Pediatrics* **2017**, *13*, 1–3.
- Allison, R.R.; Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.* **2013**, *46*, 24–29. [[CrossRef](#)]
- Nordmann, P.; Poirel, L.; Mark, A.T.; Timothy, R.W. Does Broad-Spectrum β -Lactam Resistance Due to NDM-1 Herald the End of the Antibiotic Era for Treatment of Infections Caused by Gram-Negative Bacteria? *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 689–692. [[CrossRef](#)]
- Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Pharmaceuticals Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1995. [[CrossRef](#)]
- Wainwright, M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 13–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zolfaghari, P.S.; Packer, S.; Singer, M.; Nair, S.P.; Bennett, J.; Street, C.; Wilson, M. In Vivo Killing of Staphylococcus Aureus Using a Light-Activated Antimicrobial Agent. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zeina, B.; Greenman, J.; Purcell, W.M.; Das, B. Killing of Cutaneous Microbial Species by Photodynamic Therapy. *Br. J. Dermatol.* **2001**, *144*, 274–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alves, E.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Cunha, A.; Tome, J.; Almeida, A. An Insight on Bacterial Cellular Targets of Photodynamic Inactivation. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 141–164. [[CrossRef](#)]
- Nakonechny, F.; Nisnevitch, M. Aspects of Photodynamic Inactivation of Bacteria. In *Microorganisms*; IntechOpen: London, UK, 2020; ISBN 978-1-83880-188-5. [[CrossRef](#)]
- Peñ, Q.; Wang, A.; Zaremba, O.; Shi, Y.; Scheeren, H.W.; Metselaar, J.M.; Kiessling, F.; Pallares, R.M.; Wuttke, S.; Lammers, T. Metallodrugs in Cancer Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 2544. [[CrossRef](#)]
- Jain, A.; Garrett, N.T.; Malone, Z.P. Special Issue Invited Review Ruthenium-Based Photoactive Metalloantibiotics. *Photochem. Photobiol.* **2022**, *98*, 6–16. [[CrossRef](#)]
- Jain, A.; Winkel, B.S.J.; Brewer, K.J. Photodynamic Antimicrobial Studies on a Ruthenium-Based Metal Complex. *Inorg. Chim. Acta* **2022**, *538*, 120996. [[CrossRef](#)]
- Hurst, A.N.; Scarbrough, B.; Saleh, R.; Hovey, J.; Ari, F.; Goyal, S.; Chi, R.J.; Troutman, J.M.; Vivero-Escoto, J.L. Influence of Cationic Meso-Substituted Porphyrins on the Antimicrobial Photodynamic Efficacy and Cell Membrane Interaction in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 134. [[CrossRef](#)]
- Huang, L.; Dai, T.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *635*, 155–173. [[CrossRef](#)]
- Matsumoto, J.; Matsumoto, T.; Yasuda, K.; Yasuda, M. Photodynamic Inactivation of *Escherichia Coli* with Cationic Porphyrin Sensitizers. In *The Universe of Escherichia coli*; IntechOpen: London, UK, 2018; ISBN 978-1-83881-153-2. [[CrossRef](#)]

22. Sharma, A.; Gupta, V.K.; Pathania, R. Efflux Pump Inhibitors for Bacterial Pathogens: From Bench to Bedside. *Indian J. Med. Res.* **2019**, *149*, 129–145. [CrossRef]
23. Zechini, B.; Versace, I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.* **2009**, *4*, 37–50. [CrossRef] [PubMed]
24. Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. Photodynamic Inactivation of Gram-Negative Bacteria: Problems and Possible Solutions. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1992**, *14*, 262–266. [CrossRef]
25. Popescu, G.; Park, Y.K.; Lue, N.; Best-Popescu, C.; Deflores, L.; Dasari, R.R.; Feld, M.S.; Badizadegan, K. Optical Imaging of Cell Mass and Growth Dynamics. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2008**, *295*, 538–544. [CrossRef]
26. Buzalewicz, L.; Ulatowska-Jarża, A.; Kaczorowska, A.; Gąsior-Głogowska, M.; Podbielska, H.; Karwańska, M.; Wieliczko, A.; Matczuk, A.K.; Kowal, K.; Kopaczyńska, M. Bacteria Single-Cell and Photosensitizer Interaction Revealed by Quantitative Phase Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5068. [CrossRef]
27. George, S.; Hamblin, M.R.; Kishen, A. Uptake Pathways of Anionic and Cationic Photosensitizers into Bacteria. *Photochem. Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2009**, *8*, 788. [CrossRef] [PubMed]
28. Kim, T.K.; Lee, B.W.; Fujii, F.; Lee, K.H.; Lee, S.; Park, Y.K.; Kim, J.K.; Lee, S.W.; Pack, C.G. Mitotic Chromosomes in Live Cells Characterized Using High-Speed and Label-Free Optical Diffraction Tomography. *Cells* **2019**, *8*, 1368. [CrossRef]
29. Kim, T.K.; Lee, B.W.; Fujii, F.; Kim, J.K.; Pack, C.G. Physicochemical Properties of Nucleoli in Live Cells Analyzed by Label-Free Optical Diffraction Tomography. *Cells* **2019**, *8*, 699. [CrossRef] [PubMed]
30. Ni, J.; Wang, Y.; Zhang, H.; Sun, J.Z.; Tang, B.Z. Aggregation-Induced Generation of Reactive Oxygen Species: Mechanism and Photosensitizer Construction. *Molecules* **2021**, *26*, 268. [CrossRef]
31. Lam, M.; Dimaano, M.L.; Oyetakin-White, P.; Retuerto, M.A.; Chandra, J.; Mukherjee, P.K.; Ghannoum, M.A.; Cooper, K.D.; Baron, E.D. Silicon Phthalocyanine 4 Phototoxicity in Trichophyton Rubrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3029. [CrossRef]
32. Chlorin E6 | CAS 19660-77-6 | SCBT—Santa Cruz Biotechnology. Available online: <https://www.scbt.com/p/chlorin-e6-19660-77-6> (accessed on 16 August 2021).
33. Pheophorbide a | CAS 15664-29-6 | SCBT—Santa Cruz Biotechnology. Available online: <https://www.scbt.com/p/pheophorbide-a-15664-29-6> (accessed on 16 August 2021).
34. Hanakova, A.; Bogdanova, K.; Tomankova, K.; Pizova, K.; Malohlava, J.; Binder, S.; Bajgar, R.; Langova, K.; Kolar, M.; Mosinger, J.; et al. The Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy on *S. Aureus* and *E. Coli* Using Porphyrin Photosensitizers Bound to Cyclodextrin. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 163–170. [CrossRef]
35. Huang, L.; Xuan, Y.; Koide, Y.; Zhiyentayev, T.; Tanaka, M.; Hamblin, M.R. Type I and Type II Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy: An in Vitro Study on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Lasers Surg. Med.* **2012**, *44*, 490–499. [CrossRef] [PubMed]
36. Oh, J.; Ryu, J.S.; Lee, M.; Jung, J.; Han, S.; Chung, H.J.; Park, Y. Three-Dimensional Label-Free Observation of Individual Bacteria upon Antibiotic Treatment Using Optical Diffraction Tomography. *Biomed. Opt. Express* **2020**, *11*, 1257–1267. [CrossRef] [PubMed]
37. Nanolive. Quantitative Analysis of 3D Refractive Index Maps. In *Application Note by Nanolive SA*; Nanolive SA: Geneva, Switzerland, 2018.
38. Friebel, M.; Meinke, M. Model Function to Calculate the Refractive Index of Native Hemoglobin in the Wavelength Range of 250–1100 Nm Dependent on Concentration. *Appl. Opt.* **2006**, *45*, 2838–2842. [CrossRef] [PubMed]

3.2. Publikacja 2 – *Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology*

Badania przedstawione w tej publikacji ukierunkowałam na weryfikację hipotezy **H2**, zgodnie z którą zastosowanie celowanych EPIs ogranicza formowanie się struktur przestrzennych tworzonych przez bakterie.

W części eksperymentalnej niniejszej rozprawy przeprowadziłam kompleksowe badania nad wpływem wybranych naturalnych EPIs na dynamikę rozwoju oraz formowanie się skupisk bakteryjnych wybranych gatunków bakterii: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* oraz *Bacillus cereus*. Podjęcie tego zagadnienia jest uzasadnione doniesieniami literaturowymi, wskazującymi że pompy efflux odgrywają kluczową rolę nie tylko w mechanizmach oporności wielolekowej, lecz także w procesach wymiany substancji przez błonę komórkową oraz w tworzeniu się struktur komórkowych, takich jak biofilm czy inne formy skupisk bakteryjnych (Alav et al., 2018; Nishino et al., 2021). Ograniczenie efektywności tych pomp za pomocą substancji modyfikujących ich ekstruzję stanowi obiecującą strategię zaburzenia fizjologii bakterii, potencjalnie przekładającą się na ograniczenie kolonizacji powierzchni przez bakterie, co ogranicza rozwój biofilmów, co może być istotne w zakresie np. szpitalnych zakażeń bakteryjnych.

Jak wspomniano, pomiary prowadziłam na 4 gatunkach: bakterie Gram-dodatnie (*Enterococcus faecalis* i *Bacillus cereus*) i bakterie Gram-ujemne (*Proteus mirabilis* i *Escherichia coli*). Uzyskane finansowanie w ramach Minigrantu dla doktorantów Politechniki Wrocławskiej (wewnętrzna inicjatywa Uczelni, pozwalająca na pozyskanie finansowania na realizację własnego projektu badawczego) pozwoliło mi na realizację pierwszej części pomiarów, tj. zbadania wpływu EPIs na kinetykę wzrostu bakterii w pożywce płynnej. Ze względu na niską rozpuszczalność EPIs (zwłaszcza w stężeniach przekraczających 1 mg/ml), zbadalam żywotność bakterii w pożywce z różną domieszką DMSO (z ang. *DiMethyl Sulfoxide*, dimetylosulfotlenek). Powyższe eksperymenty pozwoliły stwierdzić, że 5% stężenie DMSO nie ma wpływu na żywotność bakterii, a pozwala zwiększyć rozpuszczalność zastosowanych związków. Potwierdzają to również doniesienia literaturowe (Alharthi et al., 2021). Na wysokie stężenie DMSO w pożywce bardziej wrażliwe są bakterie Gram-dodatnie, np. w przypadku *B. cereus* 20% DMSO w TSB (z ang. *Tryptic Soy Broth*, bulion tryptono-sojowy) widocznie zahamowuje wzrost po całonocnej inkubacji. W ramach tego zadania badawczego wyznaczyłam MIC substancji pochodzenia naturalnego zaliczanych do EPIs (berberylna, palmatyna, piperyna, kapsaicyna, kumaryna i kurkumina). Wybór EPI uwarunkowany był różnorodnością mechanizmów blokowania pomp efflux oraz

powinowactwa do inhibicji pomp należących do różnych rodzin. Przeprowadzone badania literaturowe potwierdziły, że berberyna, kurkumina i palmatyna mogą działać również jako inhibitory Sortazy A (SrtAI, z ang. *Sortase A inhibitor*) (Alharthi et al., 2021, 2023; Guo et al., 2015; Nitulescu et al., 2017). Sortaza A to transpeptydaza cysteinowa, której zadaniem jest przyłączanie białek odpowiedzialnych za adhezję i tworzenie biofilmu do ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Zbadalam stężenia EPI (5% v/v DMSO w TSB) od 4096 $\mu\text{g/ml}$ do 8 $\mu\text{g/ml}$ (2-krotnie malejące). Po calonocnej inkubacji wykonałam zmodyfikowany test resazuryny (Sarker et al., 2007). Wszystkie badania związane z żywotnością wykonane zostały w co najmniej 3 powtórzeniach. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdziłam, że żadne z badanych stężeń EPI nie spowodowało widocznego zahamowania wzrostu dla *P. mirabilis* (gatunek został odrzucony w dalszej części badań, gdyż nie było możliwe wyznaczenie wymaganych stężeń EPI), w przypadku *B. cereus* brak zmiany zabarwienia został zaobserwowany dla kurkuminy (128 $\mu\text{g/ml}$), palmatyny (2048 $\mu\text{g/ml}$) i berberyny (1024 $\mu\text{g/ml}$), dla *E. coli* zahamowanie wzrostu spowodowała inkubacja z roztworem palmatyny (4096 $\mu\text{g/ml}$), natomiast w przypadku *E. faecalis* możliwe było wyznaczenie MIC dla palmatyny (4096 $\mu\text{g/ml}$) i berberyny (2048 $\mu\text{g/ml}$). Zaobserwowane stężenia EPI były niższe dla bakterii Gram-dodatnich niż dla bakterii Gram-ujemnych, co wynika z faktu, iż bakterie Gram-dodatnie posiadają zewnętrzną warstwę peptydoglikanu, która zapewnia jedynie ograniczoną odporność na przepuszczalność (Bamoniri et al., 2010; Rajagopal & Walker, 2017). Wartości MIC pozwoliły na określenie stężeń EPI, które zostały wykorzystane w dalszych badaniach. Zdecydowałam się na stężenie 4-krotnie mniejsze niż MIC, które nie powodowało pełnej inhibicji wzrostu. To właśnie takie stężenie jest wybierane w testach potencjalizacji (Stavri et al., 2007).

Kolejnym etapem była obserwacja dynamiki namnażania się bakterii w pożywce płynnej (TSB) z wykorzystaniem bioreaktora z odwróconym wirowaniem. Bazuje on na spektrofotometrycznych pomiarach gęstości optycznej (OD, z ang. *Optical Density*) zawiesiny w czasie, co pozwoliło na uzyskanie krzywych wzrostu i identyfikację potencjalnych zmian w poszczególnych fazach. Jako przygotowanie do rejestracji kinetyki wzrostu wykonałam kalibrację urządzenia dla 3 wybranych gatunków, tj. bakterie Gram-dodatnie: *B. cereus* oraz *E. faecalis*; bakterie Gram-ujemne: *E. coli*. Zarejestrowałam kontrolne krzywe wzrostu wymienionych gatunków (co najmniej 12 godz. pomiary w 3 powtórzeniach). Kolejno określiłam zależność wartości OD zawiesiny bakteryjnej od stężenia EPI (4-krotnie mniejszego niż MIC). Szczegółowej analizie poddane zostały logarytmiczne fazy wzrostu. Poza analizą czasu trwania logarytmicznej fazy wzrostu porównałam również: maksymalne tempo wzrostu, czas podwojenia oraz maksymalne OD. W przypadku *B. cereus* zaobserwować można, że im niższe tempo wzrostu, tym krótszy czas trwania logarytmicznej fazy wzrostu. Spowodowane jest to zaburzeniem proporcji pomiędzy fazami

wzrostu – skróceniu ulega faza logarytmiczna, wydłużeniu natomiast faza hamowania. Wynika to ze stosowania substancji wykazującej właściwości przeciwbakteryjne w stężeniu niższym niż MIC, co wpływa bezpośrednio na zmiany długości poszczególnych faz (Pedreira et al., 2022). Można zatem zaobserwować, że jedynie przez krótki czas następuje intensywny wzrost hodowli. Dla *E. faecalis* tendencja była odwrotna, tj. im niższe tempo wzrostu tym dłuższy czas trwania fazy logarytmicznej, podobna tendencja jest obserwowana również dla *E. coli*, co świadczy o tym, że rozwój został spowolniony. Największy spadek średniej wartości maksymalnego tempa wzrostu zaobserwowałam w przypadku komórek *E. faecalis* inkubowanych z berberyną i wyniósł on 53,8%. Czas podwojenia był odwrotnie proporcjonalny do maksymalnego tempa wzrostu. W przypadku zmian w maksymalnej wartości OD dla *B. cereus* oraz *E. faecalis* można stwierdzić, że im większe zmiany w tempie wzrostu, tym większe zmiany w maksymalnym OD. W przypadku obu gatunków obserwowany jest spadek tej wartości. Dla *E. coli* po inkubacji z palmatyną nastąpił wzrost maksymalnego OD, co może świadczyć o zmianach w morfologii komórki tj. zmniejszeniu rozmiarów komórek, by ograniczyć zapotrzebowanie na składniki odżywcze w ramach odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe (Serbanescu et al., 2021).

Po 24 godz. inkubacji bakterii z EPI przeprowadzono obserwację rozwoju mikrokolonii (w 3 powtórzeniach), by określić jak inkubacja z EPI wpływa na zdolność oraz dynamikę rozwoju struktur bakteryjnych bezpośrednio na powierzchni, na której się one formują. Aby ilościowo i jakościowo ocenić wpływ EPIs na formowanie się skupisk bakteryjnych, zastosowałam DHT – zaawansowaną technikę obrazowania fazowego, umożliwiającą trójwymiarową rekonstrukcję RI żywych komórek i ich skupiskach bez konieczności stosowania barwienia biochemicznego lub znakowania fluorescencyjnego. Przygotowanie próbek mikrobiologicznych uwzględniało inkubację zawiesiny bakteryjnej z roztworem EPI przez 24 godz. w temperaturze 37°C, a następnie naniesienie tak przygotowanej zawiesiny na warstwę agaru tryptozowo-sojowego, umieszczonego w ramce na szkiełku podstawowym. Należy podkreślić, że na potrzeby obserwacji wzrostu skupisk bakteryjnych opracowano procedurę przygotowania próbki, umożliwiającą monitorowanie zachodzących zmian na cienkiej warstwie podłoża agarowego, której opis znajduje się w publikacji (Pietrowska et al., 2025). Obserwacja formowania i rozwoju struktur bakteryjnych została przeprowadzona z wykorzystaniem cyfrowego holotomografu i inkubatora pozwalającego na utrzymanie stałej temperatury próbki w komorze pomiarowej, co miało określić wpływ EPI na rozwój skupisk bakteryjnych, adhezję komórek do podłoża i innych bakterii. Tomogramy poszczególnych etapów tego procesu rejestrowane były w 5-minutowych interwałach czasowych przez 90 minut. Przeprowadzenie stałej, długoterminowej obserwacji rozwoju struktur od

pojedynczych bakterii inkubowanej z EPI oraz komórek nieinkubowanych, aż do mikrokolonii, pozwoliło na uzyskanie informacji na temat dynamiki rozwoju struktur.

Serię numerycznie zrekonstruowanych tomogramów 3D-RI (19 tomogramów dla każdego pomiaru), które uzyskano z poszczególnych próbek, zaimportowano z oprogramowania STEVE do oprogramowania MATLAB. Wykorzystano protokół opisany w przypadku **Publikacji 1**, uzupełniając go o dodatkowy filtr niwelujący szum w zarejestrowanych tomogramach – filtr otwarcia (z ang. *opening filter*). Wyznaczono dodatkowo dane na temat objętości zajmowanej przez komórki i tworzone przez nie struktury, co w połączeniu z wyznaczoną gęstością suchej masy pozwoliło na określenie suchej masy komórek tworzących analizowane struktury przestrzenne.

Wyniki uzyskane dla komórek inkubowanych z EPI zostały porównane z pomiarami kontrolnymi. Analizowałam medianę wartości RI komórek bakteryjnych, objętość struktur i suchą masę bakterii wchodzących w skład tych struktur. Analiza tomogramów wykazała, że w próbkach kontrolnych obserwowane były rozwinięte, zwarte struktury skupisk komórkowych o relatywnie wysokiej suchej masie i większej objętości niż pozostałe traktowane EPI. W przeciwieństwie do tego, w obecności EPIs, tj. w przypadku palmatyny, berberyny i kurkuminy, odnotowałam wyraźne zmniejszenie objętości i suchej masy skupisk komórkowych, a także zaburzenia ich struktury przestrzennej, w tym brak tworzenia skupisk, spowolnione podziały komórkowe i wydłużenie komórek. Zaobserwowane różnice w rozwoju mikrostruktur bakteryjnych wynikają z faktu, iż zmiany morfologiczne stanowią jedną z najważniejszych strategii przetrwania bakterii patogennych. Wiele gatunków bakterii w obecności stresora przekształca się do nitkowatych form, gdzie występuje jedynie elongacja komórki bez podziału (Cayron et al., 2023; Khan et al., 2022). Najmniejszy wzrost objętości oraz wydłużanie się komórek (bez ich podziału) odnotowano dla *B. cereus* (1,12 dla kurkuminy, 1,13 dla berberyny i 1,16 dla palmatyny), potencjalnie ze względu na podwójne działanie tych związków jako EPI i SrtAI, prowadzące do utrudnionej adhezji bakterii do agaru.

Wyniki potwierdziły, że dodanie EPI do pożywki wpływa na dynamikę podziałów komórkowych, zatem mogą zostać wykorzystane do ograniczenia wzrostu bakterii. Dodatkowo, komórki po 24 godz. inkubacji z EPI zmieniają charakterystykę rozwoju struktur bakteryjnych (następuje spowolnienie podziałów, wydłużanie komórek bez podziałów) bądź rozwój skupisk nie następuje. Badanie to wykazało, że spośród przebadanych EPIs pochodzenia naturalnego to palmatyna, berberyna i kurkumina mogą być obiecującymi substancjami w terapii antybakteryjnej, również jako składnik terapii skojarzonej.

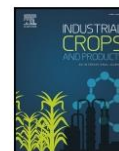
Uzyskane wyniki potwierdziły spełnienie postawionej hipotezy badawczej **H2**, zgodnie z którą użycie celowanych inhibitorów pomp efflux pozwala na ograniczenie formowania się struktur

przestrzennych tworzonych przez bakterie. Wyniki badań świadczą, że EPIs mogą pełnić rolę regulatorów tworzenia się skupisk bakterii, co ma istotne konsekwencje zarówno w kontekście zrozumienia mechanizmów biologicznych leżących u podstaw formowania przez komórki bakteryjne struktur przestrzennych, jak i potencjalnych zastosowań praktycznych – na przykład w ograniczaniu dynamiki kolonizacji i zastosowaniach w przemyśle, gdzie wymagane jest utrzymanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów. W odróżnieniu od większości dotychczasowych doniesień, które koncentrowały się głównie na roli EPIs w poprawianiu skuteczności antybiotyków lub w hamowaniu pomp efflux jako mechanizmu oporności, moja analiza wykazała, że EPIs, stosowane w stężeniu znacznie niższym niż MIC (0,25 MIC), mają bezpośredni wpływ na formowane przez bakterie struktury przestrzenne, co stanowi istotny wkład w literaturę naukową dotyczącą molekularnych i fenotypowych (zmiany morfologii, objętości oraz RI komórek i ich struktur przez nich tworzonych) konsekwencji hamowania aktywności transporterów błonowych, jakimi są pompy efflux. Obniżone stężenia EPI pozwalają na redukcję stężenia substancji w produktach i ograniczenie potencjalnych skutków ubocznych lub interakcji z innymi składnikami. Takie podejście, wykorzystujące zaawansowane techniki ilościowego obrazowania fazy, jak DHT, pozwala na precyzyjną, nieniszczącą i bezkontaktową ocenę wpływu inhibitorów na zachowanie się bakterii na poziomie pojedynczych komórek i niewielkich struktur bakteryjnych, co znacznie wykracza poza tradycyjne metody oceny MIC czy proste pomiary OD. Ponadto praca zwraca uwagę na fakt, że wybrane związki roślinne mogą pełnić podwójną rolę biologiczną – zarówno jako inhibitory pomp efflux, jak i inhibitory Sortazy A – co otwiera perspektywy ich użycia nie tylko w terapii łączonej z antybiotykami, ale również jako dodatków funkcjonalnych (np. wydłużających okres przydatności produktu) w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy kosmetycznym.



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology

Aleksandra Pietrowska^{a,*}, Mateusz Guźniczak^a, Agata Kublicka^b, Anna Matczuk^b, Alina Wieliczko^c, Agnieszka Ulatowska-Jarża^a, Igor Buzalewicz^a

^a BioQuanty Group, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Science and Technology, 27 Wybrzeże S. Wyspiańskiego St., Wrocław 50-370, Poland

^b Department of Pathology, Division of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 31 C.K. Norwida St., Wrocław 51-375, Poland

^c Department of Epizootiology and Veterinary Administration with Clinic of Infectious Diseases, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 45 Grunwaldzki Square, Wrocław 50-366, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Efflux pump inhibitors (EPIs)
Sortase A inhibitors (SrtAIs)
Bacterial growth curve
Minimal inhibitory concentration (MIC)
Development of bacterial clusters

ABSTRACT

Antidrug resistance remains a major therapeutic challenge, with combination therapies, often enhanced by plant-derived compounds, gaining popularity due to their increased efficacy in antibacterial treatments. This study focused on the effects of plant-derived efflux pump inhibitors (EPIs) on bacterial growth in liquid medium and the ability of cells incubated with selected inhibitors to form bacterial clusters on solid medium. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of berberine, capsaicin, coumarin 6, curcumin, palmatine, and piperine were determined against *P. mirabilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, and *B. cereus* using a modified resazurin assay. Antimicrobial activity was shown by palmatine, curcumin, and berberine. Literature studies confirmed that these compounds also belong to the Sortase A inhibitors. Next, how the addition of a specific concentration of EPI affects the change in optical density of the bacterial suspension over time was investigated in a bioreactor. The results confirm that the addition of EPI to the medium changes the characteristics of the growth curve, in particular the logarithmic phase. Digital holotomography was used to investigate EPI-induced changes in bacterial cluster growth dynamics. Median RI values of bacterial cells, volume of structures and dry mass were analyzed. Significant changes in the characteristics of clusters development on agar medium were observed between groups, including lack of cluster development, slowing of divisions, and elongation of cells. This study showed that palmatine, berberine, and curcumin could be promising substances for antimicrobial therapy, also as a component of combination therapy. In addition, they can find applications as preservatives used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a major global health challenge of the 21st century. It is predicted to be responsible for 10 million deaths per year worldwide by 2050 (Tang et al., 2023). The main reasons for this is the overuse of antibiotics and other antimicrobial agents in many areas of life (Llor and Bjerrum, 2014). Single cells are more susceptible to drugs, antibiotics, or other bactericides. In the case of cellular structures (clusters, microcolonies, biofilms), the outer cells are most susceptible to antimicrobial compounds. Many factors influence biofilm

formation, including cell adhesion to surfaces and the formation of extracellular polymeric substance (EPS) production. Extracellular polymeric substance plays at least several roles in the biofilm formation process. In addition to its protective functions, it provides stability to the overall structure and facilitates cell-to-cell and cell-to-surface adhesion. Cells that are part of a complex structure can use chemical communication among themselves, as a result of which the direction of their development can be changed when a toxic agent is present. In the case of single cells, a change in morphology can be observed by elongation of the cell without division (Cayron et al., 2023; Khan et al., 2022).

* Corresponding author.

E-mail addresses: aleksandra.pietrowska@pwr.edu.pl (A. Pietrowska), mateusz.guzniczak@pwr.edu.pl (M. Guźniczak), agata.kublicka@upwr.edu.pl (A. Kublicka), anna.matczuk@upwr.edu.pl (A. Matczuk), alina.wieliczko@upwr.edu.pl (A. Wieliczko), agnieszka.ulatowska-jarza@pwr.edu.pl (A. Ulatowska-Jarża), igor.buzalewicz@pwr.edu.pl (I. Buzalewicz).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121378>

Received 21 February 2025; Received in revised form 21 May 2025; Accepted 16 June 2025

Available online 18 June 2025

0926-6690/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Formation of biofilm, other spatial structures (clusters, microcolony), the difficulty in effectively disinfecting, and the accumulation of bacteria in hard-to-reach areas are a few of the reasons for the common presence of bacterial infections. Methods currently used are characterized by insufficient decontamination efficiency. The study showed that standard procedures do not allow for eradication of bacterial biofilm accumulated in both endoscope channels. Both chemical and mechanical cleaning do not bring the expected results (Pajkos et al., 2004). Another difficulty is the removal of bacterial structures from dry surfaces. Biofilms are present on up to 90 % of surfaces in intensive care units, and selected species can survive for more than a year without nutrients. It has been confirmed that they are much more resistant to disinfection and sterilization. 50 times wiping using standard procedure allowed the removal of approximately 97 % of the biofilm (Parvin et al., 2019). Based on conducted research using various methods, procedures, and antibacterial compounds, it can be concluded that methods is sought to increase the effectiveness of antibacterial therapies (Otter et al., 2015). Contamination problems with various pathogens also affect cosmetics (Alshehrei, 2024; Kim et al., 2020; Nusrat et al., 2023) and food (Alves et al., 2021; Sunarti, 2024; Zavisic et al., 2024). Contamination can occur at various stages of the production process or during use, which poses a huge safety challenge.

One mechanism of antimicrobial drug resistance is the efflux pump. In this mechanism, the extrusion time of the drug is shorter than the time required for its diffusion into the bacterial cell. The result is an insufficient accumulation inside the cell of the substance, which leads to ineffective therapy (Khameneh et al., 2019). The role of efflux pumps in vivo is very complex, they play an important role in bacterial physiology, metabolism, and pathogenicity (Nishino et al., 2021). At least four tasks have been identified in which efflux pumps are involved in biofilm development. The most important are facilitation of EPS formation, affecting quorum sensing and quorum quenching, and removal of toxic substances, initiation and inhibition of adhesion (Alav et al., 2018). To prevent the mechanism of efflux pumps, it is possible to block them using EPI. Disrupting biofilm formation, especially in the early stages, can contribute to the effectiveness of therapy.

A variety of available EPIs, of synthetic and natural origin, allows for their wide application in antibacterial therapy. Naturally derived inhibitors are of particular interest (Khameneh et al., 2019; Stavri et al., 2007). This is supported by the fact that over the past 30 years, almost 75 % of approved antimicrobial drugs have been of natural origin (Prasch and Bucar, 2015). Recent studies on plant molecular mechanisms, such as m6A RNA modification, have also highlighted strategies to optimize the biosynthesis and functional quality of plant-derived bioactive compounds, further supporting their potential in therapeutic applications (Shan et al., 2025). The use of naturally occurring substances would ensure a reduction in toxicity to healthy eukaryotic cells. Many studies indicate that substances of natural origin exhibit antibacterial activity and may play the role of EPIs, contributing re-sensitization of bacteria to substances to which they have been resistant and enhancing the effect of the therapy used, acting as antibiotic potentiators (Kalia et al., 2012; Negi et al., 2014; Prasch et al., 2019; Setiawan et al., 2021). Notably, plant-derived compounds such as alginate oligosaccharides have also been shown to elicit defense responses in plants, underscoring their broader bioactive potential in both antimicrobial and host resistance contexts (Peng et al., 2025).

The bacterial species used in this research are common and clinically relevant. *Escherichia coli* is important member of normal human and mammalian intestinal microflora and is a commensal bacterium found in the gastrointestinal tract that can cause opportunistic infections through migration (Kaper et al., 2004). Multidrug-resistant *E. coli* strains necessitate the search for new methods and compounds to overcome resistance (Cerceo et al., 2016; Walker et al., 2022). *Proteus mirabilis* is considered an integral part of the faecal flora and is therefore mainly found in the gastrointestinal tracts of humans and animals (Armbruster and Mobley, 2012; Govindarajan and Kandaswamy, 2022). Infection can

cause urinary tract and gastrointestinal tract infections. *P. mirabilis* can also be found in a variety of environments, including soil, water, and wastewater, where it plays a key role in the decomposition of organic matter (Armbruster et al., 2018). Genome analysis revealed the presence of genes responsible for antibiotic resistance, which poses a challenge for new antimicrobial therapies (Adamus-Bialek et al., 2013; Chakkour et al., 2024). Environmental interactions, such as those mediated by rhizosphere metabolites and microbial communities under stress conditions, further highlight the adaptability of bacteria and the potential of plant-derived compounds to modulate microbial behavior (Yuan et al., 2024). *E. faecalis* is the best-known *Enterococci* species. In recent years, enterococci have become the source of a significant number of nosocomial infections which occur through gut translocation (Said et al., 2024). Enterococci virulence is due to other properties such as persistence, structure, and antibiotic resistance. Vancomycin-resistant strains are of particular concern as they pose a huge clinical challenge (Cetinkaya et al., 2000; Miller et al., 2016). *Bacillus cereus* belongs to the Gram-positive bacterial group and shows close phenotypic and genetic affinity with several other *Bacillus* species, especially *B. anthracis* (Ash et al., 1991). *B. cereus* is widely distributed in food and can cause food poisoning, but also serious infections such as pneumonia (Bottone, 2010; Rahnama et al., 2023; Yu et al., 2020). The pathogenicity of *B. cereus* is closely related to the production of tissue-damaging exoenzymes (Bottone, 2010). The ability to form spores that are resistant to extreme environmental conditions significantly reduces the effectiveness of the therapy (Bottone, 2010; Periferakis et al., 2023).

The aim of this study was to prove the feasibility of the potential use of plant-derived compounds (berberine, capsaicin, coumarin 6, curcumin, palmatine, piperine) in the food and cosmetic industries to prevent bacterial growth in products and in the pharmaceutical industry as potentiators of compounds used in antibacterial therapy by determining their effect on bacterial growth and morphology (*Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*). MIC values were determined for individual compounds and bacterial species, the effect of specific concentrations of EPI on bacterial culture development in liquid medium and the ability of cells incubated with EPI on solid agar medium to develop bacterial clusters was observed. It was decided to observe the development of bacterial clusters due to the fact that this is an early and also a key step leading to biofilm formation. The changes observed at this stage will be directly related to the ability to form a biofilm. The research presented is a comprehensive approach that considers bacterial growth in both liquid and solid environments, allowing for the potential use of these compounds in a wide range of industries. The EPI concentrations used are 0.25 MICs, which allows for the reduction of substances in the products and limits potential side effects or interactions with other ingredients. The study also highlights how incubation with these compounds affects the ability to form bacterial clusters, which is highly relevant to the risks posed by biofilms. Given the natural origin of the substances, their cost, and the inability of bacteria to become resistant to them, they become excellent candidates as preservatives or antimicrobial substances on their own but also as an additional ingredient to enhance the effect of other substances. The expected result is the identification of the substance that, for the selected bacterial species, contributes most to slowing down the growth of the bacterial culture in the liquid medium and the formation of bacterial clusters. This will make it possible to determine the suitability of EPI for industrial applications, both in liquid products (food and cosmetics) and solid products, taking into account product packaging and the surfaces of various equipment. The identification of specific compounds for a bacterial species can contribute to reducing contamination, prolonging the shelf life of products and slowing the growth of bacteria that may enter the product. The study used both qualitative (modified resazurin assays) and quantitative (growth kinetics measurements and time-lapse imaging using digital holotomography) methods supported by statistical analysis.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Four reference strains *Proteus mirabilis* ATCC 25212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* PCM 1948, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and Polish Collection of Microorganisms (PCM) were used in presented research. These strains are representative of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

2.2. Efflux pump inhibitors

Due to the popularity of EPIs of natural origin, this study selected the popular EPIs from plant sources. Berberine Hydrochloride (BER), Capsaicin (CAP), Coumarin 6 (COU), Curcumin (CUR), Palmatine (PAL), Piperine (PIP) (manufacturer Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) were used in the experiment.

2.3. Preparation of bacterial suspension

Overnight cultures of bacterial strains were prepared. The optical density at 600 nm (OD600) was adjusted to 0.6, and serial 10-fold (10^{-1} - 10^{-4}) dilutions were subsequently prepared in Tryptic Soy Broth (TSB) (Biomaxima, Lublin, Poland).

2.4. MIC evaluation

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of EPIs were determined in TSB (BioMaxima, Lublin, Poland) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines for broth microdilution susceptibility testing. The CLSI's protocols are accepted world-wide for testing of antibiotics. Mueller-Hinton cation-adjusted broth (MHB) is used as a suitable growth medium for the broth dilution technique, but other broths and agars are also commonly used (Kowalska-Krochmal and Dudek-Wicher, 2021). The most important factors causing differences in the MIC between studies have been identified, including inoculum size, endpoint determination, incubation conditions, culture media, and the use of emulsifiers or solvents (Balouiri et al., 2016; Van de Vel et al., 2019). Based on the results (Hulankova, 2022) it was confirmed that the MIC values obtained by diluting the broth using highly nutritious media such as TSB and Brain-Heart Infusion medium are fully comparable.

Inhibitors are characterized by relatively low solubility in water, therefore the addition of DMSO is necessary. The poor aqueous solubility of each naturally derived EPI affects their activity, bioavailability, and ability to be assessed for antimicrobial activity (Ubeyitogullari and Ciftci, 2019). Viability tests were performed using resazurin for DMSO at different concentrations (final DMSO v/v concentrations in TSB were 10 %, 5 %, 2.5 %, and 1.25 %). Resazurin sodium salt (R7017, manufacturer Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used in this research. In the resazurin cell viability method, 90 μ l of TSB+DMSO and 10 μ l of bacterial suspension were added to 96-well plates. A final bacterial suspension concentration of 5×10^5 CFU/ml in each well was adopted for this assay. The samples were incubated at 37 °C in the dark for 24 h, then 20 μ l of resazurin (0.15 mg/ml) was added to each well. Any color changes from purple to pink or colorless after 1 h were recorded as positive. Three independent experiments were performed for each bacterial species. Even at a concentration of 10 %, DMSO does not prevent visible microbial growth. Referring to (Alharthi et al., 2021), a concentration of 5 % was used as it has been shown to have optimal solubility with minimal impact on bacterial viability.

Bacterial suspension was prepared in TSB and further diluted to approximately 5×10^6 CFU/ml. Substances were individually diluted in TSB with DMSO addition. The EPIs were further diluted to a working concentration (final DMSO v/v concentrations in TSB was 5 %). The

dilutions of EPIs were mixed 9:1 with the inoculum in a 96-well microplate. A final concentration of 5×10^5 CFU/ml was adopted for this assay. Both positive (without EPI) and negative (uninoculated TSB) controls were included. The plates were prepared in triplicate and placed in an incubator set at 37 °C for 18–24 h. After incubation to facilitate reading in the broth microdilution method, resazurin (20 μ l of resazurin/well (0.15 mg/ml)) was used, which is reduced by active bacteria to fluorescent resorufin (pink). A modified resazurin method (Sarker et al., 2007) was used, which only incorporates changes in the concentration of the test material (EPI concentration). The color change was then assessed visually. Any color changes from purple to pink or colorless were recorded as positive. The lowest concentration at which color change occurred was taken as the MIC value.

2.5. Growth kinetics measurements

The growth curves were constructed based on optical density (OD) measurement at 850 nm in Personal Bioreactor RTS-1 (Biosan, Riga, Latvia). A calibration was performed for each species as recommended. Both control measures and measures in media with EPI (approx. 25 % of MIC) were performed. The measurement parameters were chosen in accordance with the manufacturer's recommendations (vessel spinning speed 2000 rpm, reverse spin interval 1 s^{-1} , socket temperature 37 °C, sample volume in testing vessel 10 ml, measurement frequency 10 min.). The sample was incubated in the bioreactor until the stationary phase was achieved. If the recorded measurement required smoothing, this was performed in the dedicated RTS control program software (v. 2.7.6.0, Biosan, Riga, Latvia). The doubling time was estimated based on the maximum growth rate (Wang et al., 2015):

$$\tau = \frac{\ln 2}{\alpha}$$

α - maximum growth rate

τ - doubling time

The medium was inoculated with a bacterial suspension - the initial bacterial concentration in the test vessel was approximately 5×10^6 CFU/ml. Each measurement was performed three times.

2.6. Agar medium and sample preparation for digital holotomography

First, a microscopic slide on which the bacterial cells were growing into cluster was prepared. A Gene Frame (125 μ l, 1.7×2.8 cm, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) was attached in the middle of microscopic slide. The slides and frames were sterilized in a steam autoclave at 121 °C. 300 μ l of dissolved agar medium (TSA with 2 % low melting agarose (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen Life Technologies, UK), RI = 1.343) was pipetted into the frame. It was ensured that the entire volume of the frame was filled with agar. The frame was then covered with a second microscope slide and placed in the refrigerator (4 °C) for at least one hour. Next, the upper glass was carefully slide off and plastic cover was removed to expose the sticky side. The side pieces of agar were removed and filled with 30 μ l of 0.9 % NaCl solution. 1 μ l of bacterial suspension was placed on a solid medium. Microscopic slide with frame was covered by coverslip and sample was incubated at 30 °C for 15 min.

2.7. Quantitative assessment of bacterial cluster development

Quantitative time-lapse imaging and analysis of bacterial clusters was performed to assess the effect of 24 h incubation with EPI on the physiology of bacteria. Adequately prepared agar medium enabled visualization and measurement of bacterial division using digital holotomography (DHT). Measurements were performed with the use of the DHT system (3D Cell Explorer, Nanolive, Ecublens, Switzerland) with using top-stage incubator (Okolab for Nanolive, Pozzuoli, Italy) and the spatial distribution of the refractive index (RI) was obtained as the

measurement result. Cells were incubated at 30 °C and 3D-RI tomograms were acquired at 5-min intervals. For each group, three time-lapse movies (1.5 h, 19 frames) were recorded, resulting in a total of 57 3D-RI tomograms and 5472 2D-RI tomograms per group.

The series of numerically reconstructed 3D-RI tomograms that were obtained from individual samples was imported from STEVE software (version 1.6.3496, Nanolive, Ecublens, Switzerland) to MATLAB® software (version R2023b, MathWorks, Natick, MA, USA). To determine the RI values of the bacteria cells, a single 2D-RI tomogram was selected, representing the single slice of 3D-RI tomogram with the highest contrast for the examined cells. Next, a contour mask was generated

based on a defined polygonal region of interest. This region was identified by setting an RI threshold exceeding that of the surrounding medium. The contour mask was then applied to the original data (a series of 2D-RI tomograms), allowing for automatic segmentation of cell-occupied regions and direct determination of the RI values of bacterial clusters in the sample. To minimize noise in the recorded tomograms, an opening filter was applied. As a result, RI values for the voxels corresponding to cell-occupied areas were accurately obtained.

The collected data provided the basis for further analysis, focusing on the determination of cell volume and dry mass. Cell volume was estimated by counting the voxels corresponding to bacterial cells and

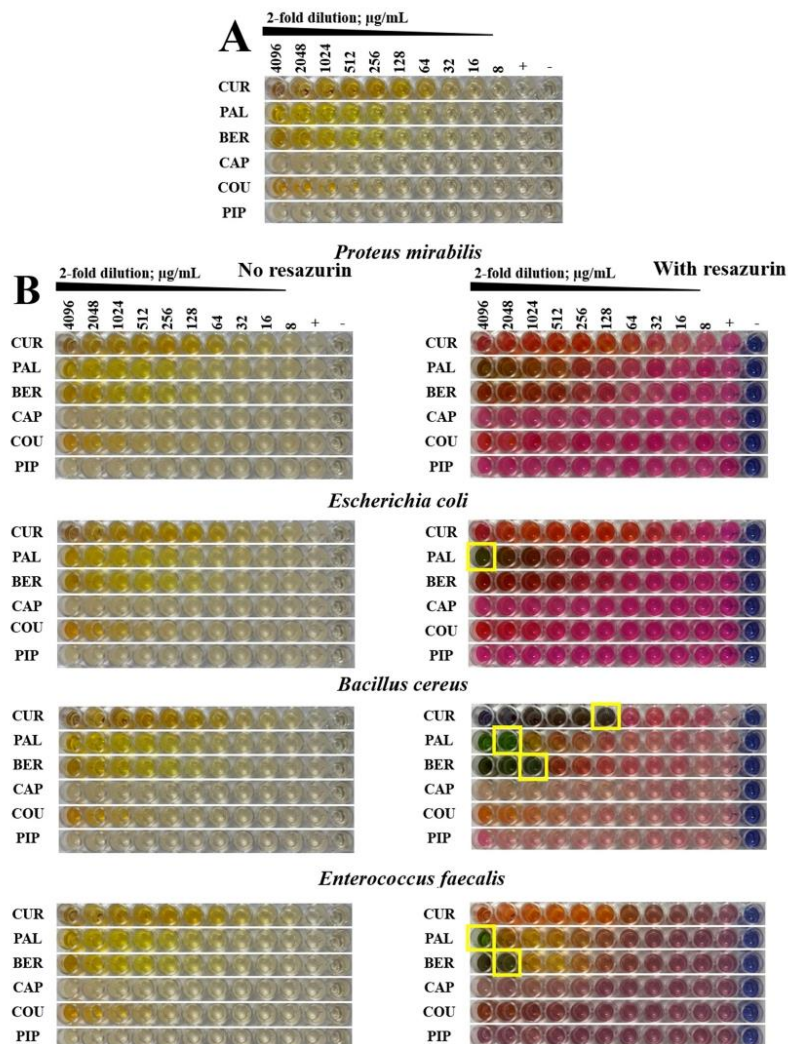


Fig. 1. Test plates after 24 h in modified resazurin assay using the CLSI broth microdilution (BMD) method in the presence of 5% (v/v) DMSO in TSB. (A) Visual representation of a control plate (without bacteria) after 24 h incubation, (B) Investigation of MIC values for *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*. After 24 h, the plate was imaged (left panel) and resazurin was added (right panel). The MIC determined after resazurin addition is indicated by yellow squares. Lanes marked '+' contain bacteria, but no EPI. Lanes marked '-' contain media with no bacteria or EPI added.

A. Pietrowska et al.

Industrial Crops & Products 233 (2025) 121378

adjusting the values according to voxel resolution. To assess the dry mass parameter, the dry mass density was first calculated as the difference between the median RI of bacterial cells and the median RI of the surrounding medium (Friebel and Meinke, 2006):

$$\rho = \left(\frac{RI}{RI_{\text{agar medium}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{k}$$

where RI is the median of the refractive index of the cells, $RI_{\text{agar medium}}$ is RI of the environment, k is the absorption constant.

An absorption constant of 0.185 ml/g was adopted for bacteria, representing their cellular structure, which contains proteins, nucleic acids, sugars, and salts (Oh et al., 2020). Using the dry mass density, the dry mass of the bacterial cluster was determined, calculated based on the following formula:

$$M_{\text{dry}} = \rho \cdot V$$

where ρ is the density of dry mass, V is the volume of bacterial cluster.

2.8. Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate. Statistical analysis was performed using the Origin Software (OriginPRO 2023b, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Normality of distribution was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test, homogeneity of variance was assessed using the Brown-Forsythe test. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons. When the assumptions of ANOVA were not met the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test was used. A Student's t -test was used to compare the two groups. Statistical significance was evaluated at the 95 % confidence level.

3. Results and discussion

3.1. MIC evaluation

Determination of MIC is necessary to find out the concentration of the substance that can be used in the potentiation process. The MIC is defined as the lowest concentration of the antimicrobial substance that prevents visible growth of a microorganism under specific conditions (Wiegand et al., 2008). In this study TSB was used to determine the MIC instead of MHB.

Fig. 1 shows a representative test plate demonstrating the turbidity and color change in the resazurin test caused by bacterial growth.

The experiments showed that none of the EPI concentrations (up to 4096 mg/ml) caused visible growth inhibition for *P. mirabilis*, in the case of *B. cereus*, no change in color was observed for CUR (128 $\mu\text{g/ml}$), PAL (2048 $\mu\text{g/ml}$), and BER (1024 $\mu\text{g/ml}$), for *E. coli* growth inhibition was caused by incubation with PAL solution (4096 $\mu\text{g/ml}$), while for *E. faecalis* it was possible to determine the MIC for PAL (4096 $\mu\text{g/ml}$), and BER (2048 $\mu\text{g/ml}$). The required EPI concentrations were lower for Gram-positive bacteria than for Gram-negative bacteria. This may be due to differences in bacterial structure. In Gram-positive bacteria, the outer peptidoglycan layer provides limited resistance to permeability (Bamoniri et al., 2010; Rajagopal and Walker, 2017). The MIC values obtained are relatively high compared with other studies focusing on plant-derived compounds. As mentioned earlier, MIC value can be affected by the solvent used. Using a higher concentration of DMSO than 5 %, ethanol or methanol as a solvent may result in different MIC values for the same substances (Matzner et al., 2011; Nascimento et al., 2014; Özçelik et al., 2011). This is due to the combination of the antibacterial properties of the solvent and the compound used (Alharthi et al., 2021). Studies by other researchers have confirmed that some bacteria can use capsaicin as a nutrient for growth, which may explain the inability to determine MIC values (Flagan and Leadbetter, 2006).

The compounds that have shown antibacterial activity are PAL, BER,

and CUR. They are also Sortase A inhibitors (SrtAIs) (Alharthi et al., 2023, 2021; Guo et al., 2015; Nitulescu et al., 2017). Sortase A (SrtA) is a membrane-bound cysteine transpeptidase which attaches proteins to the Gram-positive bacterial cell wall. The proteins anchored by this enzyme play an important role in bacterial adhesion and biofilm formation, which is an important virulence mechanism. SrtA is not required for microbial growth, viability, and additionally does not occur in eukaryotic cells, so inhibitors of this enzyme will have no toxic effects on these cells (Cascioferro et al., 2014; Guo et al., 2015). SrtA is therefore an ideal target for designing new drugs and therapies that do not contribute to the development of a resistance mechanism.

3.2. Growth kinetics measurements

EPI and SrtAI can induce changes in the development of a bacterial culture due to its broad spectrum of action, as mentioned previously. This may include disruption of cell division, changes in growth curve characteristics, and changes in cell morphology.

A concentration 4 times lower than the MIC was selected for growth kinetics measurements (see Fig. 3 A). This concentration is normally chosen during a potentiation assay (Stavri et al., 2007). Potentiators, also known as adjuvants, are active compounds that have little or no antimicrobial activity on their own. When combined with antibiotics or other antimicrobial agents, they can lead to an additive or synergistic effect of therapy. Mechanisms of action include inhibition of the efflux pump, suppression of a drug-modifying enzyme, and enhanced membrane permeability (Paul et al., 2023).

During the measurement, the change in OD values over time was recorded. From this, the growth rate (first derivative) was determined. By examination the increase of the OD value, it is not possible to determine unambiguously when the logarithmic phase ends. It was decided to superimpose two curves (Fig. 2). It can be seen that the part of the graph with a positive slope for the growth rate defines the logarithmic phase in the graph of the time dependence of OD changes (marked part between the vertical dashed lines). The first non-zero OD value was considered to be the beginning of the logarithmic phase of growth, while the last point of this phase was the OD corresponding to the highest value of the growth rate.

Fig. 3 shows the concentrations of EPIs used in measurements (Fig. 3A), maximum OD, maximum growth rate, doubling time, and log phase duration values for the 3 species and selected EPIs (Fig. 3B,C,D). The duration of the logarithmic growth phases shown for each group is the maximum duration of one of the repetitions.

Smoothing was necessary for measurements of *B. cereus* and CUR and *E. coli* and PAL. A specific turbidity was noted in the testing vessel suggesting clustering of cells in suspension that may interfere with the OD measurements. Averaging allowed the deviating individual measurement points to be compensated for. This type of turbidity was not

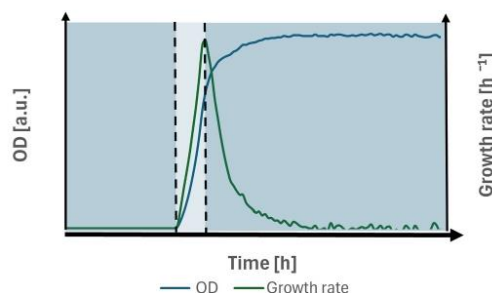


Fig. 2. Graphic representation of bacterial growth curve in culture medium: OD (left axis), growth rate (right axis).

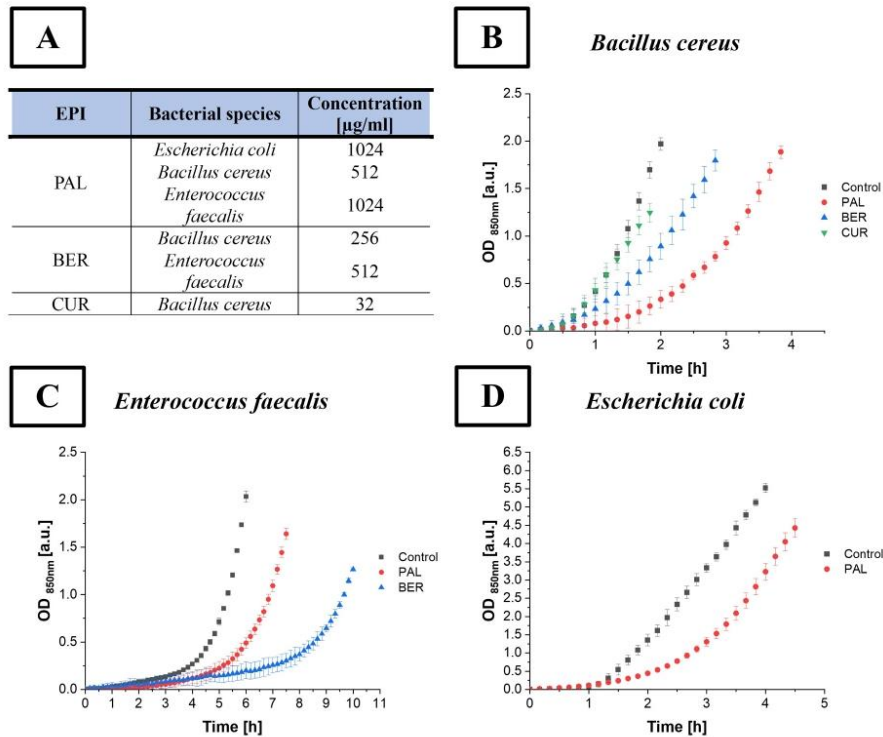


Fig. 3. (A) Concentrations of EPIs used in measurements of bacterial growth kinetics and bacterial growth curves for: (B) *B.cereus*, (C) *E.faecalis*, and (D) *E.coli*. The values represent the means±SDs from three independent experiments.

observed for the other study bacterial species incubated with EPI.

Comparing the control group and the groups with the addition of EPI, there are differences in the length of the logarithmic phase and the achieved OD value at the end of this phase. Table 1 summarizes the determined parameters of the recorded growth curves.

In addition to the analysis of the duration of the logarithmic growth phase, the maximum growth rate, doubling time, and maximum OD were also compared. It can be seen that the highest growth rate value occurs *E.coli*, then *B.cereus*, the lowest by *E.faecalis*. This confirms that the growth of Gram-negative bacteria is faster compared with Gram-positive bacteria. Incubation with EPI resulted in a decrease in the value of the maximum growth rate, with a consequent increase in the doubling time.

Table 1
Parameters determined from bacterial growth curves. All values are expressed as the means±SDs (n = 3).

Strains	Group	Maximum growth rate [h ⁻¹]	Doubling time [h]	Maximum OD [a.u.]	Log phase duration [h]
<i>B.cereus</i>	Control	1.413 ± 0.045	0.49 ± 0.02	2.83 ± 0.00	1.67 ± 0.29
	PAL	1.023 ± 0.042	0.68 ± 0.03	2.81 ± 0.01	3.06 ± 0.75
	BER	0.980 ± 0.040	0.71 ± 0.03	2.76 ± 0.01	2.56 ± 0.48
	CUR	0.840 ± 0.036	0.83 ± 0.04	2.60 ± 0.10	1.67 ± 0.17
	Control	1.277 ± 0.095	0.55 ± 0.04	2.81 ± 0.06	5.78 ± 0.19
<i>E.faecalis</i>	PAL	0.870 ± 0.000	0.80 ± 0.00	2.42 ± 0.01	6.22 ± 1.13
	BER	0.590 ± 0.044	1.18 ± 0.09	1.76 ± 0.02	9.44 ± 0.51
	Control	2.143 ± 0.015	0.32 ± 0.02	9.93 ± 0.09	3.89 ± 0.19
<i>E.coli</i>	PAL	2.120 ± 0.085	0.33 ± 0.01	11.50 ± 0.10	4.44 ± 0.10

PAL – Palmatine, BER – Berberine Hydrochloride, CUR – Curcumin.

The data in graphical form are shown in Fig. 4. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons. When the assumptions of ANOVA were not met the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test was used. A Student's *t*-test was used to compare the two groups. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. The graphs indicate statistically significant differences between the groups. All values are expressed as the means ± SDs.

In the case of *B.cereus*, it can be observed that the lower the growth rate, the lower the maximum OD value. The Kruskal-Wallis test showed that for maximum OD, statistically significant differences between groups were only found for Control and CUR. Changes are also observed in log phase duration. This is caused by a proportion disruption between

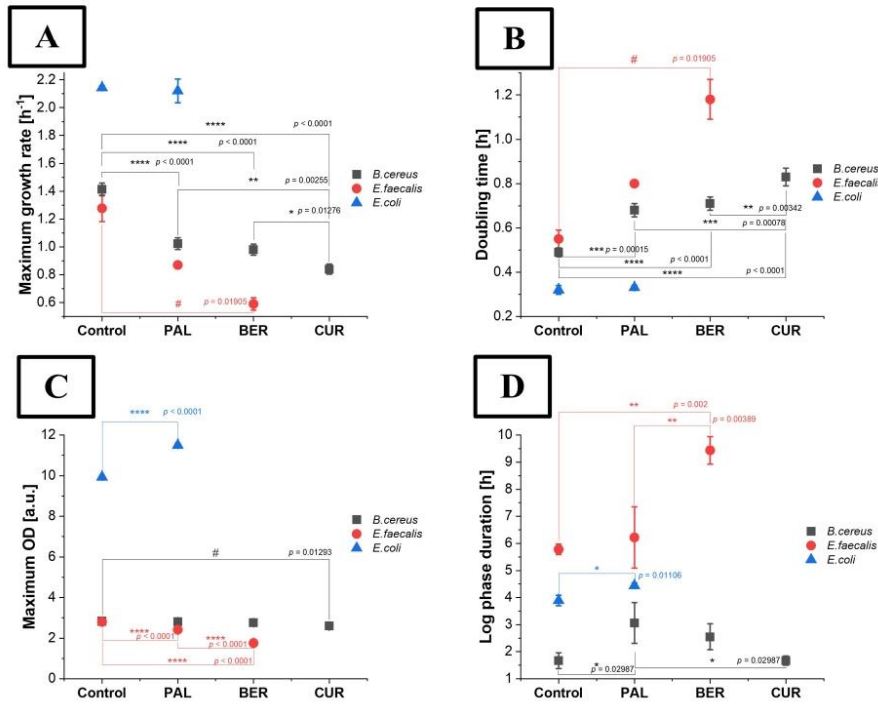


Fig. 4. Comparison of the determined parameters from the recorded growth curves: (A) Maximum growth rate, (B) Doubling time, (C) Maximum OD and (D) Log phase duration. The values represent the means \pm SDs from three independent experiments. (*) results of ANOVA with Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons and Student's *t*-test (*E. coli*), (#) results of Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

the growth phases: the logarithmic phase is shortened, while the inhibition phase is lengthened. As (Pedreira et al., 2022) showed, when substances showing antibacterial activity are used at concentrations lower than the MIC, changes in the dynamics of bacterial growth can be observed, leading to changes in the length of the various growth phases. In the case of PAL and BER, an increase in log phase duration can be observed: 3.06 ± 0.75 h and 2.56 ± 0.48 h, respectively. However, there are no statistically significant differences between this groups. For CUR, the value is similar to the log phase duration of the Control group (approximately 1.67 h), however, the OD value at its end is significantly lower. ANOVA confirmed that statistically significant differences occurred between Control and PAL ($p = 0.2987$) and PAL and CUR ($p = 0.2987$). The highest growth rate value was obtained for the Control group (1.413). A decrease in the average growth rate was observed for PAL, BER, and CUR of 27.6 %, 30.5 %, 40.6 %, respectively. This shows the rate at which bacterial divisions occur, so it can be concluded that the division processes were most affected by CUR. In addition, it can be observed that only for a short period of time does intensive growth of the culture occur in group of cells incubated with CUR. For the maximum growth rate, no statistically significant differences can be found only between the PAL and BER groups, for the other groups there are statistically significant differences ($p < 0.05$). Analogous statistical analysis results were obtained for doubling time.

In the case of *E. faecalis*, the following tendency can be observed: the lower the maximum growth rate, the longer the log phase. The maximum growth rate value for bacteria incubated with PAL decreased by 31.9 %, while that for BER decreased by 53.8 % compared with the value for the Control group. Differences in the maximum OD value

compared with the Control group are 0.39 for PAL and 1.05 for BER. Statistically significant differences can only be found between Control and BER ($p = 0.1905$). Also for log phase duration, the Kruskal-Wallis test showed statistically significant differences between Control and BER. The bacterial division process is inhibited by EPI and entry into the stationary phase occurs at a lower OD value than for Control. By comparing the maximum OD values between the groups, it was found that there were statistically significant differences between the groups for each combination ($p < 0.0001$). Also in the case of this bacterial species, as for *B. cereus*, differences in the growth curve can be observed, which are due to the presence of EPI in the medium. EPI therefore affects the division processes taking place by delaying them. For log phase duration, ANOVA confirmed that there were statistically significant differences between control and PAL ($p = 0.0389$) and PAL and BER ($p = 0.002$).

For *E. coli* cells incubated with PAL, a slight decrease (not statistically significant, see Fig. 4A) in maximum growth rate can be observed (2.120 ± 0.085 h⁻¹ for PAL, 2.143 ± 0.015 h⁻¹ for Control). Log phase duration increased by about 0.55 h after incubation with PAL. However, there was an increase in maximum OD after incubation with PAL. In samples in which bacterial cells were incubated with PAL, their size was smaller, as discussed in the next section. *E. coli* has the ability to adapt its cellular morphology in response to changing environmental conditions, in this case the presence of PAL. When conditions are unfavorable, the bacteria can slow down their rate of division and reduce their size. Smaller cells can thus reduce their nutrient requirements because metabolic processes occur on a smaller scale. This is in accordance with the bacteria's general strategy of resource allocation (Serbanescu et al.,

2021). The volume of medium in both groups was the same, so the higher value of maximum OD for cells incubated with PAL may be due to differences in resource management (TSB). The increase in the maximum OD value may be due to the presence of bacterial clusters appearing after several hours of incubation. These weaken the intensity of the light transmitted through the sample, resulting in an increased OD value. Statistically significant differences between the values of the determined parameters between the Control and PAL groups are found for maximum OD ($p < 0.0001$) and log phase duration ($p = 0.01106$).

3.3. Quantitative assessment of bacterial clusters development

Monitoring the development of bacterial clusters, allows morphological and biochemical parameters to be measured over time. In this study, the focus was on median RI values, cellular dry mass, and cell volume to indicate differences in the development of structures formed by bacteria incubated and not incubated with EPI. Measurements were performed three times independently.

In each group for each measurement and each frame, the median RI was determined (57 3D-RI tomograms/group in total). During measurements of bacterial cluster development, there were changes in the position of bacterial cluster reconstruction (Z-axis position), which also affected the ranges of RI values of the bacterial cells. Different stages of the cell cycle were taken into account, which provided comprehensive information on the range of RI values of the cells in each group. This made it possible to obtain information on the mass concentration in the sample. The results are shown in Fig. 5.

Based on the quantitative analysis of the bacteria, it was possible to determine the median RI values associated with the bacterial clusters. It should be noted that Gram-positive bacteria have a higher median RI value than Gram-negative bacteria.

For *B. cereus*, a decrease in median RI was observed for cells incubated with EPI relative to Control (1.35338). The differences for PAL, BER, and CUR are 0.00238, 0.00282, 0.00248 respectively. A one-way ANOVA confirms that there are statistically significant changes in median RI values between the control and EPI-incubated samples at the 0.05 significance level. The observed decrease in median RI may be due to the effect of PAL, BER, or CUR. As indicated previously, it was confirmed that these belong to EPIs and SrtAIs. It can therefore be concluded that the plant-derived compounds used have two targets: efflux pump and SrtA. Sortase A is a characteristic enzyme of Gram-positive bacteria. It is responsible for anchoring surface proteins on

the cell wall that promote cell adhesion. In control cells, SrtA promoted the anchoring of surface proteins in the bacterial cell wall, resulting in a higher RI value of the cells. The decrease in RI values in the case of cells incubated with PAL, BER, and CUR is due to a decrease in cell density probably due to blockage of surface protein attachment. The RI values obtained also suggest that the EPIs did not accumulate inside the bacteria, in which case an increase in RI value would be observed due to increased density inside the cell. Higher RI values may also be associated with the cell's ability to divide (Buzalewicz et al., 2024). A decrease in RI values may suggest a disruption of this process. This is also confirmed by the results from the Bioreactor, for each of the EPIs a decrease was observed in the growth rate value compared with the Control.

In the case of *E. faecalis*, the median RI for Control cells was 1.35066. For BER, an increase in median RI of 0.00026 was observed, while for PAL there was a decrease of 0.00018. As the assumption of normality of distribution was not met, the Kruskal-Wallis test was performed. The test showed that there were statistically significant changes in the median RI values of Control cells and cells incubated with BER ($p = 0.04859$) and cells incubated with BER and cells incubated with PAL ($p = 0.00011$). The increase in the median of the RI values corresponds to an increase in the density of the cells, which may be related to the accumulation of BER inside bacteria. This demonstrates a different mechanism of action for the PAL and BER. It can be concluded that PAL acts as an SrtAI, whereas for BER the predominant mechanism is to act as an EPI.

In the case of *E. coli*, the range of variation of RI values was 1.3466–1.3515 for Control cells, 1.3471–1.35091 for cells incubated with PAL. Statistical analysis, Student's *t*-test at the 0.05 significance level, showed no statistically significant differences between the groups. The median RI values for Control cells and cells incubated with PAL were 1.34972 and 1.34928, respectively. The difference in median RI value (0.00044) and the development of bacterial clusters (see Fig. 8) suggest that there is a disturbance in the cell division process due to a change in environmental conditions (addition of PAL to the medium).

The volume and RI value depend on the cell cycle and environmental conditions. Environmental stress cause many bacterial species to grow into filamentous cells. The morphological changes constitute one of the most significant survival strategies for pathogenic bacteria. Filamentous cells are formed as a result of cell elongation, however, no cell division occurs (Cayron et al., 2023; Khan et al., 2022). An increase in RI values is observed before cell division, then division occurs, resulting in an increase in the volume of the analyzed bacterial structure. The fluctuations in volume and RI values that occur may be also related to the numerical reconstruction of the recorded tomograms or to changes in the Z-axis position of bacterial clusters, as indicated earlier. In the context of the development of bacterial clusters, the affiliation of all the compounds used (PAL, BER, CUR) to both EPI and SrtAI is important. Inhibition of SrtA induces anti-adhesion and anti-biofilm effects, making it difficult for bacterial clusters to attach to the surface and develop bacterial clusters starting from a single cell. EPIs also exhibit similar effects.

Representative RI-based results are shown in Fig. 6 (*B. cereus*), Fig. 7 (*E. faecalis*), Fig. 9 (*E. coli*). Bacterial cell visualizations are shown using maximum intensity projection (MIP).

Analyzing the recorded long-term measurements of the development of *B. cereus* clusters, it was found that the development of the structure associated with division could only be observed for the control group. This was manifested in increasing volume and dry mass values over time. In other cases, elongation of the cell into a filamentous form is evident. This indicates that incubation with PAL, BER, and CUR represented unfavorable environmental conditions. By analyzing the initial volumes of the cells, it can be concluded that after incubation with CUR the cells are the smallest, while cells incubated with PAL increase their length the most, however, without any division. This may indicate that 24-h incubation with the indicated EPI influences the division processes, disrupting them. In some cases, it leads to elongation of the cell or, as in others, to no change in cell size. This may also be related to impaired adhesion to the agar medium of cells incubated with PAL, BER, and CUR

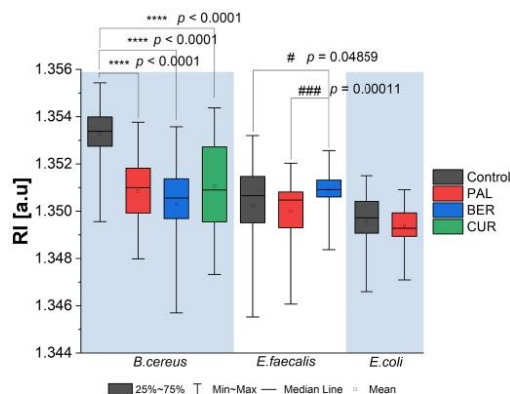


Fig. 5. Box plots of the median RI of *B. cereus*, *E. faecalis*, and *E. coli* bacterial cells. Bacterial cells were incubated with EPI for 24 h. (*) results of ANOVA with Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons, (#) results of Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

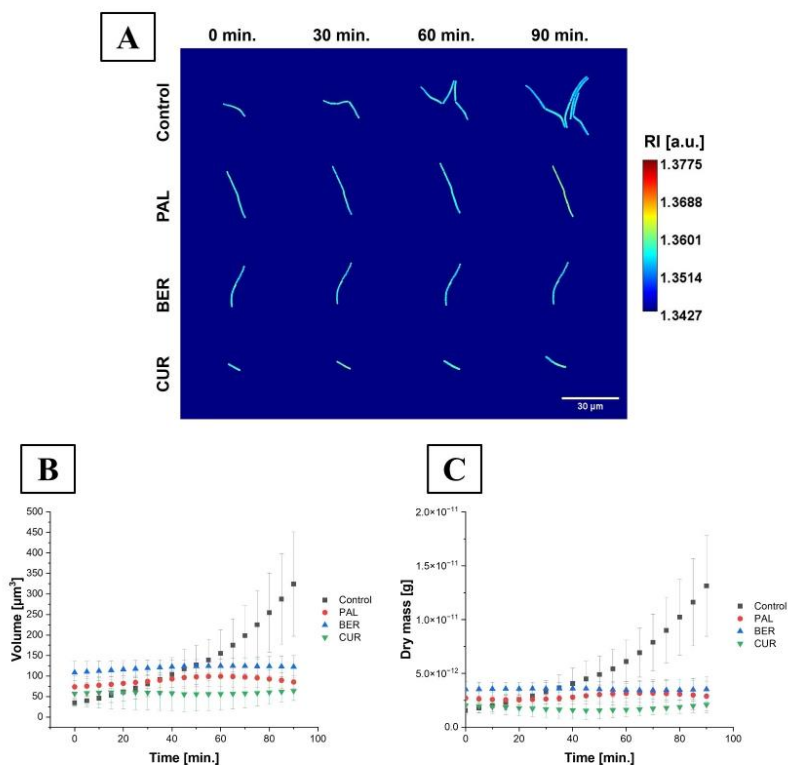


Fig. 6. (A) MIP visualization and quantitative analysis of 3D RI tomograms; (B) Volume, (C) Dry mass of *B.cereus* in agar medium. Bacterial cells were incubated with EPI for 24 h. The values represent the means \pm SDs from three independent measurements.

caused by SrtA inhibition. For Control cells, a 9.37-fold increase in bacterial cluster volume was recorded. For cells after 24 h incubation for PAL, BER, and CUR, this value was 1.16, 1.13, 1.12, respectively. Referring to the results obtained from the growth curves, it can be concluded that the decreased value of the maximum growth rate results in a slower elongation of the bacteria.

In the case of *E.faecalis* for all groups and all measurements, the development of bacterial clusters was observed, however with different characteristics. *E.faecalis* is less susceptible to decreased structure formation following 24 h incubation with the plant-derived compounds used in this study compared with *B.cereus*. This is confirmed by the recorded tomograms showing the development of bacterial clusters. In the case of *E.faecalis*, divisions of cells incubated with both PAL and BER are observed. The volume of the bacterial cluster for Control cells increased 4.14-fold, for PAL 2.43-fold and for BER 3.27-fold. Cells incubated with PAL are smaller in size compared with control cells, also their RI values are lower, as described earlier. In the case of cells incubated with PAL, it can be observed that the volume of the bacterial cluster increases most intensively up to the first division. This process is shown in detail in Fig. 8. A smaller increase in volume is observed from 45 min onwards. At this point, separated daughter cells are visible, which are characterized by a higher RI value. Due to the slowest growth rate, the indicated differences can be observed. In the case of cells incubated with BER, an increase in RI over time can be observed, which manifests itself in the final stage of measurement as a greater increase in dry mass than in the control group, despite the smaller volume of

bacterial clusters. As mentioned earlier in the case of *E.faecalis*, two mechanisms can be distinguished that induce anti-adhesion and antibiofilm activity. Both have the effect of slowing down the growth of bacterial clusters on the agar medium.

For *E.coli* cells incubated with PAL, bacteria have a lower RI value than the Control group. Based on the time-dependent changes in volume, it can be concluded that the rate of bacterial cluster development is much slower than for the Control. The average volume of the bacterial cluster for Control cells increased 5.36-fold, while for PAL it only increased 1.54-fold. For the Control group, up to 4 divisions can be observed in 1.5 h, whereas for cells incubated with PAL at most one division can be observed. In the *E.coli* Control sample, the bacteria measured 4.5–5.5 μm in length (Fig. 10A). In bacterial cultures incubated with PAL *E. coli* cells demonstrated a mean length of 2–2.5 μm (Fig. 10B) and approximately 4 μm (Fig. 10C). For B cells, no clusters growth was observed in any of the cases. This suggests that a reduction in the size of the bacteria incubated with PAL, as part of the response to changing environmental conditions, also affects the ability to cell division. It is noticeable that they have a higher RI than cells from the control group. For C cells, their RI is lower than that of the control cells, and bacterial cluster growth was only seen in one of the three measurements. It was therefore confirmed that PAL can inhibit bacterial growth and division using mechanisms specific to EPI.

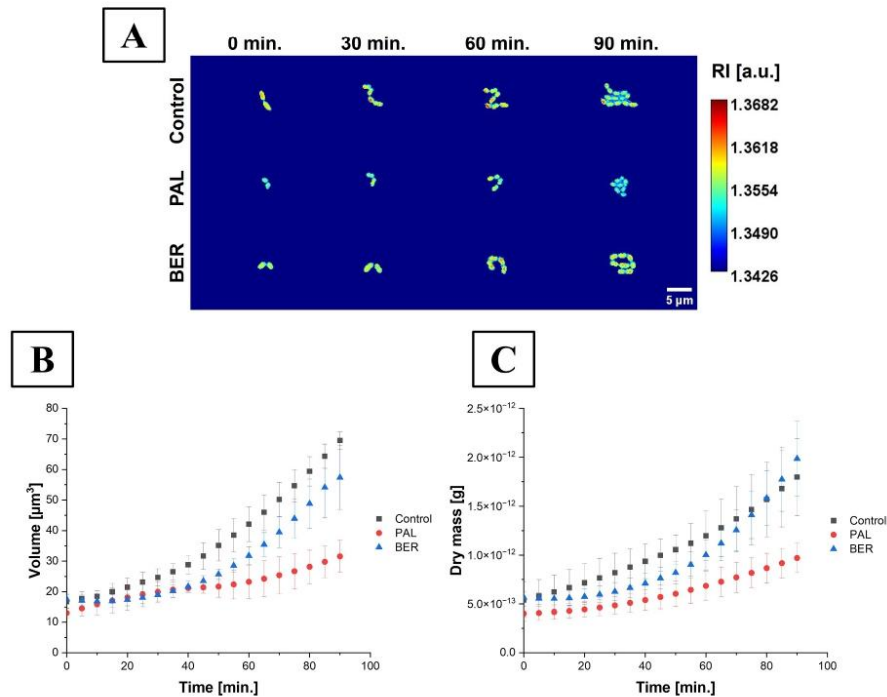


Fig. 7. (A) MIP visualization and quantitative analysis of 3D RI tomograms; (B) Volume, (C) Dry mass of *E. faecalis* in agar medium. Bacterial cells were incubated with EPI for 24 h. The values represent the means \pm SDs from three independent measurements.

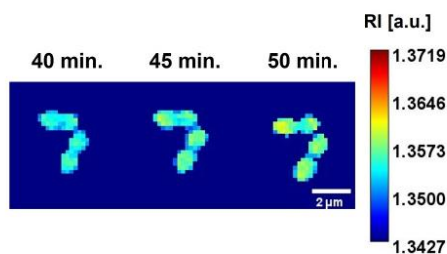


Fig. 8. Representative example of *E. faecalis* cell division incubated for 24 h with PAL.

4. Conclusion

Increasing drug resistance and the rapid spread of bacterial contamination pose many challenges for researchers. The solution may be to use antibacterial-enhancing compounds in therapy or to re-sensitize the bacteria to antibacterial compounds. The use of plant-derived EPIs can make a significant contribution to the efficacy of the therapy by affecting the ability of the bacteria to grow, as demonstrated in this article. In the case of Gram-positive bacteria, the action of two mechanisms can be observed, as CUR, BER, and PAL also belong to SrtAIs. Inhibition of bacterial growth at the clusters stage counteracts the formation of biofilm, which is more resistant to antibacterial compounds due to its structure and the presence of EPS.

As the study showed, the determined concentrations of EPIs for Gram-positive bacteria were lower than those required for visible growth inhibition for Gram-negative bacteria. The effects of EPIs on bacterial growth in liquid medium (TSB) and on the growth of bacteria incubated with them for 24 h in solid medium were investigated. Incubation of bacteria in TSB containing 0.25 MIC of these compounds significantly affected growth characteristics and the development of bacterial clusters from a single cell after 24 h of incubation was modified, i.e. inhibited or reduced. This therefore inhibits colonization, biofilm formation, and EPS production.

By examining the effects of CUR, PAL, and BER on *B. cereus*, PAL and BER on *E. faecalis* and PAL on *E. coli*, it was proven that they have a significant effect on growth kinetics in liquid medium, reduce the maximum growth rate, and slow down bacterial growth. For *E. faecalis* cells incubated with BER, a decrease in the mean value of the maximum growth rate of 53.8 % was observed. Cells incubated for 24 h in medium supplemented with EPI/SrtAI do not develop bacterial clusters at the same rate as Control cells. Both slowing of cell divisions and inhibition of divisions in favor of bacterial elongation (in the case of *B. cereus*) are observed. The smallest increase in volume was observed for *B. cereus* (1.12 for CUR, 1.13 for BER, and 1.16 for PAL), which may be due to the action of the compounds as EPIs and SrtAIs and impaired adhesion to the agar.

Comparing the obtained results, it can be seen that the choice of substance is important, due to its mechanism of action (EPI or SrtAI) and the medium in which the bacteria grow (liquid or solid medium). Knowledge of growth kinetics in a liquid medium may contribute to the design of antimicrobial therapies used to slow down the growth of bacteria developing in systems in which liquid flows, e.g. during the

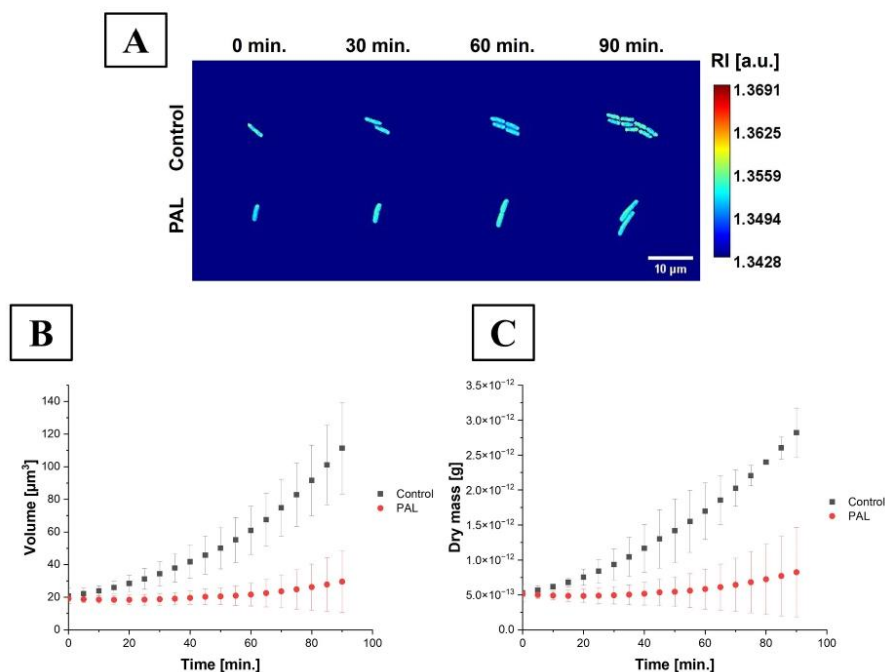


Fig. 9. (A) MIP visualization and quantitative analysis of 3D RI tomograms: (B) Volume, (C) Dry mass of *E. coli* in agar medium. Bacterial cells were incubated with EPI for 24 h. The values represent the means \pm SDs from three independent measurements.

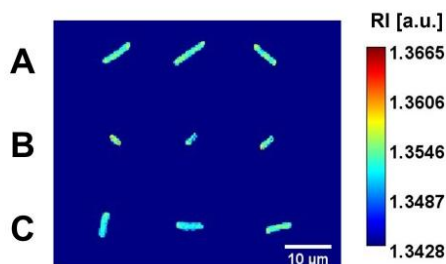


Fig. 10. MIP visualization of 3D RI tomograms of *E. coli* in agar medium: (A) Bacteria in control sample, (B) The smallest cells found in the sample after 24-h incubation with PAL, (C) Bacteria after 24-h incubation with PAL for which long-term measurements were recorded.

disinfection process of endoscopic tubes. Substances exhibiting EPI properties can find application in food, pharmaceuticals, and cosmetics industries. In addition to the previously mentioned re-sensitization of bacteria to antimicrobial substances, they can also contribute to reducing the use of synthetic preservatives and thus creating new clean-label product formulations, which fits perfectly with consumer expectations and current market trends (Chauhan and Rao, 2024). Many of them are safe for food contact and inexpensive. As indicated in this article, bacteria incubated with EPI do not form, or form much more slowly, bacterial clusters, which can develop into a biofilm, which is the most difficult form formed by bacteria to eradicate, as the cells that make up the biofilm can be up to 1 000 times less susceptible to

antimicrobial agents compared to planktonic cells (Otter et al., 2015). This applies to equipment surfaces as well as product packaging. The identification of substances and concentrations that potentially impede biofilm formation can contribute to the creation of special aerosols, coatings, or materials appropriately doped with the indicated substances.

Our study used four bacterial species (*P. mirabilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, and *B. cereus*) and specific concentrations of EPI conditioned on their solubility. Observations were conducted under specific environmental conditions, which, as indicated earlier, also affect the cellular morphology of the bacteria. Changing any of the conditions (temperature, pH, aerobiosis, medium, or solvent) can significantly affect the results obtained (Amaral et al., 2014; Hurton et al., 2025; Martins et al., 2009, 2013; Nguyen et al., 2023). It is therefore necessary to determine the environmental conditions under which a given EPI would be applied and then to carry out measurements with these in mind. This will allow the conditions under which the compound could be used in industrial applications to be simulated, which will translate into its effectiveness. The selection of the compound should be done carefully, ensuring that the best possible results are obtained for the chosen bacterial species. Nevertheless, the research presented here can provide a starting point for the study of other plant-derived compounds and their effects on other bacterial species that were not included in this study.

The observed changes induced by the addition of EPI to the medium and a 24-h incubation showed promising results in the context of using these compounds at concentrations 4-times lower than the MIC to limit bacterial growth. It would be worthwhile to continue measurements taking into account the combination of the indicated EPI/SrTAI and antibiotics or other compounds with antimicrobial properties (also in the context of different formulations) in order to determine whether the

A. Pietrowska et al.

Industrial Crops & Products 233 (2025) 121378

effects obtained meet the objectives of combination therapy, i.e. at least additive effects. It would also be necessary to analyze products in which the indicated compounds would find industrial application, i.e. food packaging, antibacterial coatings, or new cosmetic formulations. Future research should also focus on additional testing methods to determine the detailed mechanisms of action of EPI/SrTAI on bacterial cells belonging to both Gram-negative and Gram-positive bacteria. In addition, it is necessary to emphasize the importance of genetic and molecular studies in the optimization of plant metabolites for antimicrobial applications, allowing a better understanding of the processes involved and contributing to the best possible results (Yang et al., 2019). Sustainability is one of the driving forces of today's economy and a source of real benefits, including resource savings. Overall, our findings indicate that efflux pump inhibitors affect microbial communities, which has implications for potential applications in the cosmetics industry, specialty nutrients, and general human health. Of course, research in detailed studies and specific applications requires financial and human resources, but our report provides a road map.

CRediT authorship contribution statement

Anna Matczuk: Writing – review & editing, Resources, Methodology. **Alina Wieliczko:** Writing – review & editing, Resources. **Agnieszka Ulatowska-Jarza:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Methodology. **Igor Buzalewicz:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization. **Aleksandra Pietrowska:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Mateusz Guźniczak:** Writing – original draft, Software. **Agata Kublicka:** Writing – original draft, Resources.

Funding

The work was partially supported by the project Minigrants for doctoral students of the Wrocław University of Science and Technology (MIC Evaluation, Growth Kinetics Measurements) and was partially funded by National Center of Science (Grant No: 2021/41/B/ST7/04002) (DHT measurements, scholarships for doctoral students).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Adamus-Bialek, W., Zajac, E., Parniewski, P., Kaca, W., 2013. Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3429. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2420-3>.
- Alav, I., Sutton, J.M., Rahman, K.M., 2018. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>.
- Alharthi, S., Ziora, Z.M., Moyle, P.M., 2021. Optimized protocols for assessing libraries of poorly soluble Sortase A inhibitors for antibacterial activity against medically-relevant bacteria, toxicity and enzyme inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* 52, 116527. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116527>.
- Alharthi, S., Popat, A., Ziora, Z.M., Moyle, P.M., 2023. Sortase A inhibitor protein nanoparticle formulations demonstrate antibacterial synergy when combined with antimicrobial peptides. *Molecules* 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28052114/s1>.
- Alshehri, F.M., 2024. Microbiological quality assessment of skin and body care cosmetics by using challenge test. *Saudi J. Biol. Sci.* 31, 103965. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103965>.
- Alves, A., Viveiros, C., Lopes, J., Nogueira, A., Pires, B., Afonso, A.F., Teixeira, C., 2021. Microbiological contamination in different food service units associated with food handling. *Appl. Sci.* 11, 7241. <https://doi.org/10.3390/app11167241>.
- Amaral, L., Martins, A., Spengler, G., Molnar, J., 2014. Efflux pumps of gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Front. Pharmacol.* 4, 70927. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00166/bibtex>.
- Armbruster, C.E., Mobley, H.L.T., 2012. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 743–754. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2890>.
- Armbruster, C.E., Mobley, H.L.T., Pearson, M.M., 2018. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal* 8. <https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0009-2017>.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D., 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 343–346. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-343>.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A.H., Mazoochi, A., Behpour, M., Kashi, F.J., Batooli, H., 2010. Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. *Food Chem. Lett.* 122, 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.009>.
- Bottone, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 382. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>.
- Buzalewicz, I., Kaczorowska, A., Fijałkowski, W., Pietrowska, A., Matczuk, A.K., Podbielska, H., Wieliczko, A., Witkiewicz, W., Jedruchiewicz, N., 2024. Quantifying the dynamics of bacterial biofilm formation on the surface of soft contact lens materials using digital holographic tomography to advance biofilm research. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 2653. <https://doi.org/10.3390/ijms25052653/s1>.
- Cascioferro, S., Totika, M., Schillaci, D., 2014. Sortase A: an ideal target for anti-virulence drug development. *Micro Pathog.* 77, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.007>.
- Cayron, J., Dedieu-Berne, A., Lesterlin, C., 2023. Bacterial filaments recover by successive and accelerated asymmetric divisions that allow rapid post-stress cell proliferation. *Mol. Microbiol.* 119, 237–251. <https://doi.org/10.1111/mmi.15016>.
- Cerceo, E., Deitelzweig, S.B., Sherman, B.M., Amin, A.N., 2016. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Micro Drug Resist* 22, 412–431. <https://doi.org/10.1089/MDR.2015.0220>.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 686. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.686-707.2000>.
- Chakkour, M., Hammoud, Z., Farhat, S., El Roz, A., Ezzeddine, Z., Ghsein, G., 2024. Overview of proteus mirabilis pathogenicity and virulence. Insights into the role of metals. *Front Microbiol* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383618>.
- Chauhan, K., Rao, A., 2024. Clean-label alternatives for food preservation: an emerging trend. *Heliyon* 10, e35815. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.E35815>.
- Flagan, S.F., Leadbetter, J.R., 2006. Utilization of capsaicin and vanillylamine as growth substrates by *Capsicum* (hot pepper)-associated bacteria. *Environ. Microbiol.* 8, 560–565. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00938.x>.
- Friebel, M., Meinke, M., 2006. Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration. *Appl. Opt.* 45, 2838–2842. <https://doi.org/10.1364/AO.45.002838>.
- Govindarajan, D.K., Kandawamy, K., 2022. Virulence factors of uropathogens and their role in host pathogen interactions. *Cell Surf.* 8. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2022.100075>.
- Guo, Y., Cai, S., Gu, G., Guo, Z., Long, Z., 2015. Recent progress in the development of sortase A inhibitors as novel anti-bacterial virulence agents. *RSC Adv.* 5, 49880–49889. <https://doi.org/10.1039/C5RA07568H>.
- Hulankova, R., 2022. The influence of liquid medium choice in determination of minimum inhibitory concentration of essential oils against pathogenic bacteria. *Antibiotics* 11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020150>.
- Hurton, D., Hleba, L., Petrová, J., Laho, M., Koren, J., Liptáková, A., 2025. Effect of temperature on the activity of efflux pumps in selected species of human opportunistic bacterial pathogens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 120, e240162. <https://doi.org/10.1590/0074-02760240162>.
- Kalia, N.P., Mahajan, P., Mehra, R., Nargotra, A., Sharma, J.P., Koul, S., Khan, I.A., 2012. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2401–2408. <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., Fazly Bazzaz, B.S., 2019. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist Infect. Control* 8, 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>.
- Khan, F., Jeong, G.J., Tabassum, N., Mishra, A., Kim, Y.M., 2022. Filamentous morphology of bacterial pathogens: regulatory factors and control strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 5835–5862. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12128-1>.
- Kim, H.W., Seok, Y.S., Cho, T.J., Rhee, M.S., 2020. Risk factors influencing contamination of customized cosmetics made on-the-spot: evidence from the national pilot project for public health. *Sci. Rep.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57978-9>.

- Kowalska-Krochmal, B., Dudek-Wicher, R., 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens* 10, 1–21. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020165>.
- Llor, C., Bjerrum, L., 2014. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther. Adv. Drug Saf.* 5, 229. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>.
- Martins, A., Spengler, G., Rodrigues, L., Viveiros, M., Ramos, J., Martins, M., Couto, I., Fanning, S., Pagès, J.M., Bolla, J.M., Molnar, J., Amaral, L., 2009. pH modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. *PLoS One* 4, e6656. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006656>.
- Martins, M., McCusker, M.P., Viveiros, M., Couto, I., Fanning, S., Pagès, J.-M., Amaral, L., 2013. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. *Open Microbiol. J.* 7, 72. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010072>.
- Matzneller, P., Manafi, M., Zeitlinger, M., 2011. Antimicrobial effect of statins: organic solvents might falsify microbiological testing results. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 49, 666–671. <https://doi.org/10.5414/CP201581>.
- Miller, W.R., Murray, B.E., Rice, L.B., Arias, C.A., 2016. Vancomycin-resistant enterococci: therapeutic challenges in the 21st century. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30, 415–439. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.006>.
- Nascimento, P.L.A., Nascimento, T.C.E.S., Ramos, N.S.M., Silva, G.R., Gomes, J.E.G., Falcão, R.E.A., Moreira, K.A., Porto, A.L.F., Silva, T.M.S., 2014. Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of capsicum frutescens (Pimenta Malagueta). *Molecules* 19, 5434–5447. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19045434>.
- Negi, N., Prakash, P., Gupta, M.L., Mohapatra, T.M., 2014. Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Diagn. Res.* 8, DC04-DC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8329.4965>.
- Nguyen, T.H.T., Nguyen, H.D., Le, M.H., Nguyen, T.T.H., Nguyen, T.D., Nguyen, D.L., Nguyen, Q.H., Nguyen, T.K.O., Michael, S., Dijoux-Franca, M.G., Pham, H.N., 2023. Efflux pump inhibitors in controlling antibiotic resistance: outlook under a heavy metal contamination context. *Molecules* 28, 2912. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28072912>.
- Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., Hayashi-Nishino, M., 2021. Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Front. Microbiol.* 12, 737288. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.737288/BIBTEX>.
- Nitulescu, G., Nicoreescu, I.M., Olaru, O.T., Ungurianu, A., Mihai, D.P., Zanfirescu, A., Nitulescu, G.M., Margina, D., 2017. Molecular docking and screening studies of new natural sirtase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2217. <https://doi.org/10.3390/IJMS18102217>.
- Nusrat, N., Ahmad Zahra, M., Ahmed, A., Haque, F., 2023. Assessment of potential pathogenic bacterial load and multidrug resistance in locally manufactured cosmetics commonly used in Dhaka metropolis. *Sci. Rep.* 13, 7787. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34782-9>.
- Oh, J., Oh, J., Ryu, J.S., Lee, M., Lee, M., Jung, J., Jung, J., Han, S., Han, S., Chung, H.J., Chung, H.J., Chung, H.J., Park, Y., Park, Y., Park, Y., 2020. Three-dimensional label-free observation of individual bacteria upon antibiotic treatment using optical diffraction tomography. *Biomed. Opt. Express* 11, 1257–1267. <https://doi.org/10.1364/BOE.377740>.
- Otter, J.A., Vickery, K., Walker, J.T., deLancey Pulcini, E., Stoodley, P., Goldenberg, S.D., Salkeld, J.A.G., Chiewins, J., Yezi, S., Edgeworth, J.D., 2015. Surface-attached cells, biofilms and biofilm susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J. Hosp. Infect.* 89, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008>.
- Özgelik, B., Kartal, M., Orhan, I., 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* 49, 396–402. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.519390>.
- Pajkos, A., Vickery, K., Cossart, Y., 2004. Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *J. Hosp. Infect.* 58, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.06.023>.
- Parvin, F., Hu, H., Whiteley, G.S., Glasbey, T., Vickery, K., 2019. Difficulty in removing biofilm from dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* 103, 465–467. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.07.005>.
- Paul, D., Chawla, M., Ahrodia, T., Narendrakumar, L., Das, B., 2023. Antibiotic potentiation as a promising strategy to combat macrolide resistance in bacterial pathogens. *Antibiotics* 12, 1715. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12121715>.
- Pedreira, A., Vázquez, J.A., García, M.R., 2022. Kinetics of bacterial adaptation, growth, and death at didecyldimethylammonium chloride sub-MIC concentrations. *Front. Microbiol.* 13, 758237. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.758237/BIBTEX>.
- Peng, C., Xu, W., Wang, Xipan, Meng, F., Zhao, Y., Wang, Q., Wang, Xinkun, Lodi, R.S., Dong, X., Zhu, C., Peng, L., 2025. Alginate oligosaccharides trigger multiple defense responses in tobacco and induce resistance to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 16, 1506873. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2025.1506873/BIBTEX>.
- Periferakis, A.T., Periferakis, A., Periferakis, K., Caruntu, A., Badarau, I.A., Savulescu-Fiedler, I., Scheau, C., Caruntu, C., 2023. Antimicrobial properties of capsaicin: available data and future research perspectives. *Nutrients* 15. <https://doi.org/10.3390/NU15194097>.
- Prasch, S., Bucar, F., 2015. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. *Phytochem. Rev.* 14, 961–974. <https://doi.org/10.1007/S11101-015-9436-Y>.
- Prasch, S., Duran, A.G., Chinchilla, N., Molinillo, J.M.G., Macías, F.A., Bucar, F., 2019. Resistance modulatory and efflux-inhibitory activities of capsaicinoids and capsinoids. *Bioorg. Chem.* 82, 378–384. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2018.10.062>.
- Rahnama, H., Azari, R., Yousefi, M.H., Berizi, E., Mazloomi, S.M., Hosseinzadeh, S., Derakhshan, Z., Ferrante, M., Conti, G.O., 2023. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of *Bacillus cereus* in foods. *Food Control* 143, 109250. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2022.109250>.
- Rajagopal, M., Walker, S., 2017. Envelope structures of gram-positive bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 404, 1. https://doi.org/10.1007/82_2015_5021.
- Said, M., Tirthani, E., Lesho, E., 2024. Enterococcus infections. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/>.
- Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321–324. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2007.01.006>.
- Serbanescu, D., Ojick, N., Banerjee, S., 2021. Cellular resource allocation strategies for cell size and shape control in bacteria. *FEBS J.* 289, 7891–7906. <https://doi.org/10.1111/febs.16234>.
- Setiawan, F., Wahjuningrum, D.A., Yudianto, A., Radhianto, E., Sunarjani, J., Bhardwaj, A., 2021. The inhibition effect of capsaicin extract against *Staphylococcus aureus*: an in vitro experimental study. *J. Int. Oral. Health* 13, 393–399. <https://doi.org/10.4103/JIOH.JIOH-45-21>.
- Shan, C., Dong, K., Wen, D., Cui, Z., Cao, J., 2025. A review of m6A modification in plant development and potential quality improvement. *Int. J. Biol. Macromol.* 308, 142597. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2025.142597>.
- Stavri, M., Piddock, L.J.V., Gibbons, S., 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1247–1260. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL460>.
- Sunarti, L.S., 2024. Bacterial contamination in food: sources, risks, and prevention strategies. *Int. J. Pathog. Res.* 13, 90–100. <https://doi.org/10.9734/IJPR/2024/V13I6324>.
- Tang, K.W.K., Millar, B.C., Moore, J.E., 2023. Antimicrobial resistance (AMR). *Br. J. Biomed. Sci.* 80, 11387. <https://doi.org/10.3389/BJBS.2023.11387/BIBTEX>.
- Ubeyitogullari, A., Ciftci, O.N., 2019. A novel and green nanoparticle formation approach to forming low-crystallinity curcumin nanoparticles to improve curcumin's bioaccessibility. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55619-4>.
- Van de Vel, E., Sumpers, I., Raes, K., 2019. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 357–378. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1371112>.
- Walker, M.M., Roberts, J.A., Rogers, B.A., Harris, P.N.A., Sime, F.B., 2022. Current and emerging treatment options for multidrug resistant *Escherichia coli* urosepsis: a review. *Antibiotics* 11. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11121821>.
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., Terentjev, E.M., 2015. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci. Rep.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep15159>.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- Yang, X., Xia, X., Zhang, Z., Nong, B., Zeng, Y., Wu, Y., Xiong, F., Zhang, Y., Liang, H., Fan, Y., Dai, G., Deng, G., Li, D., 2019. Identification of anthocyanin biosynthesis genes in rice pericarp using PCAMP. *Plant Biotechnol. J.* 17, 1700–1702. <https://doi.org/10.1111/PBI.13133;WGROUP=STRING-PUBLICATION>.
- Yu, S., Yu, P., Wang, J., Li, C., Guo, H., Liu, C., Kong, L., Yu, L., Wu, S., Lei, T., Chen, M., Zeng, H., Pang, R., Zhang, Y., Wei, X., Zhang, J., Wu, Q., Ding, Y., 2020. A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China. *Front. Microbiol.* 10, 503970. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.03043/BIBTEX>.
- Yuan, A., Kumar, S.D., Wang, Haotian, Wang, S., Impa, S., Wang, Hao, Guo, J., Wang, Y., Yang, Q., Liu, X.J.A., Jagadish SV, K., Shao, R., 2024. Dynamic interplay among soil nutrients, rhizosphere metabolites, and microbes shape drought and heat stress responses in summer maize. *Soil Biol. Biochem.* 191, 109357. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2024.109357>.
- Zavišić, G., Ristić, S., Petricević, S., Janković, D., Petković, B., 2024. Microbial contamination of food: probiotics and postbiotics as potential biopreservatives. *Foods* 13, 2487. <https://doi.org/10.3390/FOODS13162487>.

3.3. Publikacja 3 – *Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against Bacillus cereus and Escherichia coli*

Trzecia publikacja z cyklu miała na celu zweryfikowanie hipotezy **H3**, że zastosowanie wybranych inhibitorów pomp efflux (EPIs) zwiększa wewnątrzkomórkową akumulację fotouczulacza.

Badania dotyczyły analizy wpływu EPIs na skuteczność aPDT opartej na zastosowaniu PS Chlorin e6, wykorzystując dwa gatunki bakterii *Bacillus cereus* (Gram-dodatnia) oraz *Escherichia coli* (Gram-ujemna), aby uwzględnić wpływ budowy strukturalnej ich ścian komórkowych. W badaniach wykorzystano następujące EPI: kapsaicyna, piperyna, kurkumina, berberyna, palmatyna i kumaryna. Podjęcie tego zagadnienia było uzasadnione licznymi doniesieniami literaturowymi wskazującymi, że aktywność pomp efflux stanowi istotną barierę ograniczającą skuteczność terapii fotodynamicznej, szczególnie poprzez aktywne usuwanie PSs z wnętrza komórek bakteryjnych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (da Cunha et al., 2025; Sheng et al., 2022; Zhou et al., 2025). W konsekwencji prowadzi to do obniżenia lokalnej generacji ROS oraz wymusza stosowanie wyższych stężeń PS, co może zwiększać ryzyko działań niepożądanych i obniżać selektywność terapii.

Badania przeprowadziłam na dwóch gatunkach bakterii *Bacillus cereus* oraz *Escherichia coli*. Dobór gatunków bakterii uwarunkowany był ekspresją pomp efflux z określonych rodzin: *B. cereus* wykazuje ekspresję ponad 50 pomp z rodziny MFS, 28-30 z rodziny ABC oraz 3-5 pomp z rodziny RND, MATE oraz SMR (Hassan et al., 2017), w przypadku *E. coli* scharakteryzowano pompy efflux z rodzin RND oraz MFS (Chetri et al., 2019; Chowdhury et al., 2019; Ciusa et al., 2022). Przygotowanie próbek mikrobiologicznych oraz roztworów PS i EPI zostało nieznacznie zmodyfikowane w stosunku do **Publikacji 1**, tj. jako rozpuszczalnik wykorzystany został PBS (z ang. *Phosphate Buffered Saline*, sól fizjologiczna buforowana fosforanem), ponadto do sporządzenia roztworów PS oraz EPIs zastosowano dodatek DMSO (1% v/v DMSO w PBS). Zmiana pozwoliła na ograniczenie agregacji PS i EPI oraz zwiększyła ich rozpuszczalność w roztworze.

Przeprowadzone zostały pomiary właściwości absorpcyjno-emisyjnych EPIs z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-VIS. Poszerzyłam badania o testy MIC (wykonane zgodnie z procedurą opisaną w **Publikacji 2**) oraz testy żywotności z wykorzystaniem resazuryny, uprzednio testując kilka różnych protokołów. Pozwoliły one potwierdzić, że EPIs w stężeniach zastosowanych w badaniach nie hamują wzrostu bakterii po całonocnej inkubacji, co oznacza,

że nie są toksyczne w wybranych przeze mnie stężeniach. Poza wizualną oceną zmiany zabarwienia (z niebieskiej resazuryny na różową rezorufinę), wykonałam pomiary absorbancji z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M Nano+ (Tecan). Stężenia roztworów EPIs dobrałam następująco: kapsaicyna, kumaryna i piperyna 25 µg/ml, kurkumina 50 µg/ml, berberyna i palmatyna 250 µg/ml.

Do zbadania akumulacji PS we wnętrzu komórek bakteryjnych inkubowanych z EPI oraz w jego nieobecności wykorzystałam fluorescencyjny mikroskop konfokalny oraz cyfrowy holotomograf. Procedura pomiarowa opiera się na wcześniej zaproponowanej przez mnie procedurze opisaney w **Publikacji 1**. Obrazy z mikroskopu konfokalnego umożliwiły ocenę poziomu akumulacji Chlorin e6 wewnątrz komórek bakteryjnych w obecności poszczególnych EPIs. Przeprowadziłam również analizę ilościową zintegrowanego natężenia fluorescencji (całkowita ilość emitowanej fluorescencji w odniesieniu do powierzchni komórki). Stwierdziłam, że akumulacja PS zachodzi skuteczniej w bakteriach Gram-dodatnich, co przejawia się wyższą wartością natężenia fluorescencji. Dla bakterii Gram-ujemnych wartości mieszczą się w zakresie od ok. 20 a.u./µm² do ok. 140 a.u./µm², natomiast w przypadku bakterii Gram-dodatnich osiągają wartości bliskie 220 a.u./µm². Są za to odpowiedzialne: grubsza warstwa porowatego peptydoglikanu i brak dodatkowej błony zewnętrznej (Rajagopal & Walker, 2017). W przypadku *B. cereus* najwyższe wartości natężenia fluorescencji uzyskano dla bakterii inkubowanych z piperyną i Chlorin e6. Wartości wyższe niż dla grupy kontrolnej (z Chlorin e6) uzyskano również dla kapsaicyny i Chlorin e6 oraz kumaryny i Chlorin e6, ale różnice te nie są statystycznie istotne, co potwierdza test Kruskala-Wallisa wraz testem post-hoc (Dunn). Uzyskana wartość *p* była wyższa (0,49 dla kapsaicyny i Chlorin e6 oraz 1 dla kumaryny i Chlorin e6) od przyjętego poziomu istotności (0,05). W przypadku bakterii *E. coli* dodanie berberyny i palmatyny najskuteczniej sprzyjało gromadzeniu się Chlorin e6 w komórkach. Wynik ten zinterpretowałam jako dowód zwiększonej akumulacji PS wewnątrz komórek bakteryjnych w wyniku ograniczenia jego aktywnego usuwania przez pompy efflux.

Kluczowym elementem analizy ilościowej była DHT, którą zastosowałam do trójwymiarowego, bezznacznikowego obrazowania żywych komórek oraz do ilościowej analizy zmian RI komórek. Parametr ten jest bezpośrednio powiązany z gęstością suchej masy komórki oraz rozkładem substancji wewnątrz komórki, dzięki czemu umożliwia pośrednią ocenę zarówno akumulacji PS i/lub EPI, jak i zmian strukturalnych wywołanych aPDT (Oh et al., 2020; Pietrowska et al., 2022). W tym celu wykorzystałam 20 tomogramów z każdej grupy. Zarejestrowane tomogramy przeanalizowałam w oprogramowaniu ImageJ, wykorzystując algorytm MIP (z ang. *Maximum Intensity Projection*) i proces segmentacji wraz z maską konturową. We wszystkich

analizowanych grupach, wyłączając grupę kontrolną, zaobserwowałam wzrost wartości RI, który wywołany był lokalnymi zmianami gęstości, zależnymi od stopnia akumulacji PS. Największy wzrost wartości RI zaobserwowałam dla kombinacji piperyny z Chlorin e6 w przypadku *B. cereus* oraz kombinacji palmatyny i Chlorin e6 w przypadku *E. coli*, co wskazuje na najefektywniejszą penetrację komórek przez zaproponowany zestaw PS+EPI dla poszczególnych gatunków bakterii.

Analiza tomogramów, zarejestrowanych 48 godz. po rozpoczęciu eksperymentu, pozwoliła również na pozyskanie danych na temat efektywności aPDT. W przypadku próbek bez PS i niepoddanych naświetlaniu wartość RI maleje w czasie, co spowodowane może być brakiem dostępu do substancji odżywczych, natomiast próbki nienaświetlane, ale inkubowane z PS charakteryzują się wzrostem RI. W przypadku naświetlanych próbek inkubowanych z PS zaobserwowałam spadek RI, co mogło być wywołane przez ich fotoinaktywację i zachodzące w jej wyniku zmiany w strukturze komórki (Buzalewicz, Ulatowska-Jarża, et al., 2021). Największą różnicę w wartości RI przed naświetlaniem oraz 24 godz. po nim zaobserwowano w przypadku piperyny i Chlorin e6 (*B. cereus*) oraz berberyny i Chlorin e6 (*E. coli*), co sugerować może, że w przypadku połączenia dwóch substancji proces fotoinaktywacji przebiegł najefektywniej. Korzystając z wyznaczonych wartości RI komórek na poszczególnych tomogramach, obliczyłam kolejny parametr, jakim jest gęstość suchej masy. Fotoinaktywacja bakterii ma wpływ na skład struktur komórkowych, gdyż w jej wyniku zniszczeniu ulegają m.in. ściana komórkowa i rybosomy. Ostatecznie zmianie ulega również gęstość suchej masy komórek (Pietrowska et al., 2022). Spadek wartości tego parametru zaobserwowałam w przypadku wszystkich grup poddanych naświetlaniu po dodaniu PS. Analiza porównawcza skuteczności terapii wykazała, że zastosowanie naturalnych EPIs prowadziło do znaczącego wzrostu efektywności aPDT – zarówno w modelu bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus cereus*), jak i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*).

Bazując na zmianach gęstości suchej masy wyznaczyłam efektywność terapii w porównaniu do monoterapii z wykorzystaniem samego Chlorin e6: w przypadku *B. cereus* względna zmiana gęstości suchej masy wyniosła 273,9% (piperyna i Chlorin e6), 234,77% (berberyna i Chlorin e6) oraz 211,58% (palmatyna i Chlorin e6), w przypadku *E. coli* najwyższa wartość – 227,72% zaobserwowana została dla mieszanki berberyny i Chlorin e6, kolejno dla kumaryny i Chlorin e6 (172,77%) oraz palmatyny i Chlorin e6 (148,02%). Zaobserwowany wzrost skuteczności, sięgający kilkukrotnego zwiększenia efektu terapeutycznego w porównaniu z monoterapią Chlorin e6, jednoznacznie potwierdził, że zwiększona wewnątrzkomórkowa akumulacja PS przekłada się bezpośrednio na intensyfikację działania fotodynamicznego. Co istotne, uzyskane wyniki wskazują, że dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych EPIs możliwe jest osiągnięcie wysokiej skuteczności terapeutycznej przy potencjalnie niższych stężeniach PS w przestrzeni

zewnątrzkomórkowej, co stanowi istotny krok w kierunku ograniczenia działań niepożądanych terapii fotodynamicznej. Wówczas istnieje niewielkie prawdopodobieństwo uszkodzenia pobliskich komórek.

Znaczące zredukowanie gęstości suchej masy podkreśla istotną rolę EPI w przeciwdziałaniu mechanizmom oporności bakterii. Poprzez hamowanie pomp efflux uniemożliwiają usuwanie substancji antybakteryjnych z wnętrza komórek bakteryjnych, co prowadzi do zwiększenia ich stężenia wewnątrzkomórkowego i przywrócenia skuteczności już istniejących środków terapeutycznych. Uzyskane wyniki wskazują, że EPI mogą pełnić funkcję wartościowych adiuwantów w profilaktyce oraz zwalczaniu infekcji wywołanych przez bakterie wielolekooporne. Ponadto badania potwierdzają potencjał fotoinaktywacji komórek bakteryjnych przy użyciu proponowanych kombinacji substancji w połączeniu z naświetlaniem aPDT. Otrzymane rezultaty stanowią solidną podstawę do dalszych prac nad opracowywaniem nowych kombinacji związków pochodzenia roślinnego o działaniu przeciwbakteryjnym.

Innowacyjność zaproponowanego rozwiązania polega na połączeniu naturalnych EPI z terapią fotodynamiczną zarówno w przypadku bakterii Gram-ujemnej, jak i Gram-dodatniej, oraz na wykorzystaniu techniki ilościowego obrazowania fazy jako narzędzia do oceny mechanizmów leżących u podstaw zwiększonej skuteczności terapii. W przeciwieństwie do większości dotychczasowych doniesień, które koncentrują się głównie na pomiarach przeżywalności populacyjnej, przeprowadzone przeze mnie badania umożliwiły bezpośrednią analizę zmian wewnątrzkomórkowych na poziomie pojedynczych komórek, dostarczając nowych dowodów potwierdzających rolę pomp efflux w regulacji akumulacji PSs. Uzyskane wyniki potwierdzają spełnienie postawionej hipotezy badawczej **H3** i wskazują, że celowane wykorzystanie EPIs stanowi obiecującą strategię zwiększania efektywności i selektywności terapii fotodynamicznej poprzez zwiększenie akumulacji PS, wpisując się w aktualne, światowe trendy badań nad alternatywnymi metodami zwalczania zakażeń bakteryjnych.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*

Aleksandra Talarczyk^{a,*}, Agata Kublicka^b, Anna Matczuk^b, Alina Wieliczko^c, Agnieszka Ulatowska-Jarza^a, Igor Buzalewicz^a

^a BioQuanty Group, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Science and Technology, 27 Wybrzeże S. Wyspiańskiego St., 50-370, Wrocław, Poland

^b Department of Pathology, Division of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 31 C.K. Norwida St., 51-375, Wrocław, Poland

^c Department of Epizootology and Veterinary Administration with Clinic of Infectious Diseases, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 45 Grunwaldzki Square, 50 366, Wrocław, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Antimicrobial photodynamic inactivation
Combined antibacterial treatment
Efflux pump inhibitors (EPIs)
Sortase A inhibitors (SrtAIs)
Digital holotomography
Bacterial resistance

ABSTRACT

Antimicrobial resistance: especially via efflux pump-mediated multidrug resistance is a major factor limiting antibacterial therapy efficacy. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a non-antibiotic strategy that overcomes resistance through generation of reactive oxygen species. Plant-derived compounds exhibit efflux pump inhibitory activity and potential photosensitizing capabilities. This study evaluated the use of plant-derived efflux pump inhibitors (EPIs): berberine, capsaicin, coumarin 6, curcumin, palmatine, and piperine in combination with Chlorin e6 and aPDT against *Bacillus cereus* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative). The aim was to enhance Chlorin e6 accumulation and reduce bacterial dry mass density. Both qualitative and quantitative methods were used in the study. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of EPIs were determined to guide treatment concentrations. A modified resazurin assay assessed bacterial viability after 24-h incubation with EPIs. Spectroscopic properties of all compounds were recorded using UV-VIS spectroscopy. Digital holotomography (DHT) was applied to monitor changes in refractive index (RI) of bacterial cells induced by incubation and treatment, and results were validated using confocal fluorescence microscopy. Changes in RI values indicated structural and compositional changes in the bacteria. Naturally derived EPIs effectively potentiated aPDT by promoting photosensitizer uptake and induced a measurable reduction in dry mass density. Treatment efficacy using combination therapy for *B.cereus* and *E.coli* improved 273.90 % and 227.72 %, respectively. These findings suggest naturally derived EPIs effectively potentiate Chlorin e6-mediated aPDT and improve bactericidal capacity against bacteria. The study offers mechanistic insight into photodynamic enhancement via plant-based inhibitors and supports potential applications in clinical antimicrobial therapy, food safety, and industrial decontamination.

1. Introduction

The presence of antibiotic-resistant bacteria and the infections they cause is currently a major threat to public health [1,2]. The microbiological safety of food is also an important aspect of the industry. Drug-resistant bacteria are particularly dangerous, as in their case the treatment applied is often not effective [3]. Therapeutic strategies are

therefore being sought to overcome this barrier. A promising alternative is antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). aPDT is a treatment modality based on the synergistic action of three components: a photosensitizer (PS), light of an appropriate wavelength, and molecular oxygen [4]. Upon light activation, the PS transitions to an excited state and transfers energy to oxygen, generating reactive oxygen species (ROS), which cause damage to cellular components and ultimately lead

* Corresponding author.

E-mail addresses: aleksandra.talarczyk@pwr.edu.pl (A. Talarczyk), agata.kublicka@upwr.edu.pl (A. Kublicka), anna.matczuk@upwr.edu.pl (A. Matczuk), alina.wieliczko@upwr.edu.pl (A. Wieliczko), agnieszka.ulatowska-jarza@pwr.edu.pl (A. Ulatowska-Jarza), igor.buzalewicz@pwr.edu.pl (I. Buzalewicz).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.153214>

Received 8 October 2025; Received in revised form 12 December 2025; Accepted 25 December 2025

Available online 26 December 2025

0006-291X/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

to cell death [5]. The internalization of the photosensitizer into the cell is of crucial importance, as ROS possess a very short diffusion radius and a limited lifetime [6–9]. Consequently, they can affect only those cellular structures located in close proximity to their site of generation. Therefore, the efficacy of aPDT largely depends on the localization and intracellular accumulation of the PS within specific organelles, which determines both the mechanism and the overall effectiveness of target cell destruction. Its effectiveness depends on the intracellular concentration of the photosensitizer, so strategies to increase the uptake of the PS by cells are also being sought [10]. Importantly, bacteria do not develop resistance mechanisms against aPDT, but it has been indicated that, as a result of oxidative stress, the survivors can activate efflux pumps and remove accumulated PS from inside the cells, significantly affecting the effectiveness of the therapy [11]. Our approach uses a combination therapy, one component of which is plant derived efflux pump inhibitor (EPI), which counteract the removal of accumulated PS to achieve improved photoinactivation effects.

Combination treatment, which is an enhancement of current bacterial treatments [12], may contribute to increasing treatment efficacy. Combined photodynamic therapy is constantly evolving and one of its improvements is combining photodynamic therapy with other therapies/substances to increase its effectiveness [13], prevent development of resistance [14,15], and eliminate the side effects of the treatment. This approach allows to obtain an additive or synergistic effect compared with the effects of each therapy separately. New therapeutic approaches are being developed, with particular emphasis on substances of natural origin [16,17].

The main reason for bacterial resistance to the treatment is the activity of efflux pumps [18]. Efflux pumps are bacterial transmembrane proteins that actively transport antimicrobials and other toxic substances from inside the cell to the surrounding environment [19]. If these efflux channels are blocked or inhibited, an increase in drug concentration can be achieved in a bacterial cell with an optimal drug dose [20]. The *in vivo* role of efflux pumps is considered highly complex [21], as they significantly contribute to bacterial physiology, metabolism, and pathogenicity [22,23]. The use of the EPI of natural origin in combined antimicrobial therapies may lead to an increase in their effectiveness. Many studies indicate that substances of natural origin can play the role of EPIs, contributing to the enhancement effect of the applied treatment and to re-sensitize bacteria to substances to which they were resistant [24–28].

A variety of EPIs are available, both synthetic and natural. Naturally origin EPI show little or no toxicity to eukaryotic cells. Their undoubted advantages are safety, low cost, and availability [16,22]. This allows their wide application in antibacterial treatment [29]. In our research we used two bacteria species as model organisms: Gram-positive bacteria *Bacillus cereus* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. *B. cereus* expresses over 50 pumps from the MFS family, 28–30 from the ABC family and 3–5 pumps from the RND, MATE, and SMR families [30]. In the case of *E. coli*, efflux pumps from the RND and MFS families have been characterized [31–33]. The reasons discussed above were the main motivation for the proposed research, which focuses on examining the effect of natural origin EPIs (berberine [34], capsaicin [35], coumarin [36], curcumin [24], palmatine [26], piperine [37]) on effectiveness of combined photodynamic therapy. Several of the substances indicated as EPIs (palmatine, berberine, curcumin) are also Sortase A inhibitors (SrtAI) [38–41]. This enzyme is responsible for anchoring proteins to the cell wall of Gram-positive bacteria. Proteins that are attached by Sortase A (SrtA) play an important role in cell adhesion and biofilm formation [42]. It was also indicated that, due to its properties, SrtA is an ideal target for the design of new drugs and therapies [40]. Thus, it can be concluded that, in the case of Gram-positive bacteria, the compounds used may utilize two mechanisms to enhance the efficacy of antimicrobial treatment.

The potential of such combination therapy has been recognized [43], but few studies have combined natural EPIs with aPDT to enhance PS

accumulation and bactericidal activity in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The present study addresses this gap by evaluating the effect of six plant-derived EPIs in combination with Chlorin e6-mediated aPDT against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. The effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria were compared using the same set of compounds, which allowed differences in the mechanisms of PS accumulation and cellular response to be demonstrated. In this study, we used a combination of aPDT with an EPI of natural origin, which at low concentrations are not toxic to bacteria, but can affect the efficiency of PS accumulation inside the bacterial cell or cause changes in their growth. The aim of this research was to demonstrate that a properly selected EPI contributes to more effective photoinactivation of bacteria. Both quantitative and qualitative methods were used in the presented research. It was confirmed using a modified resazurin assay that the compounds at concentrations significantly lower than the minimum inhibitory concentration (MIC) did not significantly inhibit bacterial growth, moreover, the effect on the efficiency of PS and EPI accumulation within the bacteria was investigated using digital holotomography (DHT). The feasibility of using this technique to assess the accumulation of compounds inside cells was confirmed in Refs. [44–46]. In addition, the effect of aPDT on the refractive index (RI) of bacteria was quantitatively analyzed and the effectiveness of photoinactivation was assessed following the application of combinations of selected compounds. The use of combined therapy could bring significant progress in antimicrobial therapy in the treatment of bacterial infections, disinfection of medical surfaces and ensuring the microbiological safety of food, which could find application in the food processing environment. This could be used to increase protection levels, particularly in countries with poor infrastructure.

2. Materials and methods

For measurements made in several repetitions, the following notation was used:

$$n = X \times Y \quad (1)$$

n is the number of obtained measurements, X is the number of prepared samples, Y is the number of measurements made per sample.

2.1. Bacterial strains and bacterial suspension preparation

Two reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 as Gram-negative bacteria and *Bacillus cereus* PCM 1948 as Gram-positive bacteria, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and Polish Collection of Microorganisms (PCM), respectively, were used in presented research. These strains are frequently referenced in publications as examples of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

For MIC evaluation overnight cultures of bacterial strains were prepared. The optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was adjusted to 0.6, and serial 10-fold (10^{-1} – 10^{-4}) dilutions were subsequently prepared in Tryptic Soy Broth (TSB) (Biomaxima, Lublin, Poland).

For the other tests bacteria was inoculated in tryptic soy agar (TSA) medium at 37 °C and its density was determined using a densitometer (DEN-1B, Biosan, Poland) based on the MacFarland scale (McF). A suspension of 0.5 McF, corresponding to approximately 1.5×10^8 bacterial cells per ml, was prepared. The bacterial culture was then suspended in phosphate buffered saline (PBS). For cell culture, the glass μ -dish (29 mm dish with 14 mm bottom well, Cellvis, Mountain View, CA, USA), was used. The refractive index of PBS suspension was equal to 1.335 and was measured with the Abbe refractometer (NAR-2T, minimum scale: 0.001, ATAGO Co. Ltd., Tokyo, Japan) at 20 °C.

2.2. Photosensitizer and efflux pump inhibitors

Chlorin e6 (Ce6), (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA),

A. Talarczyk et al.

Biochemical and Biophysical Research Communications 797 (2026) 153214

was used as a PS. Stock solutions of 0.84×10^{-3} M PS were prepared by dissolving the PS in 1 % v/v DMSO in PBS. Berberine Hydrochloride (BER), Capsaicin (CAP), Coumarin 6 (COU), Curcumin (CUR), Palmatine (PAL), Piperine (PIP) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) were used in the experiment as EPIs. For CAP, COU and PIP, a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used, for CUR the concentration was 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, while for BER and PAL 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. It should be noted that EPI concentrations do not exceed 0.5 MIC. As shown in previous studies [47] concentrations 4 times lower than the MIC do not cause any visible inhibition of bacterial growth in the liquid medium, however, they slow down the growth of the culture. For the current study, the final concentration of EPI in the sample did not exceed 0.25 MIC.

In this study, sixteen groups were examined for each bacterial species: PS-, Ce6, and EPI + Ce6 (BER + Ce6, CAP + Ce6, COU + Ce6, CUR + Ce6, PAL + Ce6, PIP + Ce6), for each combination there were photoexcited ($h\nu+$) and dark-control ($h\nu-$) samples. Four samples were prepared for each group.

For samples with the PS, 100 μl of its solution was added. When using a mixture of the PS and EPI, 100 μl of each (Ce6 and EPI) was added. All samples were then incubated for 24 h at 37 °C. Before imaging with DHT and confocal microscopy, each sample was rinsed twice with PBS to remove any unbound PS from the medium. The interaction between the PS and the cells was assessed. Following this assessment, a part of the samples was exposed to laser light (655 nm – the wavelength used for aPDT). Subsequently, all samples were stored at 4 °C in a refrigerator for 24 h, rinsed again, and then imaged.

2.3. MIC evaluation

Determination of MIC is necessary to find out the concentration of the substance that can be used in the combination treatment. The MICs of EPIs were determined using the protocol described in Ref. [47].

2.4. Resazurin assay

Following the use of significantly lower concentrations of EPI compared with the MIC values obtained, it was decided to test the viability of the bacteria after incubation to determine whether the nontoxicity assumption was met. The resazurin assay is based on the reduction of the oxidized blue dye by living cells to a pink fluorescent resorufin product. Resorufin exhibits an absorption peak at 570 nm and an excitation peak at 530–560 (emission 590 nm) which can be used to quantify the number of viable bacteria in a sample. This viability test is commonly used to determine antibacterial activity [48–50]. Resazurin sodium salt (R7017, manufacturer Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used in this research. In the resazurin cell viability method, 100 μl of the test samples and controls were collected into 96 well plates and 20 μl of resazurin (0.15 mg/ml) were added to each well. The samples were incubated at 37 °C in the dark for 24 h. The ability of bacteria to reduce resazurin into resorufin was measured by plate reader (Infinite M Nano+, Tecan, Switzerland) in absorbance mode (570 nm). Additional control absorbance measurements were performed for each compound under identical conditions as in the resazurin test, but without the presence of cells and resazurin. All absorbance readings were corrected for the background characteristic of a given compound, which eliminated the possible influence of self-absorption. Three independent experiments were performed for each group ($n = 24$ (3×8)).

2.5. Spectrophotometric measurements

To examine the absorption and emission spectra ($n = 10$ (1×10)) of the tested PS and EPI, spectroscopic measurements were performed using the AVA-Spec 3648 spectrophotometer (spectral resolution 2 nm, Avantes Inc., Apeldoorn, The Netherlands). The light source was a deuterium-halogen lamp (Avalight-DH-S-BAL, Avantes Inc., Apeldoorn, The Netherlands). A continuous-wave semiconductor laser ($\lambda = 405$ nm,

TOPGaN, Warsaw, Poland) was used as the excitation source for luminescence measurements. Standard UV cuvettes were used for spectroscopic measurements.

2.6. Irradiation source for bacteria photoinactivation

The photoexcitation setup consisted of a laser ($\lambda = 655$ nm) connected to an optical fiber system (FC-655nm-1W-15070826, New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., Changchun, China) with an adjustable power control unit. The parameters for bacteria photoinactivation were chosen experimentally, as previously described in Ref. [44]. The laser emitted an energy density of 12.5 J/cm² (exposure time was 240 s).

2.7. Confocal laser microscopy and quantification of intracellular fluorescence intensity

Confocal microscopy was used to confirm whether PS interacts with bacterial cells and as a validation of DHT measurements. Measurements were carried out in two modes: fluorescent and differential interference contrast (DIC). Images of bacterial cells were collected on a Leica TCS SPE confocal laser microscope (Leica, Wetzlar, Germany) using a 63 \times high numerical aperture oil immersion objective (NA = 1.3). A 405 nm laser was used for photoexcitation of the PS (corresponding to the PDD absorption band of PS) and a halogen lamp was used as the light source in DIC mode. Measurements were performed for all groups after 24 h of incubation (control, PS-only, PS + EPI, EPI-only). The imaging parameters were set in dedicated software (LAS AF V.3.1). The laser was set at 10 % of its maximum power (2.5 mW), the image size was set to 1024 \times 1024 pixels, and the pinhole diameter was 1 AU. The emission detection window was set in the range of 700–790 nm. For fluorescence measurements, a gain of 1100 V and an offset of –60 % were used, while for measurements in DIC mode, a gain of 519 V and an offset of –5.7 % were set. For imaging cells without added PS, the gain was reduced to 473 V. Spectroscopic measurements performed previously confirmed that the PS emission signal does not overlap with that of EPIs, so the fluorescence is related to PS accumulation inside the bacterial cells.

To obtain a representative set of data for this analysis, 20 bacteria of each group of samples were analyzed. The images were processed using ImageJ (version 1.54d, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). For each image, individual cells were manually segmented. The following parameters were measured for each ROI using the “Measure” function: Integrated Density (ID), Area (A), and Mean Grey Value (MGV). Background fluorescence was determined by selecting a cell-free region of the images. Integrated fluorescence intensity (CTCF) was quantified in ImageJ as background-corrected integrated density for each segmented cell. Background-corrected fluorescence for each cell was calculated using the standard CTCF formula:

$$CTCF = ID - (A \times \text{Background MGV}) \quad (2)$$

ID is integrated density of cell, A is the area of the cell, Background MGV is the mean grey value of the background. Due to the different sizes of the cells, the CTCF value was divided by their area.

2.8. Digital holographic tomography and RI-data processing

DHT was used to assess the effect of EPIs on bacterial cell penetration efficiency using Ce6. A digital holotomograph (3D Cell Explorer, Nanolive, Ecublens, Switzerland) using a dry microscope objective (60 \times , numerical aperture NA = 0.8, Nikon) was used to visualize the spatial distribution of the refractive index (RI) in the form of 3D-RI tomograms. The digitally reconstructed spatial distribution of the RI can provide information on changes in cell density. As indicated in Refs. [44,46], RI-based measurements can be used to assess both the efficiency of the process of compound accumulation inside the cells, in which case an

increase in RI values is observed, and the efficiency of ongoing therapies, where a decrease in RI values is observed. The decrease in RI can also be caused by cell death, as shown in Ref. [51]. For each group, 20 3D-RI tomograms were recorded. Each 3D-RI tomogram contains 96 slices (2D-RI) tomograms. To assess the effectiveness of Ce6 and/or EPI accumulation within the bacteria, a total of 320 3D-RI tomograms were performed (160 per bacterial species), while 640 recorded 3D-RI tomograms were used to assess the effectiveness of aPDT (320 per bacterial species).

Numerically reconstructed 3D-RI tomograms were imported from STEVE software (version 1.6.3496, Nanolive, Ecublens, Switzerland) to ImageJ (version 1.54d, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). To obtain the RI values of the bacteria cells the Maximum Intensity Projection (MIP) method was used. The MIP method is a 3D data projection technique that visualizes only the highest RI values from all parallel 3D data planes relative to the visualization plane. Then bacterial cells were segmented using a contour mask. This region was identified by setting a threshold for RI values that exceeded the RI of the surrounding medium. A contour mask was applied to the MIP projection, allowing for the automatic differentiation of cell-occupied regions and the direct determination of their RI values. A median RI value of cells was determined for each tomogram. In addition, the area occupied by the bacterial cells was also determined. To obtain a representative set of data for this analysis, 20 tomograms (3D-RI) were performed of each group of samples ($n = 20 (4 \times 5)$).

Based on the MIP projection and the proposed algorithm for processing to obtain the median RI value of the cells, it was possible to determine the dry mass density of the cells. Changes in RI values can indicate significant changes in the composition of proteins and other cellular components, potentially reflecting changes occurring due to compound accumulation and photoinactivation of bacterial cells as a result of aPDT [52]. The dry mass density of the cell (ρ) can be expressed as [53]:

$$\rho = \left(\frac{RI}{RI_{PBS}} - 1 \right) \frac{1}{k} \quad (3)$$

where RI is the median of the refractive index of the cells, RI_{PBS} is RI of the environment (1.335), k is the refraction increment $k = 0.002 \text{ dl/g}$. Refraction increment values vary in the range of 0.0018–0.0021 dl/g [54].

In the case of the μ -dishes used, there is a characteristic pattern of bacteria attaching themselves to the surface of the glass (see Supplementary Fig. 1). The greatest number of bacteria accumulate on the periphery of the glass surface and at the interface between glass and plastic [55]. The closer to the center, the lower the number of bacteria attached to the glass can be observed. During the rinsing process, cells from the central part are also more likely to be removed from the sample. This may be due to different stages of biofilm formation. At its initial stage, cells reversibly attach to surfaces via hydrophobic interactions and weak interactions. Only at the next stage does this bonding become irreversible [56]. Therefore, it was decided to determine the dry mass density and, based on its reduction, conclude on the susceptibility of the cells to aPDT-induced photoinactivation. This parameter describes the intensity of structural and morphological changes occurring in bacterial cells. The following formula was used to estimate the effectiveness (E) of changes induced by combination therapy (EPI + PS) against therapy with PS alone:

$$E = \left(\frac{\rho_{bi(EPI+PS)} - \rho_{ai(EPI+PS)}}{\rho_{bi(PS)} - \rho_{ai(PS)}} \right) \cdot 100\% \quad (4)$$

where $\rho_{bi(EPI+PS)}$ is median value of dry mass density of cells before irradiation using the combination of EPI + PS, $\rho_{ai(EPI+PS)}$ is median value of dry mass density of cells after irradiation using the combination of EPI + PS, $\rho_{bi(PS)}$ is median value of dry mass density of cells before

irradiation using PS alone, $\rho_{ai(PS)}$ is median value of dry mass density of cells after irradiation using PS alone.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using Origin Software (Origin-PRO 2023b, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). The normality of data distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test, and the homogeneity of variances with the Brown-Forsythe test. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was applied for multiple comparisons. When ANOVA assumptions were not met, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc analysis was used. Comparisons between the two groups ($h\nu^+$ and $h\nu^-$) were performed using Student's t-test or the non-parametric Mann-Whitney test. Statistical significance was determined at the 95 % confidence level.

3. Results

3.1. MIC evaluation

The MIC is defined as the lowest concentration of the antimicrobial substance that prevents visible growth of a microorganism under specific conditions [57]. Combination therapies use a concentration at least 4 times lower than the designated MIC value [54,58]. When using a compound as potentiators, the concentration should be chosen so as to exhibit little or no antimicrobial effect. Supplementary Fig. 2 shows a representative test plate demonstrating the color change in the modified resazurin test caused by bacterial growth after 24 h incubation with EPIs.

The experiments showed that in the case of *B.cereus* the determined MICs were for CUR (128 $\mu\text{g/ml}$), PAL (2048 $\mu\text{g/ml}$), and BER (1024 $\mu\text{g/ml}$), for *E.coli* only incubation with PAL (4096 $\mu\text{g/ml}$) solution caused visible growth inhibition. It can be seen that for species belonging to the Gram-positives, the determined MICs are lower than Gram-negative species. This is due to the differences in permeability or penetration of cells wall by EPI caused by differences in cell wall structure [59,60]. The thicker layer of porous peptidoglycan and the lack of an additional outer membrane results in Gram-positive bacteria being more permeable to chemicals.

3.2. Resazurin assay

In resazurin assay the absorbance value is correlated to the number of living cells in the sample [61]. The EPIs concentrations used in this research are lower than the determined MIC values, so in order to limit the effect of DMSO on bacterial viability, its concentration was reduced to 1 %. Firstly, the calibration curves were determined. Bacterial suspensions with resazurin solution were incubated in dark at 37 °C for 24 h then the absorbance measurements were performed. Linear regression was fitted from measurement points. The results are presented in Supplementary Fig. 3.

Then, 1200 μl of bacterial suspensions 1 McF ($3 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$) were incubated with 600 μl EPIs solution for 24 h in 37 °C (ratio 2:1, bacterial suspension: EPI solution). The final concentration of bacteria in the sample was $2 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$. Samples were incubated with resazurin solution in dark for 24 h in 37 °C, then the measurements were performed. The calculated absorbance value using linear regression equation for the bacterial suspension concentration of $2 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ is marked with a dashed line (reference absorbance value corrected for solvent absorbance) in Fig. 1. On this basis, it was possible to determine how individual EPIs affect bacterial growth. An increase in absorbance value was observed for all samples in comparison with the reference absorbance estimated at a concentration of $2 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$. This is associated with an increase in the number of cells in the suspension over 24 h of incubation, demonstrating the lack of bactericidal properties of

A. Talarczyk et al.

Biochemical and Biophysical Research Communications 797 (2026) 153214

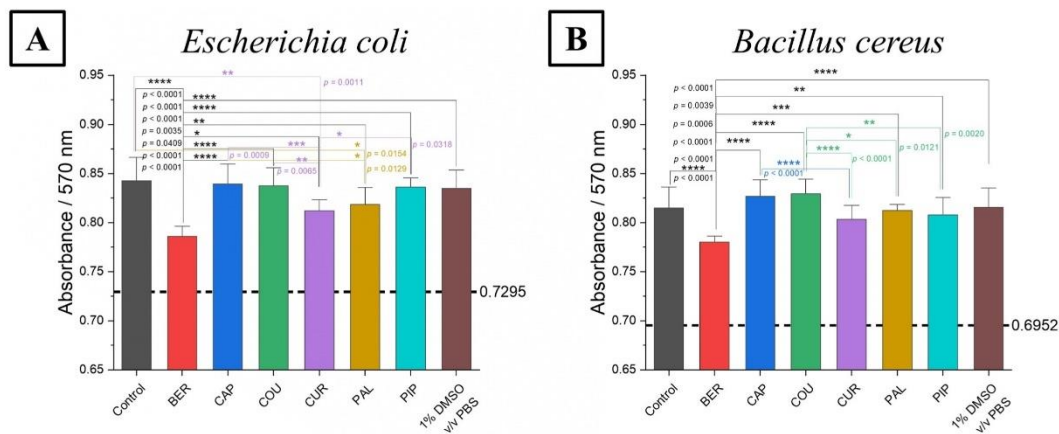


Fig. 1. Absorbance values measured at 570 nm for resorufin for (A) *E.coli*, (B) *B.cereus*, $n = 24 (3 \times 8)$ (*) results of Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

EPI. The lowest increase in absorbance was observed in both species for bacteria incubated with BER and CUR.

The results of the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Brown-Forsythe) for the analyzed data set are presented in Supplementary Table 1. They determined whether a parametric or nonparametric test was used. The Kruskal-Wallis test showed that there were no statistically significant differences between the 1% DMSO v/v PBS and Control groups ($p > 0.05$). For *E.coli*, statistically significant differences ($p < 0.05$) exist between BER and the other groups. It can also be indicated that there are statistically significant differences between PAL and CAP ($p = 0.0129$), CAP and CUR ($p = 0.0009$), COU and CUR ($p = 0.0065$), CUR and PIP ($p = 0.0318$), CUR and Control ($p = 0.0011$), and PAL and Control ($p = 0.0154$). For *B.*

cereus, statistically significant differences ($p < 0.05$) are found between BER and other groups without CUR, CAP and CUR, COU and CUR, COU and PAL, PIP and COU.

3.3. Photosensitizer's and efflux pump inhibitors' spectroscopic properties

The representative absorption spectra of the PS and EPIs are presented in Fig. 2A and B, respectively. For Ce6 the relevant spectral bands were used for aPDT, and the photodynamic diagnosis (PDD). PDD has been used to assess the cell penetration capacity of PS, as the fluorescence of a Ce6 indicates its ability to accumulate inside the cell and can be examined by confocal fluorescence microscopy. The absorption spectrum of Ce6 exhibits a strong band with maximum at 397 nm, which

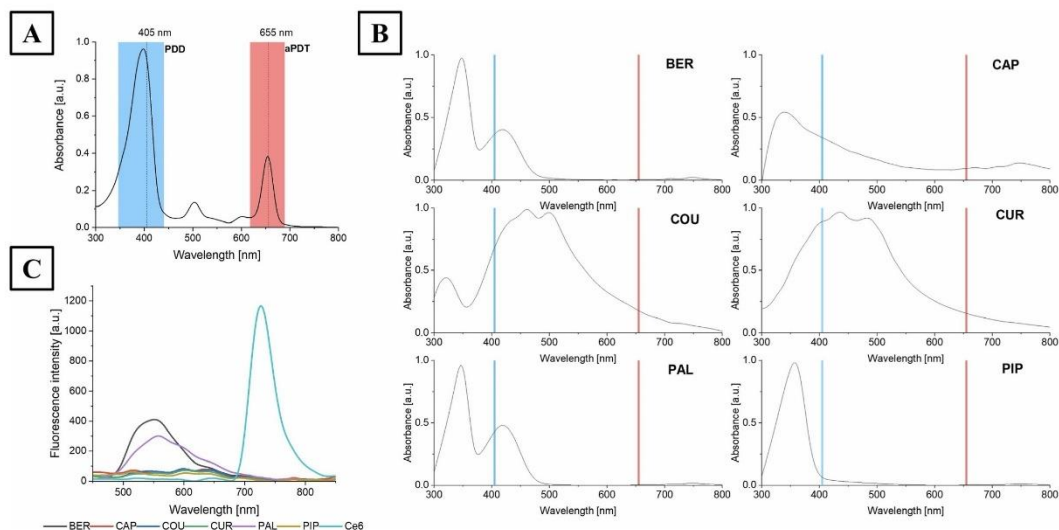


Fig. 2. The averaged normalized absorbance spectra ($n = 10 (1 \times 10)$) of (A) Ce6, (B) EPIs (1% v/v DMSO in PBS) with indication of the used wavelengths for PDD and aPDT, and the averaged luminescence spectra of Chlorine e6 and EPIs after 405 nm laser excitation.

A. Talarczyk et al.

Biochemical and Biophysical Research Communications 797 (2026) 153214

enabled the visualization of PS accumulation inside the cell through confocal fluorescence microscopy using a 405 nm laser. The second absorption band (654 nm) was used for aPDT treatment and PS excitation by the laser ($\lambda = 655$ nm). To exclude luminescence of EPIs in the same range as Ce6 (405 nm), luminescence spectra were recorded (Fig. 2C).

The wavelength used for PS photoexcitation in aPDT treatment was the same for all groups. Absorption spectra were also measured for EPIs solutions. The graphs in Fig. 2B include two lines: blue and red corresponding to wavelengths of 405 nm for PDD and 655 nm for aPDT, respectively. It was most important to determine whether the compounds were characterized by peaks in the same ranges as the PS. It can be seen that some compounds show a peak around 405 nm. Upon excitation at 405 nm (see Fig. 2C), the emission spectrum of Ce6 exhibited a strong maximum above 700 nm. In the case of BER and PAL a band in the range of 500–600 nm was observed, while for the other compounds no luminescence was observed. It was therefore confirmed that the observed fluorescence signal during scanning confocal microscopy measurements was from PS. None of the EPIs showed an absorption band with a peak at 655 nm, which is specific for Ce6.

3.4. Examination of photosensitizer accumulation inside bacteria by confocal microscopy

The measurements confirmed that there was no fluorescence in samples without added PS. Representative confocal microscopic images (combined DIC-fluorescence images) of *E.coli* and *B.cereus* cells are presented in Fig. 3. The lack of a fluorescent signal in the case of cells from the control group and those incubated with EPI is consistent with the results obtained in luminescence measurements of the compounds. In a specific emission range, i.e., 700–790 nm, only the fluorescent signal from Ce6 is received. The interaction of the PS with cells was examined using scanning fluorescence confocal microscopy also as a quantitative method. *E.coli* and *B.cereus* cells, incubated for 24 h with the PS alone or in combination with an EPI, were analyzed to determine whether the PS accumulated inside the cell. The confocal microscope images revealed fluorescence in samples with the PS and with the combination of the PS and EPI, indicating their ability to penetrate the bacteria. The use of the DIC mode enabled co-localization of the area

occupied by the bacteria with the fluorescence signal. Selected bacteria are presented in Fig. 4.

Fluorescence images confirm that Ce6, which is a cationic compound, can penetrate bacterial cells. The mechanism of entry for such compounds occurs through a combination of electrostatic charge interactions and protein transporters [62]. Blocking efflux pumps with EPI may prevent the removal of PS from cellular interior.

After quantitative analysis of CTCF, it can be concluded that PS accumulation occurs more effectively in Gram-positive bacteria, which is manifested by a higher fluorescence value. As in the case of determining the MIC value, this is related to the structure of the bacteria and the permeability of the membrane and cell wall. In the case of Gram-negative bacteria, the determined fluorescence value is significantly lower.

The results of the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Brown-Forsythe) for the analyzed data set are presented in Supplementary Table 2. They determined whether a parametric or nonparametric test was used. The analysis showed that the highest CTCF per area value for *B.cereus* was obtained for bacteria incubated with PIP and Ce6. Values higher than those for the Ce6 group were also obtained for CAP + Ce6 and COU + Ce6, but these differences are not statistically significant, as confirmed by the Kruskal-Wallis test. A lower value CTCF per area than for PS alone was obtained for cells incubated with BER and Ce6, PAL and Ce6, CUR and Ce6. All these compounds caused visible inhibition of cell growth in the MIC test (see Supplementary Fig. 1). Reduced PS accumulation in their presence may be related to changes in cell metabolism or a greater predisposition of cells to accumulate EPI compared to PS.

In the case of *E.coli*, the addition of BER and PAL most effectively promoted the accumulation of Ce6 in bacterial cells. Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) also indicated the presence of statistically significant differences. In the case of cells incubated with CUR and Ce6, it was impossible to perform a quantitative CTCF analysis due to the comparable fluorescence intensity of the cells and the background. An analogy can therefore be drawn with *B.cereus*, where the CTCF values achieved for the CUR + Ce6 group were also the lowest among all the groups analyzed.

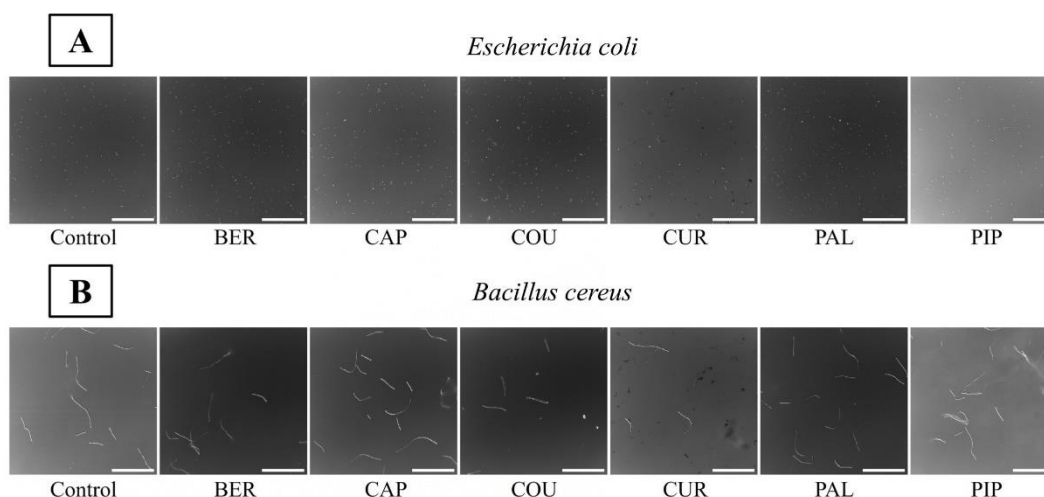


Fig. 3. Representative confocal microscopic images of control cells and cells after 24 h incubation with EPI (combined DIC-fluorescence images) of (A) *E.coli* and (B) *B.cereus*. Scale bar 50 μ m.

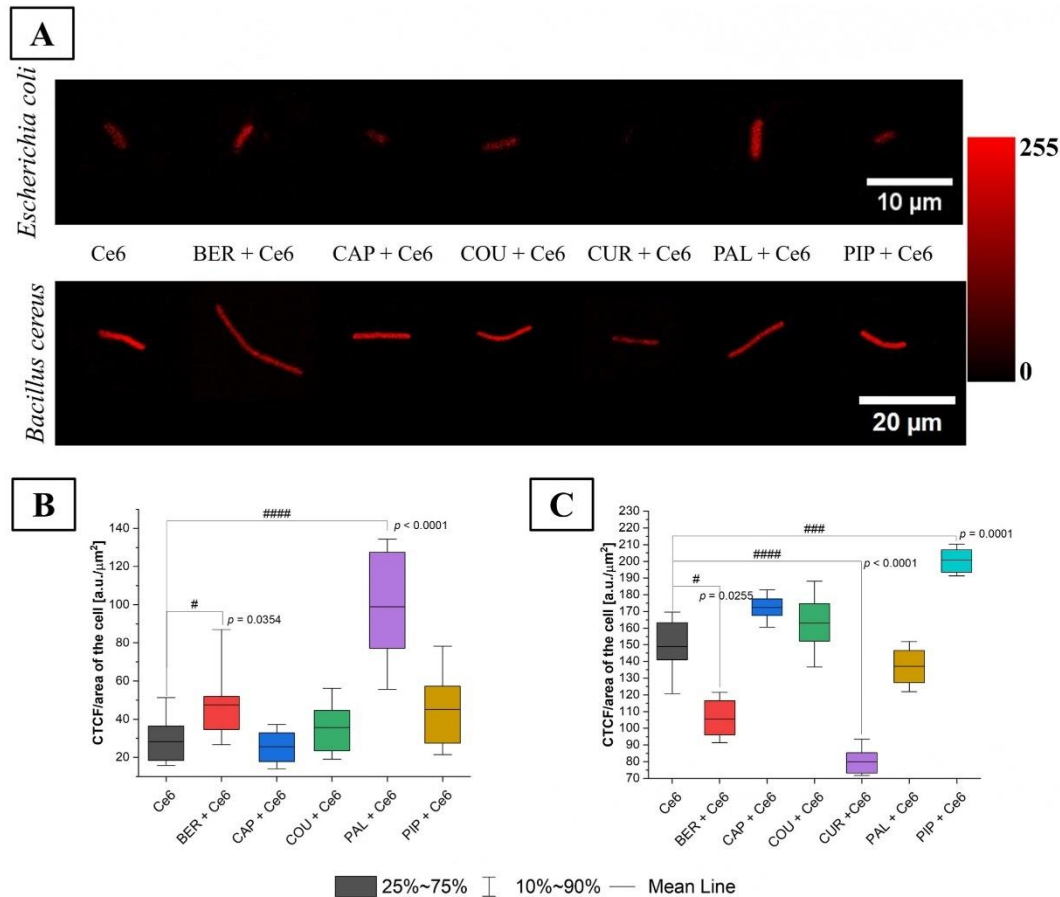


Fig. 4. (A) Representative example of the fluorescence signal of Ce6 performed by fluorescence confocal microscopy for *E.coli* and *B.cereus*. Representative box plots of integrated fluorescence intensity of Ce6 per area for (B) *E.coli* and (C) *B.cereus* cells. (#) results of Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

3.5. Effects of incubation with photosensitizers and efflux pump inhibitors on bacterial cells

The effect of incubation with PS and/or EPI on median of RI values of single cells and the area occupied by bacterial cells was analyzed. Changes in density within the cell induce changes in RI values. The range of RI values of bacterial cells depends on both the cell division process of living cells and possible cell death, as shown by the decrease in the RI value corresponds to a process of death or photoinactivation of the bacterial cell [44,46,51]. In this research, the increase in the median RI value of bacteria cells was due to PS and/or EPI accumulation. For all examined samples with added PS or PS + EPI, an increase in the median RI values of the cells was observed, indicating the accumulation of substances inside the cells.

To obtain a representative set of data for this analysis, 20 tomograms (3D-RI) of each group were examined. For all examined groups, an increase in the averaged RI values of cells after 24 h incubation was observed (see Fig. 5). A larger increase in the RI value indicates a more efficient accumulation process. The smallest differences in RI value

compared with the control group for both bacterial species can be seen for PS itself. In the case of Gram-negative bacteria (*E.coli*), smaller changes in the RI value can be observed after PS and/or EPI accumulation. It is related to the fact that the cell wall of Gram-negative bacteria is characterized by low permeability [63–65]. The highest increase in the RI value was observed for the combination of PIP with Ce6 in the case of *B.cereus* and the mixture of PAL and Ce6 in the case of *E.coli*.

The results of the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Brown-Forsythe) for the analyzed data set are presented in Supplementary Table 3. They determined whether a parametric or nonparametric test was used. Carried out statistical analysis for *E.coli* (Kruskal-Wallis test, $p < 0.005$) showed that there were statistically significant differences between the Control and cells incubated with PS and PS + EPI excluding CUR + Ce6. There were no statistically significant differences between Control and Ce6, despite an increase in the average RI value, suggesting that PS alone cannot accumulate effectively enough in Gram-negative bacterial cells due to their structure, as discussed earlier. Differences between data obtained for cells incubated with PS only and those incubated with PS + EPI were

A. Talarczyk et al.

Biochemical and Biophysical Research Communications 797 (2026) 153214

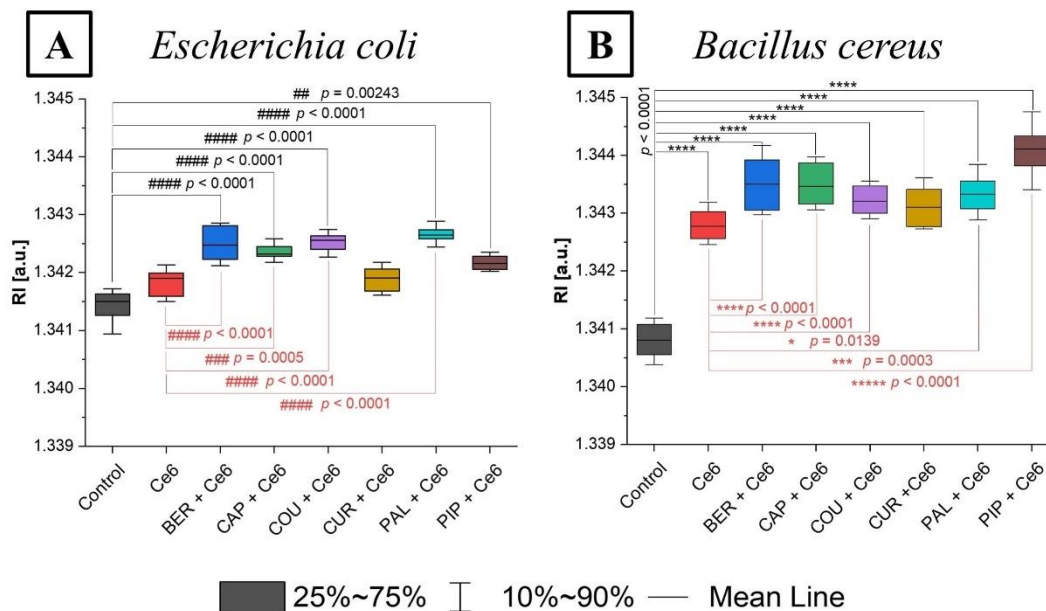


Fig. 5. The change of RI values of cells with and without PS or PS and EPI after 24 h incubation (A) *Escherichia coli*, (B) *Bacillus cereus*, $n = 20$ (4×5). (*) results of ANOVA with Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons, (#) results of Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

also analyzed. Statistically significant differences were found between Ce6 and BER + Ce6, CAP + Ce6, COU + Ce6, PAL + Ce6. ANOVA with Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons for *B. cereus* showed that there were statistically significant differences between Control and all other groups. For comparisons between Ce6 and Ce6 + EPI, the observed differences are also statistically significant except for CUR + Ce6.

The no statistically significant difference in RI values between Ce6 and EPI + Ce6 may suggest that EPIs do not penetrate cells, but lead to a reduction in bacterial cell adhesion properties. Therefore, after 24 h of incubation, the area occupied by the bacterial cells was also analyzed. As mentioned earlier, many factors can influence the result obtained. The analysis aimed to provide information on whether there are significant changes in occupied surface area after 24 h of incubation with EPI and/or PS due to the ability of the bacteria to adhere to the dish. The results are shown in Supplementary Fig. 4. It should be noted that the results obtained may be influenced by the rinsing process and the characteristic placement of the bacteria in the vessels, as indicated earlier (see Supplementary Fig. 1). It was noted that incubation with PS + EPI had a greater effect on the area occupied by bacterial cells in the case of *E. coli*, which may be due to the bacteriostatic effect of EPI. In the case of *B. cereus*, it was noted that the scatter of values was much larger.

3.6. The examination of susceptibility to photoinactivation by DHT

Bacterial cells exhibit a spatial RI distribution influenced by their components such as the cytoplasm, nucleotide and cell membranes/walls. To determine the efficiency of the aPDT after photoexcitation, the 3D-RI distributions of bacterial cells that were reconstructed by DHT were analyzed. The examinations were performed before and 24 h after the irradiation of the bacterial cells.

The variation of the RI values among different kinds of analyzed samples for *E. coli* and *B. cereus* are shown in Figs. 6 and 7, respectively. The black boxes represent the distribution of the RI values before

irradiation after 24 h of incubation with or without PS and the red boxes are 24 h after irradiation ($hv+$) or dark-control ($hv-$).

In case of non-irradiated and irradiated samples without PS, the average RI values of bacteria are slightly increasing over time. In both cases (*E. coli* and *B. cereus*), the decrease in RI values after 48 h of incubation with Ce6 without irradiation (Ce6 $hv-$) was observed. In the case of Ce6 $hv+$ samples, a decrease in RI higher than that of the non-irradiated group was observed. In the case of the *E. coli* species, non-irradiated samples had comparable RI values at 24 and 48 h. For the nonirradiated *B. cereus* samples after 48 h incubation with PAL + Ce6, COU + Ce6, CUR + Ce6, a slight increase in RI values was observed. The opposite tendency was observed for the remaining *B. cereus* groups. In all irradiated samples with PS or PS and EPI (after aPDT treatment), a decrease in the averaged RI values over time was observed. It was significantly higher in the case of *E. coli*. As shown in Fig. 5A, the highest accumulation of compounds inside *E. coli* bacterial cells was observed for PAL + Ce6, COU + Ce6, and BER + Ce6, respectively. The RI values of the cells 24 h after irradiation indicated that the greatest decrease in median value occurred for BER + Ce6 (0.0023), COU + Ce6 (0.00175), and PAL + Ce6 (0.0015). For *B. cereus* after 24 h incubation (see Fig. 5B), the highest RI values were obtained for PIP + Ce6, BER + Ce6, and PAL + Ce6, respectively. This correlated with the greatest decrease in RI after irradiation: 0.00094 for PIP + Ce6, 0.00084 for BER + Ce6, and 0.00074 for PAL + Ce6. The decrease in RI values caused by irradiation for Gram-positive bacteria was noticeably smaller than for Gram-negative bacteria.

To determine whether the observed changes in the averaged RI of cells caused by combined aPDT were statistically significant (between $hv+$ and $hv-$), a Student's t-test or Mann-Whitney test was performed. The results of the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Brown-Forsythe) for the analyzed data set are presented in Supplementary Table 4. They determined whether a parametric or nonparametric test was used. Interpreting the results of

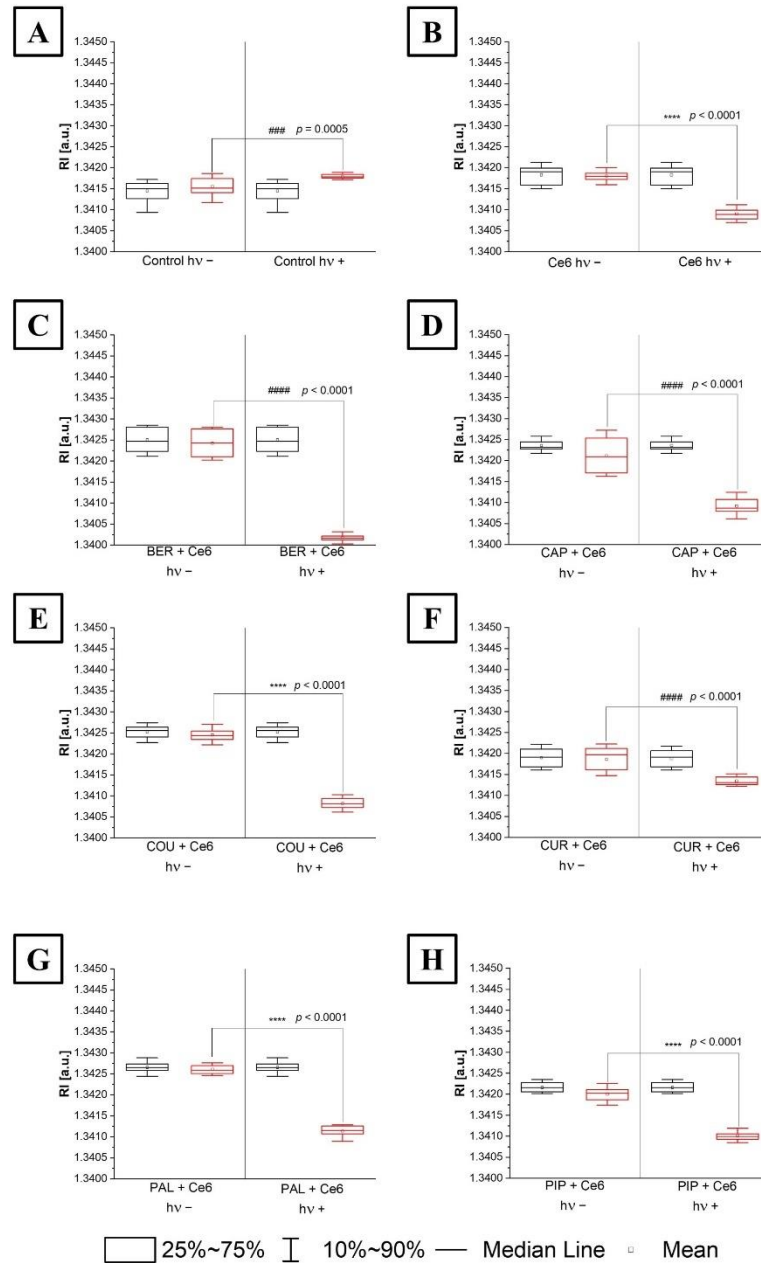


Fig. 6. Representative box plots of averaged MIP-RI values of *E. coli* cells after 24 h incubation (black boxes) and 24 h after irradiation (hv+: irradiated) or a further 24 h of incubation (hv-: non irradiated) (red boxes) for (A) Control, (B) Ce6, (C) BER + Ce6, (D) CAP + Ce6, (E) COU + Ce6, (F) CUR + Ce6, (G) PAL + Ce6, (H) PIP + Ce6, $n = 20$ (4×5). (*) results of A Student's t-test, (#) results of Mann-Whitney test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

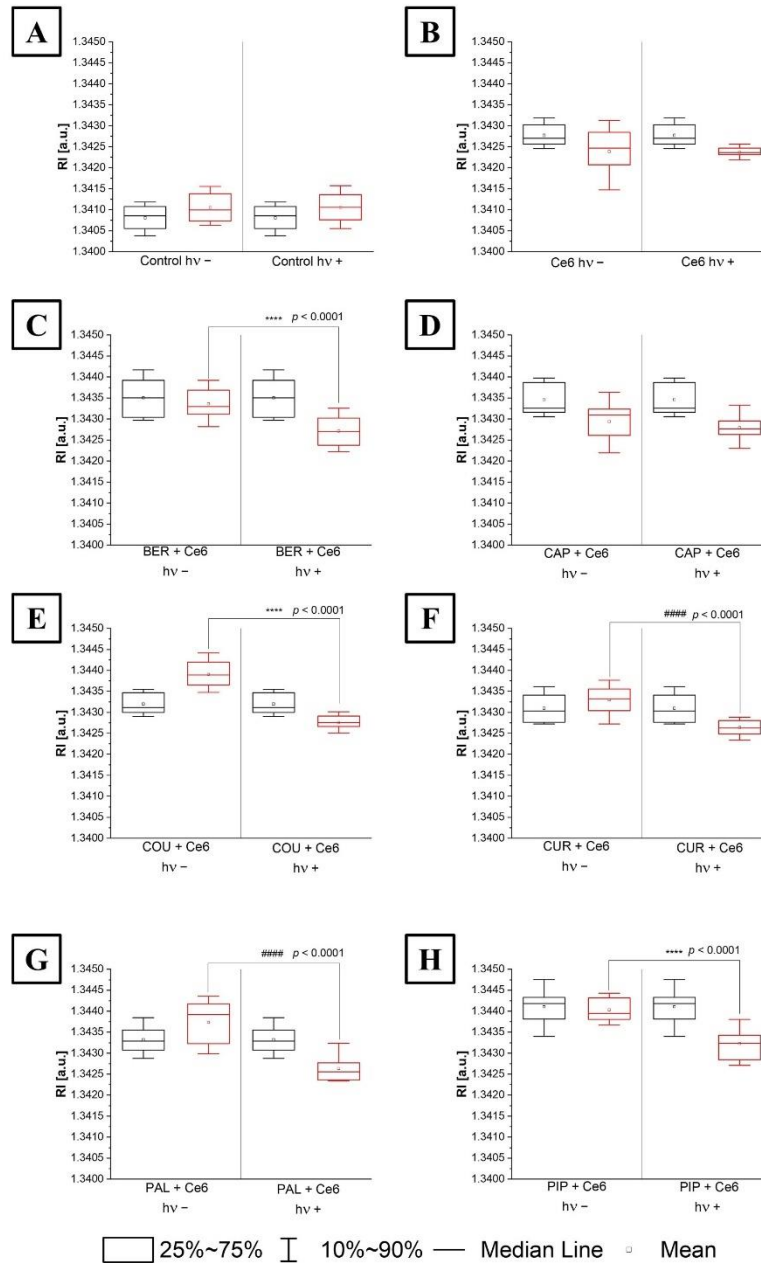


Fig. 7. Representative box plots of averaged MIP-RI values of *B. cereus* cells after 24 h incubation (hv-: non irradiated) and 24 h after irradiation (hv+: irradiated) or a further 24 h of incubation (hv-: non irradiated) (red boxes) for (A) Control, (B) Ce6, (C) BER + Ce6, (D) CAP + Ce6, (E) COU + Ce6, (F) CUR + Ce6, (G) PAL + Ce6, (H) PIP + Ce6, n = 20 (4 × 5). (*, #) results of Student's t-test, (###, ****) results of Mann-Whitney test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the statistical analysis for *E. coli*, it was found that there were significant differences for each group between irradiated and non-irradiated cells. In the case of Ce6 and Ce6 + EPI, a $p < 0.0001$ result was obtained by Student's t-test or Mann-Whitney test. Statistically significant differences were also found between irradiated and non-irradiated cells from the Control sample ($p = 0.0005$). For *B. cereus*, statistically significant differences are found between the irradiated and non-irradiated for BER + Ce6, COU + Ce6, CUR + Ce6, PAL + Ce6, PIP + Ce6 ($p < 0.0001$).

3.7. Analysis of the dry mass density of bacteria cells

To determine the efficiency of the aPDT after photoexcitation of the PS accumulated inside the cell, the dry mass density of *E. coli* and *B. cereus* cells were used. In the case of samples where there is not a homogeneous distribution of bacterial cells on the surface, as indicated in Supplementary Fig. 1, dry mass density analysis allows to obtain quantitative data on the changes occurring in the cells. The efficiency of aPDT is based on photoinactivation of cells by the laser-induced release of the ROS by accumulated PS. It is directly related to changes in dry mass density before and after aPDT as a result of photoinactivation. As indicated in Ref. [66], the cell death process can be described quantitatively using the obtained dry mass density values. Two key stages can be distinguished: the initial one is characterized by a linear decrease in dry mass density and, over time, a plateau value is reached. Such changes are caused by micro-ruptures and possible leakage of cell contents into the surrounding medium. Changes in dry mass density and the results of the statistical analysis are shown in Fig. 8. For both bacterial

species and all groups with added PS or PS + EPI, a decrease in dry mass density after irradiation was observed. The smallest decrease in mean dry mass density was observed for Ce6: 0.35 g/dl for *E. coli*, 0.15 g/dl for *B. cereus*. For *E. coli*, the greatest reduction in mean dry mass density occurred for BER + Ce6 (from 2.81 ± 0.12 g/dl to 1.94 ± 0.05 g/dl), COU + Ce6 (from 2.82 ± 0.08 g/dl to 2.18 ± 0.06 g/dl), and PAL + Ce6 (from 2.87 ± 0.06 g/dl to 2.30 ± 0.06 g/dl). In the case of *B. cereus*, the groups for which there was the greatest reduction in mean dry mass density were PIP + Ce6, BER + Ce6, PAL + Ce6, with differences of 0.33 g/dl, 0.29 g/dl, and 0.26 g/dl, respectively.

To determine whether the observed changes in the averaged RI of cells caused by combined aPDT were statistically significant, a Student's t-test or Mann-Whitney test was performed. The results of the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Brown-Forsythe) for the analyzed data set are presented in Supplementary Table 5. They determined whether a parametric or nonparametric test was used. Only for CUR + Ce6 (*B. cereus*) the p -value was 0.0002, for the other groups a $p < 0.0001$ was obtained.

Based on the median value of dry mass density before and 24 h after irradiation, it was possible to evaluate the effectiveness (E) of changes induced by combination therapy compared to treatment with PS alone. The results are presented in Table 1.

Ce6 – Chlorin e6, BER - Berberine Hydrochloride, CAP - Capsaicin, COU - Coumarin 6, CUR - Curcumin, PAL - Palmatine, PIP – Piperine.

The aPDT efficiency was higher for the combination of PS and EPI than for Ce6 alone, the only exception being CUR + Ce6 for *E. coli* (59.90 %). As can be seen in Fig. 5A, this is the only combination for which a

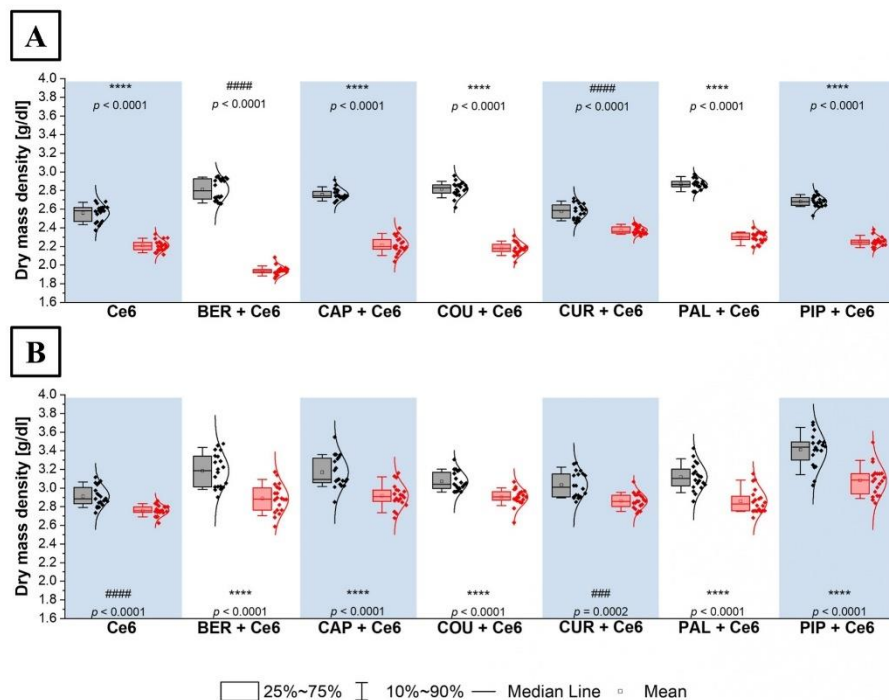


Fig. 8. Representative box plots of dry mass density of (A) *E. coli* and (B) *B. cereus* cells after 24 h incubation (black boxes) and 24 h after irradiation (red boxes), $n = 20$ (4×5).

(*) results of Student's t-test, (##) results of Mann-Whitney test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1
Effectiveness (*E*) of changes induced by combination therapy compared to treatment with PS alone (hereinafter referred to as aPDT efficiency).

Groups		BER + Ce6	CAP + Ce6	COU + Ce6	CUR + Ce6	PAL + Ce6	PIP + Ce6
<i>E</i> [%]	<i>B.cereus</i>	234.77	142.02	104.35	117.38	211.58	273.90
	<i>E.coli</i>	227.72	144.06	172.77	59.90	148.02	115.35

lower RI value was observed after 24 h incubation than for Ce6 alone. It can therefore be concluded that CUR does not promote increased Ce6 accumulation for *E.coli*, which was also confirmed by CTCF measurements. In the case of *B.cereus*, the highest efficiency were 273.90 % (PIP + Ce6), 234.77 % (BER + Ce6) and 211.58 % (PAL + Ce6), in the case of *E.coli* the highest value (227.72 %) was observed for the mixture of BER + Ce6, followed by COU + Ce6 (172.77 %) and PAL + Ce6 (148.02 %).

4. Discussion

The development of new, more effective antimicrobial therapies is of interest not only in clinical applications, but also in industrial applications. The trend towards the use of substances of natural origin is also becoming increasingly popular, with such compounds gaining ground, resulting in more environmentally friendly therapies being used. EPIs can be used as potentiators in antimicrobial photodynamic therapy, as indicated earlier. The studies presented here confirmed that the addition of an appropriately selected EPI contributes to increased PS accumulation inside bacterial cells. Changes were observed in both *B.cereus* and *E.coli* bacterial species. It is most important to select the EPI considering the efflux pumps that can be blocked by the compound.

EPIs can affect bacterial viability, as indicated by the determination of the MIC (see Supplementary Fig. 2), and successively in the resazurin assay, where concentrations of at most 0.5 MIC were used. Based on the resazurin assays results (see Fig. 1), it can be concluded that the bacterial growth was observed for each group. Use of 1 % v/v DMSO in PBS as a solvent for EPIs and PS also did not affect the growth of bacteria in the solution. This is confirmed by the comparable absorbance value of this group compared with the Control. Despite the lack of MIC determination for BER in the case of *E.coli*, it can be concluded that it influences bacterial growth. For PAL, the MIC was 4096 µg/ml, however, even more than 16 times lower concentrations also affect bacterial growth. It can therefore be concluded that BER and PAL for both analyzed species cause the greatest differences in the number of viable cells after incubation with EPI. This corresponds to the antimicrobial effect observed when determining the MIC for these compounds. The condition for the use of EPIs as potentiators was therefore met, at these concentrations they show little antibacterial effect. EPI at concentrations below the MIC have a bacteriostatic effect, i.e. the bacteria remain alive, while their growth is inhibited, as evidenced by the decrease in absorbance values in comparison to the Control [67]. This may be related to a change in the efflux of quorum sensing and quorum quenching molecules as a result of blocked efflux pumps [23]. In the presented research, one concentration of EPI was used, however, it is worth noting that the use of a different concentration may result in different efficacy of photodynamic therapy. As indicated earlier, depending on the concentration used, a given compound may inhibit bacterial growth (high concentration, MIC), while using the same compound at a lower concentration, this growth may only be slowed down [47]. This will certainly affect the results obtained.

The CTCF analysis confirmed that the selected EPIs can increase the accumulation of photosensitizer inside bacterial cells. In the case of *B.cereus*, the best result was achieved for PIP and Ce6, while in the case of *E.coli*, it was PAL and Ce6. However, it should be emphasized that in the case of combination therapy, the interaction of the compounds used and the effects they cause is important. Not every EPI increased PS accumulation inside the cell or in its immediate surroundings. Some of them, on the contrary, limited its accumulation, but the effectiveness of the combination therapy remained high.

By using DHT, it was possible to quantitatively analyze the changes occurring in the RI of bacterial cells after incubation with EPI and/or PS. The observed changes in RI values (see Fig. 5) may result from the accumulation of substances within both PS and EPI cells, leading to an increase in the intracellular density of bacterial cells. Changes in RI values can be influenced by EPIs and SrtAIs through their properties. It is related to blocking the attachment of surface protein, anti-adhesion properties, and the response to changing environmental conditions [23,42,68]. For all analyzed groups (with PS or PS + EPI), an increase in the RI value was observed, which was caused by local changes in density depending on effectiveness of PS and/or EPI accumulation. For *E.coli*, an increase in median RI was observed for cells incubated with PS or PS and EPI relative to Control (1.3415). The largest differences were recorded for PAL + Ce6, COU + Ce6 and BER + Ce6 were 0.00115, 0.00106, 0.00097 respectively. This indicates the most effective penetration of cells by these sets of substances. According to literature research, these EPIs are able to block pumps from the RND and MFS families, which are characteristic for *E.coli* [31–33]. For *B.cereus*, the increase in RI values was higher than for Gram-negative bacteria, suggesting a more effective accumulation of PS and/or EPI inside cells. The median RI for Control cells was 1.34085. An increase in median RI of 0.00333 was observed for PIP + Ce6, 0.00266 for BER + Ce6, and 0.00244 for PAL + Ce6 was. As mentioned earlier *B.cereus* expresses over 50 pumps from the MFS family [30]. The greatest increase in the RI value was observed for PIP + Ce6, which may be due to the fact that PIP has the ability to block efflux pumps from this family. Statistical analysis of the area occupied by bacterial cells after 24 h incubation showed that there are no statistically significant differences between Control and the other groups in the case of *B.cereus*, which may indicate a less effective adhesion process to the surface compared with *E.coli*. In the case of Gram-positive bacteria, the compounds used may act via two mechanisms EPI and SrtAI. For *B.cereus*, one-way ANOVA showed no statistical differences between groups. For *E.coli*, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test showed that there were statistically significant differences between Control and BER ($p < 0.0001$), CAP ($p = 0.0182$), CUR ($p = 0.0080$). This may be indicative of the anti-adhesive properties of the indicated EPI, whereby fewer cells adhere to the glass and are removed from the sample during the washing process.

The RI values obtained after 24 h of incubation and 24 h after irradiation allowed monitoring the changes occurring in the bacterial cells as a result of the photoinactivation process (see Figs. 6 and 7). The observed slight increase in RI in nonirradiated and irradiated samples without PS may be related to bacterial cell division [51]. The decrease in RI after 48 h of incubation with Ce6 $h\nu^-$ might result from nutrient depletion and removal of previously accumulated Ce6 by efflux pumps. Washing the samples twice after 24 h could have enhanced efflux activity, leading to these observations. In Ce6 $h\nu^+$ samples, the greater RI decrease is attributed to photoinactivation. Irradiated cells undergo structural damage such as genetic material destruction or cell wall disintegration, which compromises membrane integrity and reduces intracellular density, thus decreasing RI. In *E.coli*, stable RI values between 24 and 48 h in non-irradiated samples suggest minimal changes, possibly due to EPIs disrupting quorum sensing and quorum quenching [23]. The slight decreases in RI may be also related to cell cycle [69] and the change in density inside the bacterial cells induced by lack of any nutrients in the PBS solution [70]. For *B.cereus*, the increase in RI with PAL + Ce6, COU + Ce6, and CUR + Ce6 may relate to ongoing PS accumulation. Differences between *B.cereus* groups can result from distinct mechanisms of action of substances, some acting as both EPIs

and SrtAIs. PBS washing also removes EPIs and Ce6, possibly reducing internal accumulation. The greater decrease in RI in *E.coli* than *B.cereus* after aPDT may be explained by the compound properties and higher accumulation. The conducted MIC assays showed that a lower concentration is needed for the apparent growth inhibition of *B.cereus* than for *E.coli*. This suggests a greater susceptibility of *B.cereus* to the EPIs used, including their anti-adhesive properties. The sample preparation procedure includes rinsing the samples (2 times before each imaging), so some of the cells that accumulated PS and/or EPI were removed from the sample. The observed reduction in RI value following aPDT likely reflects ultrastructural alterations within bacterial cells, manifested as ROS-induced damage to cellular structures, protein and enzyme denaturation, inhibition of protein synthesis, and aggregation of cytoplasmic macromolecules [71]. Previous study showed that the decrease in the RI value was related to susceptibility of bacterial on photoinactivation [44]. The decrease in RI value may be also related to a disruption of cell division processes or progressing process of cell death as a result of the therapy. This is confirmed by studies of bacterial cell's death after antibiotic treatment [72]. The difference in the RI values of bacterial cells before and after irradiation can serve as an indicator of bacterial susceptibility to photoinactivation, as lower RI values correspond to reduced intracellular density. The only combination for which there is a change in median RI between light-exposed and unexposed *B.cereus* cells is CAP + Ce6. This may indicate the ineffectiveness of Ce6 accumulation inside the cell and therefore the inability of CAP to block efflux pumps. The most significant difference in the RI value before and 24 h after irradiation was observed in the case of PIP + Ce6 (*B.cereus*) and BER + Ce6 (*E.coli*), which may suggest that when these two substances are combined, the photo-inactivation process was most effective.

Antibacterial photodynamic therapy induces a wide range of changes in bacterial cells, in their morphology and chemical composition of structures, which results in changes in cell dry mass density [73]. A significant decrease in dry mass density could only be observed in the case of photodynamic combination treatment (see Fig. 8). It has been shown in Ref. [74] that changes in dry mass density can be used in antimicrobial susceptibility testing. The decrease in dry mass density values suggests that there have been changes in the biochemical properties of the bacteria as a result of the treatment. The differences between *E.coli* and *B.cereus* in dry mass reduction follow the same trends as in RI changes. *E.coli* consistently showed more pronounced responses, suggesting greater susceptibility to photoinactivation with these compound combinations. Referring to Fig. 5, the highest RI value indicating the most effective accumulation of substances inside the cell is not always associated with achieving the greatest reduction in dry mass density. This may be caused by the fact that both PS and EPI can accumulate inside the cell. Both compounds can affect the dry mass density of bacterial cells, but the effectiveness of photoinactivation depends on the accumulated PS. The highest reduction in dry mass density indicates the combination of compounds that can give the best therapeutic effect. Furthermore, attention should be paid to the properties of EPIs, in particular anti-adhesion and the susceptibility of selected bacterial species to their action. Even small concentrations of EPI (much lower than the MIC) can have a bacteriostatic effect, which directly affects the effectiveness of the combined therapy.

5. Conclusion

The presented results are preliminary data studies indicating the potential use of the selected compound combinations, however, the further detailed studies are required. Full validation of the bactericidal effect, especially in the context of application, should include a CFU test or live/dead cell staining. In the case of Gram-positive bacteria, some of the proposed substances (BER, CUR, PAL) may act as both EPI and SrtAI, which affects the complexity of the observed effects and may hinder the analysis of the results obtained. Therefore, it is necessary to analyze the properties of EPI in detail, including its bacteriostatic properties, as

these may influence the effectiveness of photoinactivation.

Integrating EPIs into antibacterial treatment regimens has substantially enhanced their efficacy against *B.cereus* (PIP + Ce6) and *E.coli* (BER + Ce6), with increases of 273.90 % and 227.72 %, respectively. This significant improvement highlights the pivotal role of EPIs in counteracting bacterial resistance mechanisms. By inhibiting efflux pumps, EPIs prevent antimicrobial substances from being expelled from bacterial cells, thereby increasing their intracellular concentrations and restoring the effectiveness of existing antimicrobial agents. These findings suggest that EPIs could be valuable adjuvants in the control or eradication of multidrug-resistant bacteria. The results demonstrate the potential for the photoinactivation of bacterial cells by the proposed substance combinations in conjunction with aPDT.

This study provides a comprehensive knowledge base for further research into developing plant-derived combinations of PS and EPI that could contribute to implementing aPDT in clinical practice and industry to reduce bacterial contamination of products.

CRedit authorship contribution statement

Aleksandra Talarczyk: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Agata Kublicka:** Writing – review & editing, Investigation. **Anna Matczuk:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Resources, Investigation. **Alina Wieliczko:** Writing – review & editing, Resources, Project administration. **Agnieszka Ulatowska-Jarza:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology, Formal analysis. **Igor Buzalewicz:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Funding

The work was partially funded by National Center of Science (Grant No: 2021/41/B/ST7/04002). The MIC evaluation was supported by the project Minigrants for doctoral students of the Wrocław University of Science and Technology.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.153214>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] C. Llor, L. Bjerrum, Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem, *Ther. Adv. Drug Saf.* 5 (2014) 229, <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>.
- [2] World Health Organization, WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance, World Health Organization, 2024, pp. 1–72. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf>. (Accessed 11 December 2025).
- [3] H. Fongang, A.T. Mbaveng, V. Kuete, Global burden of bacterial infections and drug resistance, *Adv. Bot. Res.* 106 (2023) 1–20, <https://doi.org/10.1016/BS.ABR.2022.08.001>.

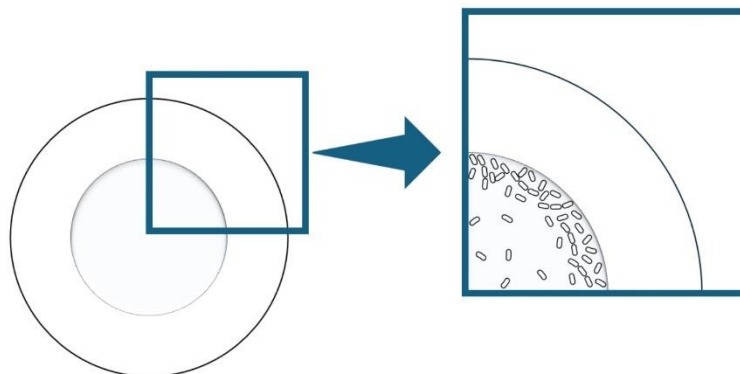
- [4] C.P. Sabino, M. Wainwright, M.S. Ribeiro, F.P. Scellera, C. dos Auios, M. da S. Baptista, N. Lincopan, Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B* 208 (2020) 111893, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111893>.
- [5] H. Mahmoudi, A. Bahador, M. Pourhajibagher, M.Y. Alikhani, Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections, *J. Laser Med. Sci.* 9 (2018) 154, <https://doi.org/10.15171/JLMS.2018.29>.
- [6] N. Lange, W. Szlaza, J. Sączko, A. Chwilkowska, M. Wojcik, E. Preis, G. Litscher, Potential of cyanine derived dyes in photodynamic therapy, *Pharmaceutics* 13 (2021) 818, <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13060818>.
- [7] M. Przygoda, D. Bartusik-Aebischer, K. Dynarowicz, G. Cieślak, A. Kawczyk-Krupka, D. Aebischer, Cellular mechanisms of singlet oxygen in photodynamic therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 16890, <https://doi.org/10.3390/IJMS242316890>.
- [8] R.W. Redmond, L.E. Kochevar, Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1178, <https://doi.org/10.1562/2006-04-14-IR-874>.
- [9] S. Cui, X. Guo, S. Wang, Z. Wei, D. Huang, X. Zhang, T.C. Zhu, Z. Huang, Singlet oxygen in photodynamic therapy, *Pharmaceutics* 17 (2024) 1274, <https://doi.org/10.3390/PH17101274>.
- [10] Z. Zhou, R. Chen, P. Li, P. Fan, L. Ma, X. Cai, Y. Hou, B. Li, J. Su, Natural borneol improves cellular uptake of curcumin to enhance its photodynamic bactericidal activity against *Escherichia coli* ATCC 8739, *Food Microbiol.* 127 (2025) 104686, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104686>.
- [11] L. Sheng, X. Li, L. Wang, Photodynamic inactivation in food systems: a review of its application, mechanisms, and future perspective, *Trends Food Sci. Technol.* 124 (2022) 167–181, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.001>.
- [12] R. Youf, M. Müller, A. Balasini, F. Thétiot, M. Müller, A. Hascoët, U. Jonas, H. Schönher, G. Lemerier, T. Montier, T. Le Gall, Antimicrobial photodynamic therapy: latest developments with a focus on combinatory strategies, *Pharmaceutics* 13 (2021), <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13121995>.
- [13] Z. Zhou, P. Li, R. Chen, X. Cai, W. Zhang, P. Fan, J. Su, A review of curcumin mediated photodynamic bactericidal technology for food preservation: limitations and improvement strategies, *Food Microbiol.* 131 (2025) 104802, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104802>.
- [14] S. Khan, S.N. Khan, F. Akhtar, L. Misha, R. Meena, A.U. Khan, Inhibition of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*: nanoparticles induced photoinactivation in presence of efflux pump inhibitor, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 157 (2020) 165–174, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.10.007>.
- [15] R. Alenazy, Drug efflux pump inhibitors: a promising approach to counter multidrug resistance in gram negative pathogens by targeting AcrB protein from AcrAB-TolC multistand efflux pump from *Escherichia coli*, *Biology (Basel)* 11 (2022), <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11091328>.
- [16] A.J. Seukop, V. Kuele, L. Nahar, S.D. Sarker, M. Guo, Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification, *J. Pharm. Anal.* 10 (2020) 277–290, <https://doi.org/10.1016/j.jpia.2019.11.002>.
- [17] S. Prasch, F. Bucar, Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update, *Phytochem. Rev.* 14 (2015) 961–974, <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9436-y>.
- [18] K. Nishino, S. Yamasaki, R. Nakashima, M. Zwama, M. Hayashi-Nishino, Function and inhibitory mechanism of multidrug efflux pumps, *Front. Microbiol.* 12 (2021) 737288, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>.
- [19] V. Shiram, T. Khare, R. Bhagwat, R. Shukla, V. Kumar, Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 399717, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>.
- [20] A. Sharma, V.K. Gupta, R. Pathania, Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: from bench to bedside, *Indian J. Med. Res.* 149 (2019) 129, https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_2079_17.
- [21] M. Kumasaw, B. Naji, M. Deswani, I. Viquez, N. Pal, P. Sharma, S. Tiwari, D. K. Sarma, S. Shubham, M. Kumar, Role of bacterial efflux pump proteins in antibiotic resistance across microbial species, *Microb. Pathog.* 181 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106182>.
- [22] L. Zhang, X. Tian, L. Sun, K. Mi, R. Wang, F. Gong, L. Huang, Bacterial efflux pump inhibitors reduce antibiotic resistance, *Pharmaceutics* 16 (2024), <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16020170>.
- [23] I. Alay, J.M. Sutton, K.M. Rahman, Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation, *J. Antimicrob. Chemother.* 73 (2018) 2003–2020, <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>.
- [24] N. Negi, P. Prakash, M.L. Gupta, T.M. Mohapatra, Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Diagn. Res.* 8 (2014) DCD4, <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8329-4965>.
- [25] N.P. Kalia, P. Mahajan, R. Mehra, A. Nargotra, J.P. Sharma, S. Koul, I.A. Khan, Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 2401–2408, <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.
- [26] S.S. Aghayan, H.K. Moghadam, M. Fazli, D. Darban-Sarokhalil, S.S. Khoramrooz, F. Jabalameli, S. Yasianifard, M. Mirzaii, The effects of berberine and palmatine on efflux pumps inhibition with different gene patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections, *Avicenna, J. Med. Biotechnol.* 9 (2017) 2.
- [27] F. Setiawan, D.A. Waljuningrum, A. Yudianto, E. Radhianto, J. Sunarini, A. Bhardwaj, The inhibition effect of capsaicin extract against *Staphylococcus aureus*: an in vitro experimental study, *J. Int. Oral Health* 13 (2021) 393–399, <https://doi.org/10.4103/JIOH.JIOH-45-21>.
- [28] S. Prasch, A.G. Duran, N. Chinchilla, J.M.G. Molinillo, F.A. Macías, F. Bucar, Resistance modulatory and efflux-inhibitory activities of capsaicinoids and capsinoids, *Bioorg. Chem.* 82 (2019) 378–384, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.062>.
- [29] T. Gil-Gil, P. Laborda, I.E. Ochoa-Sánchez, J.L. Martínez, S. Hernandez-Amado, Efflux in Gram-negative bacteria: what are the latest opportunities for drug discovery? *Expert Opin. Drug Discov.* 18 (2023) 671–686, <https://doi.org/10.1080/17460441.2023.2213886>.
- [30] K.A. Hassan, A. Fagerlund, L.D.H. Elbourne, A. Vörös, J.K. Kroeger, R. Simm, N. J. Tourasse, S. Finke, P.J.F. Henderson, O.A. Økstad, I.T. Paulsen, A.B. Kolsto, The putative drug efflux systems of the *Bacillus cereus* group, *PLoS One* 12 (2017) e0176188, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176188>.
- [31] N. Chowdhury, S. Suhani, A. Purkayastha, M.K. Begum, T. Railhan, Md.J. Alam, K. Islami, A.K. Azad, Identification of AcrAB-TolC efflux pump genes and detection of mutation in efflux repressor AcrR from omeprazole responsive multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections, *Microbiol. Insights* 12 (2019) 117863611988962, <https://doi.org/10.1177/1178636119889629>.
- [32] M.L. Ciusa, R.L. Marshall, V. Ricci, J.W. Stone, L.J.V. Piddock, Absence, loss of function, or inhibition of *Escherichia coli* AcrB does not increase expression of other efflux pump genes supporting the discovery of AcrB inhibitors as antibiotic adjuvants, *J. Antimicrob. Chemother.* 77 (2022) 633–640, <https://doi.org/10.1093/jac/dkac452>.
- [33] S. Chetri, D. Bhowmik, D. Paul, P. Pandey, D.D. Chanda, A. Chakravarty, D. Bora, A. Bhattacharjee, AcrAB-TolC efflux pump system plays a role in carbapenem non-susceptibility in *Escherichia coli*, *BMC Microbiol.* 19 (2019) 210, <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1589-1>.
- [34] X.Y. Zhou, X.G. Ye, L.T. He, S.R. Zhang, R.L. Wang, J. Zhou, Z.S. He, In vitro characterization and inhibition of the interaction between ciprofloxacin and berberine against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *J. Antibiot.* 69 (2016) 741–746, <https://doi.org/10.1038/ja.2016.15>.
- [35] P. Jolu, A. Moha, N. Ar, Effect of capsaicin in inhibiting efflux pump AcrAB-TolC of tetracycline resistant *Escherichia coli*, *Pharm. Innov.* 9 (2020) 39–45.
- [36] A.L.A.R. Martin, R.L.S. Pereira, J.E. Rocha, P.A.M. Farias, T.S. Freitas, F.R. de L. Caldas, F.G. Figueredo, N.F.L. Sampaio, C.D. de M. Oliveira-Tintino, S.R. Tintino, G.C.A. da Hora, M.C.P. Lima, I.R.A. de Menezes, D.T. Carvalho, H.D.M. Coutinho, M.M.F. Fonteles, Unlocking bacterial defense: exploring the potent inhibition of NorA efflux pump by coumarin derivatives in *Staphylococcus aureus*, *Microb. Pathog.* 190 (2024) 106608, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106608>.
- [37] Z.M. Mirza, A. Kumar, N.P. Kalia, A. Zargar, I.A. Khan, Piperine as an inhibitor of the MdeA efflux pump of *Staphylococcus aureus*, *J. Med. Microbiol.* 60 (2011) 1472–1478, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033167-0>.
- [38] S. Alharthi, Z.M. Ziora, P.M. Moyle, Optimized protocols for assessing libraries of poorly soluble sortase A inhibitors for antibacterial activity against medically-relevant bacteria, toxicity and enzyme inhibition, *Bioorg. Med. Chem.* 52 (2021) 116527, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116527>.
- [39] S. Alharthi, A. Popat, Z.M. Ziora, P.M. Moyle, Sortase A inhibitor protein nanoparticle formulations demonstrate antibacterial synergy when combined with antimicrobial peptides, *Molecules* 28 (2023), <https://doi.org/10.3390/molecules28052114>.
- [40] Y. Guo, S. Cai, G. Gu, Z. Guo, Z. Long, Recent progress in the development of sortase A inhibitors as novel anti-bacterial virulence agents, *RSC Adv.* 5 (2015) 49880–49889, <https://doi.org/10.1039/c5ra07568h>.
- [41] G. Nitulescu, I.M. Nicorescu, O.T. Oлару, A. Ungurianu, D.P. Mihai, A. Zanfirescu, G.M. Nitulescu, D. Margina, Molecular docking and screening studies of new natural sortase A inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2217, <https://doi.org/10.3390/IJMS18102217>.
- [42] S. Cascioferro, M. Totsika, D. Schillaci, Sortase A: an ideal target for anti-virulence drug development, *Microb. Pathog.* 77 (2014) 105–112, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.007>.
- [43] I.V. da Cunha, D.D. da Silva Oliveira, G.G. Calefi, N.B.S. Silva, C.H.G. Martins, C. de O. Rezende Júnior, T.M. Tsubone, Photosensitizer associated with efflux pump inhibitors as a strategy for photodynamic therapy against bacterial resistance, *Eur. J. Med. Chem.* 284 (2025), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117197>.
- [44] A. Pietrowska, I. Holowacz, A. Ulatowska-Jarza, M. Guźniczak, A.K. Matczuk, A. Wieliczko, M. Wolf-Baca, I. Buzalewicz, The enhancement of antimicrobial photodynamic therapy of *Escherichia coli* by a functionalized combination of photosensitizers: in vitro examination of single cells by quantitative phase imaging, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 6137, <https://doi.org/10.3390/IJMS23116137>.
- [45] I. Buzalewicz, I. Holowacz, A.K. Matczuk, M. Guźniczak, D. Skrzela, M. Karwaiska, A. Wieliczko, K. Kowal, A. Ulatowska-Jarza, Photolon nanoporous photoactive material with antibacterial activity and label free noncontact method for free radical detection, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2021) 279, <https://doi.org/10.3390/IJMS23010279>.
- [46] I. Buzalewicz, A. Ulatowska-Jarza, A. Kaczorowska, M. Gąsior-Głogowska, H. Podbielska, M. Karwaiska, A. Wieliczko, A.K. Matczuk, K. Kowal, M. Kopyczyńska, Bacteria single-cell and photosensitizer interaction revealed by quantitative phase imaging, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 5068, <https://doi.org/10.3390/IJMS22105068>.
- [47] A. Pietrowska, M. Guźniczak, A. Kublicka, A. Matczuk, A. Wieliczko, A. Ulatowska-Jarza, I. Buzalewicz, Efflux pump inhibitors from plant compounds: a new strategy to modulate bacterial growth and morphology, *Ind. Crops Prod.* 233 (2025) 121378, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121378>.
- [48] P. Costa, A.T.P.C. Gomes, M. Braz, C. Pereira, A. Almeida, Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella*

A. Talarczyk et al.

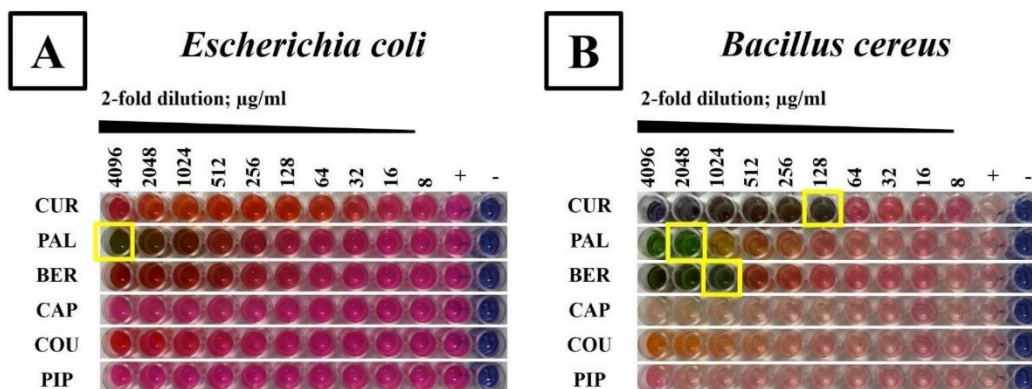
Biochemical and Biophysical Research Communications 797 (2026) 153214

- Typhimurium inactivation mediated by phages, *Antibiotics (Basel)* 10 (2021), <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10080974>.
- [49] C.H. Teh, W.A. Nazni, A.H. Nurulhusna, A. Norazali, H.L. Lee, Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay, *BMC Microbiol.* 17 (2017) 1–8, <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0936-3/TABLES/3>.
- [50] B. Kowalska Krochmal, R. Dudek Wicher, The Minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance, *Pathogens* 10 (2021) 1–21, <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020165>.
- [51] I. Buzalewicz, A. Kaczorowska, W. Fijałkowski, A. Pietrowska, A.K. Matczuk, H. Podbielska, A. Wieliczko, W. Witkiewicz, N. Jedruchiewicz, Quantifying the dynamics of bacterial biofilm formation on the surface of soft contact lens materials using digital holographic tomography to advance biofilm research, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (2024) 2653, <https://doi.org/10.3390/IJMS25052653/S1>.
- [52] J. Oh, J. Oh, J.S. Ryu, M. Lee, M. Lee, J. Jung, J. Jung, J. Han, S. Han, H. J. Chung, H.J. Chung, H.J. Chung, Y. Park, Y. Park, Y. Park, Three dimensional label-free observation of individual bacteria upon antibiotic treatment using optical diffraction tomography, *Biomed. Opt. Express* 11 (2020) 1257–1267, <https://doi.org/10.1364/BOE.377740>.
- [53] M. Friebe, M. Meinke, Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration, *Appl. Opt.* 45 (2006) 2838–2842, <https://doi.org/10.1364/AO.45.002838>.
- [54] D. Wojnicz, K. Korzeczka, M. Guźniczak, M. Wernicke, A. Ulatowska Jarza, I. Buzalewicz, D. Tichaczek-Goska, Can α -Mangostin and photodynamic therapy support ciprofloxacin in the inactivation of uropathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains? *Int. J. Mol. Sci.* 26 (2024) 76, <https://doi.org/10.3390/IJMS26010076>.
- [55] P.K. Jha, H. Dallagi, E. Richard, T. Benezech, C. Faillie, Formation and resistance to cleaning of biofilms at air-liquid-wall interface. Influence of bacterial strain and material, *Food Contam. 2020.107384*, <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107384>.
- [56] L.A.D.S. De Silva, G.J. Heo, Biofilm formation of pathogenic bacteria isolated from aquatic animals, *Arch. Microbiol.* 205 (2022) 1–10, <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03332-8>.
- [57] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 163–175, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- [58] M. Stavri, L.J.V. Piddock, S. Gibbons, Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources, *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (2007) 1247–1260, <https://doi.org/10.1093/JAC/DK1460>.
- [59] A. Banouniri, A.H. Ebrahimbadi, A. Mazochi, M. Behpour, F.J. Kashi, H. Batooli, Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Senecioia tragodioides* Boiss. from Iran, *Food Chem.* 122 (2010) 553–558, <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.009>.
- [60] M. Rajagopal, S. Walker, Envelope structures of gram-positive bacteria, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 404 (2017) 1, https://doi.org/10.1007/82_2015_5021.
- [61] A. Mehring, N. Erdmann, J. Walther, J. Stiefelmaier, D. Strieth, R. Ulber, A simple and low-cost resazurin assay for vitality assessment across species, *J. Biotechnol.* 333 (2021) 63–66, <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2021.04.010>.
- [62] S. George, M.R. Hamblin, A. Kishen, Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 788, <https://doi.org/10.1039/B809624D>.
- [63] J. Matsumoto, T. Matsumoto, K. Yasuda, M. Yasuda, J. Matsumoto, T. Matsumoto, K. Yasuda, M. Yasuda, Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with Cationic porphyrin sensitizers, *The Univ. Escherichia Coli* (2018), <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.82645>.
- [64] H.I. Zgurskaya, V.V. Rybenkov, Permeability barriers of Gram negative pathogens, *Ann N Y Acad Sci* 1459 (2020) 5–18, <https://doi.org/10.1111/NYAS.14134>.
- [65] R. Yamauchi, K. Kawano, Y. Yamaoka, A. Taniguchi, Y. Yano, K. Takasu, K. Matsuzaki, Development of antimicrobial peptide-antibiotic conjugates to improve the outer membrane permeability of antibiotics against gram-negative bacteria, *ACS Infect. Dis.* 8 (2022) 2339–2347, <https://doi.org/10.1021/ACSINFECTDIS.2C00406>.
- [66] J.M. Soto, J.A. Rodrigo, T. Alieva, Partially coherent optical diffraction tomography toward practical cell study, *Front. Phys.* 9 (2021) 666256, <https://doi.org/10.3389/FPHY.2021.666256/BIBTEX>.
- [67] P.S. Ocampo, V. Lázár, B. Papp, M. Arnoldini, P.A. Zur Wiesch, R. Busa-Fekete, G. Fekete, C. Pál, M. Ackermann, S. Bouhoeffler, Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 4573, <https://doi.org/10.1128/AAC.02463-14>.
- [68] D. Serbanescu, N. Ojkie, S. Banerjee, Cellular resource allocation strategies for cell size and shape control in bacteria, *FEBS J.* 289 (2021) 7891–7906, <https://doi.org/10.1111/febs.16234>.
- [69] F. Feijó Delgado, N. Cermak, V.C. Hecht, S. Son, Y. Li, S.M. Knudsen, S. Olcum, J. M. Higgins, J. Chen, W.H. Grover, S.R. Manalis, Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells, *PLoS One* 8 (2013) e67590, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067590>.
- [70] P.Y. Liu, L.K. Chin, W. Ser, H.F. Chen, C.M. Hsieh, C.H. Lee, K.B. Sung, T.C. Ayi, P. H. Yap, B. Liedberg, K. Wang, T. Bourouina, Y. Leprince-Wang, Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future, *Lab Chip* 16 (2016) 634–644, <https://doi.org/10.1039/C5LC01445J>.
- [71] E. Alves, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A. Cunha, J. Tome, A. Almeida, An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation, *Future Med. Chem.* 6 (2014) 141–164, <https://doi.org/10.4155/FMC.13.211>.
- [72] J. Oh, J.S. Ryu, M. Lee, J. Jung, S. Han, H.J. Chung, Y. Park, Three-dimensional label-free observation of individual bacteria upon antibiotic treatment using optical diffraction tomography, *Biomed. Opt. Express* 11 (2020) 1257, <https://doi.org/10.1364/BOE.377740>.
- [73] M. Lam, M.L. Dimuano, P. Oyetakin White, M.A. Retuerto, J. Chandra, P. K. Mukherjee, M.A. Ghannoum, K.D. Cooper, E.D. Baron, Silicon Phthalocyanine 4 Phototoxicity in *Trichophyton rubrum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 3029, <https://doi.org/10.1128/AAC.01448-13>.
- [74] J. Shin, G. Kim, J. Park, M. Lee, Y.K. Park, Long-term label-free assessments of individual bacteria using three-dimensional quantitative phase imaging and hydrogel based immobilization, *Sci. Rep.* 13 (2023) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27158-y>.

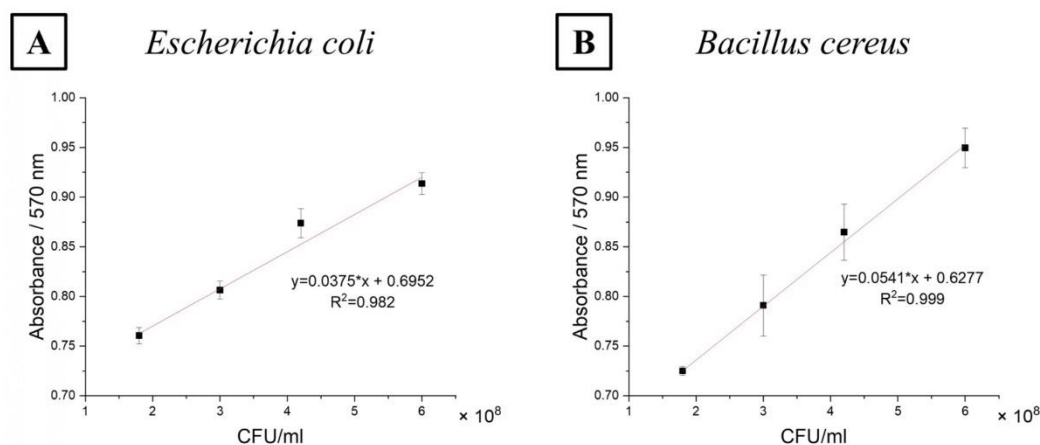
Supplementary Materials

Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*

Supplementary Figure 1 Location of bacteria in the sample after at least 24 hours incubation.



Supplementary Figure 2 Test plates after 24 h in modified resazurin assay using the CLSI broth microdilution (BMD) method in the presence of 5% (v/v) DMSO in TSB. The MIC determined after resazurin addition is indicated by yellow squares for (A) *Escherichia coli*, (B) *Bacillus cereus*. Lanes marked '+' contain bacteria, but no EPI. Lanes marked '-' contain media with no bacteria or EPI added, n = 3 (3 × 1)



Supplementary Figure 3 The standard calibration for the quantification of resorufin product. The absorbance measurement was performed at 570 nm for (A) *Escherichia coli*, (B) *Bacillus cereus*, n = 6 (1 × 6).

Supplementary Table 1 The p-values obtained by testing the assumptions of normality of distribution and homogeneity of variance for resazurin absorbance values.

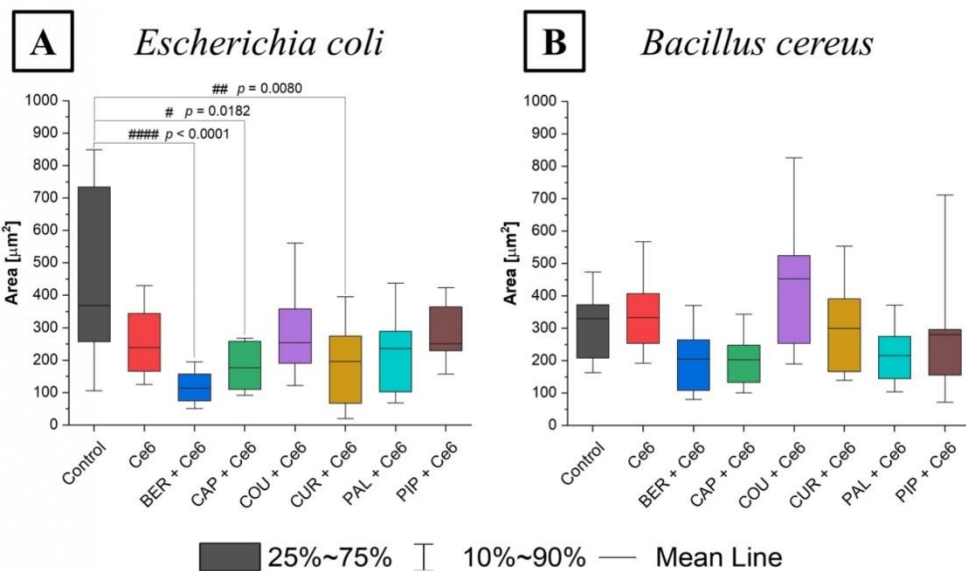
	Control	BER	CAP	COU	CUR	PAL	PIP	1 % DMSO v/v PBS	
<i>E.coli</i>	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	0.98	0.30	0.03	0.56	0.03	0.14	1	0.50
	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)				0.002				
<i>B.cereus</i>	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	0.002	0.23	0.33	0.10	0.30	0.23	0.55	0.38
	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)				0.002				

Supplementary Table 2 The p-values obtained by testing the assumptions of normality of distribution and homogeneity of variance for CTCF per area.

	Ce6	BER + Ce6	CAP + Ce6	COU + Ce6	CUR + Ce6	PAL + Ce6	PIP + Ce6	
<i>E.coli</i>	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	0.36	0.36	0.85	0.96	-	0.43	0.47
	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)				< 0.0001			
<i>B.cereus</i>	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	0.90	0.56	1	0.83	0.41	0.90	0.86
	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)				0.001			

Supplementary Table 3 The p-value obtained by testing the assumptions of normality of distribution and homogeneity of variance for RI value of the cells.

	Control	Ce6	BER + Ce6	CAP + Ce6	COU + Ce6	CUR + Ce6	PAL + Ce6	PIP + Ce6	
<i>E.coli</i>	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	0.40	0.48	0.17	0.37	0.86	0.68	1	1
	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)				4.3 × 10 ⁻⁴				
<i>B.cereus</i>	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	1	0.85	0.58	0.22	0.37	0.43	1	0.51
	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)				0.09				



Supplementary Figure 4 The changes of areas occupied by cells after 24 h incubation with and without PS or PS and EPI (A) *Escherichia coli*, (B) *Bacillus cereus*, n = 20 (4 × 5). (#) results of Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

Supplementary Table 4 The p-value obtained by testing the assumptions of normality of distribution and homogeneity of variance for refractive index value of the cells 24 h after irradiation (hv+) and dark-control (hv-).

		<i>E.coli</i>		<i>B.cereus</i>	
		Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)
Control	hv-	0.49	<0.0001	0.86	0.73
	hv+	0.83		0.97	
Ce6	hv-	1	0.52	1	<0.0001
	hv+	1		0.90	

BER + Ce6	hv-	0.41	<0.0001	0.89	0.89
	hv+	0.53		1	
CAP + Ce6	hv-	0.17	<0.0001	0.60	0.19
	hv+	0.78		1	
COU + Ce6	hv-	1	0.78	1	0.053
	hv+	1		0.75	
CUR + Ce6	hv-	0.36	1.6×10^{-4}	1	0.047
	hv+	0.48		1	
PAL + Ce6	hv-	0.30	0.71	0.65	0.03
	hv+	0.65		0.71	
PIP + Ce6	hv-	1	0.11	1	0.48
	hv+	0.71		0.59	

Supplementary Table 5 The p-value obtained by testing the assumptions of normality of distribution and homogeneity of variance for dry mass density of the cells after 24 h incubation and 24 h after irradiation.

		<i>E.coli</i>		<i>B.cereus</i>	
		Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)	Normality test (Kolmogorov-Smirnov)	Homogeneity of variance (Brown-Forsythe)
Ce6	hv-	0.18	0.16	0.57	0.01
	hv+	0.54		1	
BER + Ce6	hv-	0.50	<0.0001	0.89	0.16
	hv+	1		0.98	
CAP + Ce6	hv-	0.34	0.15	0.23	0.25
	hv+	0.80		1	
COU + Ce6	hv-	0.92	0.45	0.40	0.49
	hv+	1		0.74	
CUR + Ce6	hv-	0.65	0.005	0.41	0.006

	hv+	0.40		1	
PAL + Ce6	hv-	1		1	
	hv+	0.58	0.72	0.74	0.71
	hv-	1		0.51	
PIP + Ce6	hv-		0.43		0.82
	hv+	0.7162		0.61	

4. Podsumowanie i kierunek przyszłych badań

Publikacje wchodzące w skład cyklu odnoszą się bezpośrednio do hipotez badawczych przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, których celem było opracowanie alternatywnych strategii przeciwbakteryjnych w oparciu o związki pochodzenia naturalnego, ukierunkowanych na modulację fizjologii bakterii poprzez hamowanie aktywności pomp efflux oraz ilościową ocenę skutków tych oddziaływań na poziomie pojedynczych komórek z wykorzystaniem DHT.

Punktem wyjścia prowadzonych badań było założenie, że pompy efflux pełnią w komórkach bakteryjnych rolę znacznie szerszą niż jedynie mechanizm oporności na antybiotyki, a ich częściowe hamowanie może prowadzić do istotnych zmian w morfologii i rozwoju struktur bakteryjnych, niewymagających stosowania dawek bakteriobójczych.

Badania przeprowadzono na wybranych gatunkach bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) oraz Gram-dodatnich (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*), co umożliwiło analizę wpływu proponowanych terapii w odniesieniu do drobnoustrojów o odmiennej budowie ściany komórkowej, morfologii oraz zróżnicowaniu w występujących pompach efflux. W przypadku gatunków należących do bakterii Gram-ujemnych dominującą rodziną pomp efflux jest RND, natomiast w przypadku *E. coli* można wyróżnić również pompy efflux z rodzin MFS oraz MATE. *B. cereus* posiada głównie pompy efflux z rodzin MFS i ABC, jednakże występują w przypadku tego gatunku również pompy należące do RND, MATE oraz SMR. Wybrane gatunki są powszechnie spotykane zarówno w zakażeniach klinicznych, jak i w środowisku naturalnym oraz klasyfikowane jako patogeny kategorii II, co dodatkowo uzasadnia ich dobór jako modeli badawczych.

W ramach cyklu publikacji zaproponowano zastosowanie terapii kombinowanych opartych na PSs – anionowym Chlorin e6 oraz kationowym Pheophorbide a – a także inhibitorach pomp efflux pochodzenia naturalnego. Dobór EPI wynikał z ich udokumentowanej aktywności biologicznej, niskiej toksyczności oraz potencjału do działania w stężeniach subinhibitoryjnych. Do ilościowej analizy efektów oddziaływania EPI oraz terapii skojarzonych zastosowano zestaw komplementarnych metod pomiarowych, obejmujących bioreaktor z odwróconym wirowaniem do monitorowania dynamiki wzrostu populacji bakteryjnych oraz DHT do bezznacznikowego obrazowania i analizy zmian biofizycznych na poziomie pojedynczych komórek.

Zaproponowano wykorzystanie terapii kombinowanej w oparciu o dwa fotouczulacze anionowy Chlorin e6 i kationowy Pheophorbide a (**Publikacja 1**), jak i sześć EPI pochodzenia naturalnego w połączeniu z PS (**Publikacja 3**). Ponadto, korzystając z bioreaktora, ilościowo przeanalizowano jak dodatek EPI wpływa na rozwój hodowli bakteryjnej czterech gatunków

bakterii oraz zbadano zdolność inkubowanych komórek bakteryjnych do tworzenia skupisk na podłożu agarowym, wykorzystując DHT (**Publikacja 2**).

Najważniejsze wyniki cyklu publikacji wykazały, że kombinacja PSs o uzupełniających się właściwościach fizykochemicznych prowadzi do zwiększonej akumulacji PSs wewnątrz komórek bakteryjnych, co przekłada się na wyższą efektywność terapii. Potwierdziłam, że skuteczność terapii kombinowanej, wynosząca 29,45%, przewyższa skuteczność monoterapii: uzyskano skuteczność wynoszącą 13,77% w przypadku Chlorin e6 i 16,15% w przypadku Pheophorbide a. Potwierdziłam również, że EPI stosowane w stężeniach znacznie niższych niż MIC wywierają bezpośredni wpływ na rozwój populacji bakteryjnych oraz organizację przestrzenną struktur tworzonych przez bakterie. W przeciwieństwie do większości dotychczasowych doniesień, koncentrujących się na roli EPIs głównie jako adiuwantów antybiotykowych, przeprowadzone badania potwierdziły, że częściowe hamowanie aktywności transporterów błonowych prowadzi do istotnych zmian fenotypowych niezależnych od efektu zahamowania wzrostu. Tym samym wykazałam, że pompy efflux odgrywają kluczową rolę w formowaniu struktur przestrzennych. W trzeciej publikacji udowodniłam, że wykorzystanie niskich stężeń wybranych EPIs ($< 0,25$ MIC) prowadziło do bardziej efektywnej akumulacji PS wewnątrz komórek bakteryjnych, co przełożyło się na wyraźny wzrost skuteczności aPDT. W przypadku *Bacillus cereus* zastosowanie piperyny w połączeniu z Chlorin e6 prowadziło do istotnego zwiększenia skuteczności terapii fotodynamicznej, które wynosiło 273,90% względem strategii opierającej się wyłącznie na PS. Z kolei u *Escherichia coli* kombinacja berberyny z Chlorin e6 skutkowała wzrostem efektu terapeutycznego o 227,72% w porównaniu z terapią opartą jedynie na PS. Istotnym elementem nowości zaproponowanego podejścia było również wykorzystanie DHT jako ilościowej techniki pomiarowej w badaniach nad aPDT i EPI.

Wyniki te zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych, a ich realizacja była możliwa dzięki interdyscyplinarnej współpracy z zespołami mikrobiologicznymi Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Wykorzystanie technik takich jak DHT, mikroskopia konfokalna czy bioreaktor z odwróconym wirowaniem, które są stosunkowo proste w adaptacji w laboratoriach biologicznych, toksykologicznych i medycznych, co może umożliwić szerokie zastosowanie metod ilościowej analizy zmian wewnątrzkomórkowych bez konieczności stosowania znaczników, co mogłoby uprościć protokoły badawcze i skrócić czas diagnostyczny, zarówno w warunkach badawczych, jak i diagnostyki klinicznej i weterynaryjnej. Te metody mogą być alternatywą w kontekście klasycznych technik mikrobiologicznych. Zaproponowane w publikacjach nowe strategie walki z bakteriami

oraz zastosowanie techniki pomiarowej dotychczas nie stosowanej w tym kontekście – DHT, mogą przyczynić się do opracowania skutecznej metody inaktywacji komórek i śledzenia zachodzących zmian na poziomie pojedynczych komórek, a co za tym idzie – mogłyby przynieść znaczący postęp w rozwoju nowych kierunków terapii przeciwbakteryjnej.

Stworzona na potrzeby tych obserwacji procedura przygotowania próbki może zostać wykorzystana w innych badaniach, w których istotne jest śledzenie zmian zachodzących już od pojedynczej komórki bakteryjnej (Pietrowska et al., 2025). Wykorzystanie związków pochodzenia naturalnego jest widocznym trendem w badaniach naukowych poświęconych nowym strategiom terapeutycznym, nie tylko w kontekście infekcji bakteryjnych (Choi et al., 2025; Liu et al., 2025; Uccachón et al., 2025). Przeprowadzone badania wpisują się w priorytetowe kierunki rozwoju terapii przeciwbakteryjnych, a prezentowane wyniki udowadniają, że zaproponowane kombinacje wykazują potencjał w zastosowaniach antybakteryjnych, nie tylko w kontekście klinicznym, ale również przemysłowym.

Zastosowanie terapii kombinowanej w leczeniu infekcji bakteryjnych mogłoby przynieść znaczący postęp w rozwoju terapii przeciwbakteryjnej. Wiele badań wskazuje, że substancje pochodzenia naturalnego wykazują działanie przeciwbakteryjne i mogą pełnić rolę EPI, przyczyniając się do ponownego uwrażliwienia bakterii na substancje, na które były odporne i wzmacniając efekt stosowanej terapii, działając jako adiuwanty antybiotykowe (Kalia et al., 2012; Negi et al., 2014; Prasch et al., 2019; Setiawan et al., 2021). Z punktu widzenia praktyki klinicznej proponowane podejścia mają potencjał skrócenia czasu leczenia i zwiększenia skuteczności leczenia przewlekłych zakażeń bakteryjnych. Dalsze prace mogą prowadzić do opracowania zestawów PS + EPI celowanych w konkretne gatunki bakterii w celu zwalczania zakażeń szpitalnych, pielęgnacji ran (stopa cukrzycowa, odleżyny), tworzenia opatrunków antybakteryjnych czy dezynfekcji powierzchni. Potencjalnym obszarem zastosowań tak opracowanych zestawów są fotoaktywne maści i żele do stosowania na rany zewnętrzne oraz powłoki powierzchni medycznych.

W kontekście zdrowia publicznego oraz środowiskowym, zastosowanie EPIs i aPDT może mieć wpływ na ograniczenie transmisji zakażeń poprzez dezaktywację patogenów w środowisku – na przykład w kontekście uzdatniania wody, dezynfekcji powierzchni publicznych czy kontroli mikrobiologicznej w systemach wentylacyjnych i uzdatniania ścieków. Metody te mogą być stosowane jako alternatywa lub uzupełnienie klasycznych środków chemicznych, które bywają nieskuteczne wobec bakterii lub pozostawiają toksyczne produkty. Dzięki zastosowaniu zaproponowanych metod ryzyko rozprzestrzeniania się opornych szczepów w środowisku może ulec znacznemu ograniczeniu.

EPIs znaleźć mogą również zastosowanie w przemyśle, jako składnik produktów mający za zadanie ograniczać rozwój bakterii i przedłużający ich trwałość. W ten sposób możliwe będzie zastąpienie syntetycznych konserwantów związkami pochodzenia roślinnego, co wpisuje się w ideę czystej etykiety (Vashisht et al., 2025). Mogą zostać również wykorzystane jako związki, którymi będą domieszkowane opakowania produktów bądź powłoki różnych urządzeń. Ponadto kombinowana terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem EPI może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, zarówno w zakładach produkcyjnych, jak i przetwarzających żywność. Pozwoli to na ograniczenie kontaminacji produktów na jakimkolwiek etapie ich wytwarzania, przez co zostanie zwiększone bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności.

W celu wprowadzenia zaproponowanych kombinacji do użytku komercyjnego, konieczne jest prowadzenie dalszych badań, które potwierdzą ich skuteczność dla konkretnych gatunków bakterii, ale i ich warunków środowiskowych. Istotne jest również szczegółowe poznanie mechanizmów działania EPI na komórki bakteryjne.

Podsumowując, wyniki uzyskane w oparciu o trzy analizowane publikacje wskazują, że strategia łącząca celowane EPI z aPDT oraz zaawansowane techniki ilościowego obrazowania mogą znaleźć zastosowanie w znacznym zwiększeniu skuteczności terapii przeciwbakteryjnych, ograniczeniu formowania się struktur bakteryjnych oraz redukcji transmisji zakażeń w szerokim spektrum kontekstów zdrowotnych i środowiskowych. Realizacja tych podejść może przyczynić się do bardziej efektywnej kontroli zakażeń bakteryjnych, ograniczenia stosowania antybiotyków oraz wspierania zrównoważonych praktyk w ochronie zdrowia ludzi, zwierząt, roślin oraz środowiska.

Bibliografia

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *The Biochemical Journal*, 473(4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Aghayan, S. S., Mogadam, H. K., Fazli, M., Darban-Sarokhalil, D., Khoramrooz, S. S., Jabalameli, F., Yaslianifard, S., & Mirzaei, M. (2017). The Effects of Berberine and Palmatine on Efflux Pumps Inhibition with Different Gene Patterns in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Infections. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 9(1), 2. [/pmc/articles/PMC5219818/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35219818/)
- Akhtar, A. A., & Turner, D. P. (2022). The role of bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and virulence: Therapeutic and vaccine potential. *Microbial Pathogenesis*, 171, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105734>
- Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Alenazy, R. (2022). Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli*. *Biology*, 11(9), 1328. <https://doi.org/10.3390/biology11091328>
- Alharthi, S., Popat, A., Ziora, Z. M., & Moyle, P. M. (2023). Sortase A Inhibitor Protein Nanoparticle Formulations Demonstrate Antibacterial Synergy When Combined with Antimicrobial Peptides. *Molecules*, 28(5), 2114. <https://doi.org/10.3390/molecules28052114>
- Alharthi, S., Ziora, Z. M., & Moyle, P. M. (2021). Optimized protocols for assessing libraries of poorly soluble sortase A inhibitors for antibacterial activity against medically-relevant bacteria, toxicity and enzyme inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 52, 116527. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116527>
- Allel, K., Hernández-Leal, M. J., Naylor, N. R., Undurraga, E. A., Abou Jaoude, G. J., Bhandari, P., Flanagan, E., Haghparast-Bidgoli, H., Pouwels, K. B., & Yakob, L. (2024). Costs-effectiveness and cost components of pharmaceutical and non-pharmaceutical interventions affecting antibiotic resistance outcomes in hospital patients: a systematic literature review. *BMJ Global Health*, 9(2), 13205. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2023-013205>
- Al-Mutairi, R., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. (2018). Sublethal Photodynamic Treatment Does Not Lead to Development of Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 9, 373827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01699>
- Almutairy, B. (2024). Extensively and multidrug-resistant bacterial strains: case studies of antibiotics resistance. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1381511. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1381511>
- Alshehrei, F. M. (2024). Microbiological Quality Assessment of Skin and Body care Cosmetics by using Challenge test. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 31(4), 103965. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103965>
- Alves, A., Viveiros, C., Lopes, J., Nogueira, A., Pires, B., Afonso, A. F., & Teixeira, C. (2021). Microbiological Contamination in Different Food Service Units Associated with Food Handling. *Applied Sciences*, 11(16), 7241. <https://doi.org/10.3390/app11167241>

- Alves, E., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, A., Tome, J., & Almeida, A. (2014). An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Medicinal Chemistry*, 6(2), 141–164. <https://doi.org/10.4155/FMC.13.211>
- Arnold, A. (2026). Healthcare-associated infections. *Medicine*, 54(1), 47–50. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2025.10.011>
- Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T., & Taher, I. (2011). Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *The Libyan Journal of Medicine*, 6(1), 5870. <https://doi.org/10.3402/LJM.V6I0.5870>
- Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Behpour, M., Kashi, F. J., & Batooli, H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. *Food Chemistry*, 122(3), 553–558. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.009>
- Bay, D. C., Rommens, K. L., & Turner, R. J. (2008). Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1814–1838. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2007.08.015>
- Bay, D. C., & Turner, R. J. (2009). Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-140>
- Belay, W. Y., Getachew, M., Tegegne, B. A., Teffera, Z. H., Dagne, A., Zeleke, T. K., Abebe, R. B., Gedif, A. A., Fenta, A., Yirdaw, G., Tilahun, A., & Aschale, Y. (2024). Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1444781. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1444781>
- Bohnert, J. A., & Kern, W. V. (2005). Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 849–852. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.849-852.2005>
- Bolla, J. R., Howes, A. C., Fiorentino, F., & Robinson, C. V. (2020). Assembly and regulation of the chlorhexidine-specific efflux pump AceI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(29), 17011–17018. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2003271117>
- Buzalewicz, I., Hołowacz, I., Matczuk, A. K., Guźniczka, M., Skrzela, D., Karwańska, M., Wieliczko, A., Kowal, K., & Ulatowska-Jarża, A. (2021). Photolon Nanoporous Photoactive Material with Antibacterial Activity and Label-Free Noncontact Method for Free Radical Detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 279. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010279>
- Buzalewicz, I., Ulatowska-Jarża, A., Kaczorowska, A., Gašior-Głogowska, M., Podbielska, H., Karwańska, M., Wieliczko, A., Matczuk, A. K., Kowal, K., & Kopaczyńska, M. (2021). Bacteria single-cell and photosensitizer interaction revealed by quantitative phase imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5068. <https://doi.org/10.3390/IJMS22105068>
- Cayron, J., Dedieu-Berne, A., & Lesterlin, C. (2023). Bacterial filaments recover by successive and accelerated asymmetric divisions that allow rapid post-stress cell proliferation. *Molecular Microbiology*, 119(2), 237–251. <https://doi.org/10.1111/MMI.15016>
- Chan, B. C. L., Ip, M., Lau, C. B. S., Lui, S. L., Jolivald, C., Ganem-Elbaz, C., Litaudon, M., Reiner, N. E., Gong, H., See, R. H., Fung, K. P., & Leung, P. C. (2011). Synergistic effects of baicalein with

- ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 767–773. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2011.06.039>
- Chen, K., Liu, X., Song, L., Wang, Y., Zhang, J., Song, Y., Zhuang, H., Shen, J., Yang, J., Peng, C., Zang, J., Yang, Q., Li, D., Gupta, T. B., Guo, D., & Li, Z. (2025). The Antibacterial Activities and Effects of Baicalin on Ampicillin Resistance of MRSA and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 22(7), 477–488. <https://doi.org/10.1089/FPD.2024.0074>
- Chetri, S. (2023). The culmination of multidrug-resistant efflux pumps vs. meager antibiotic arsenal era: Urgent need for an improved new generation of EPIs. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1149418. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1149418>
- Chetri, S., Bhowmik, D., Paul, D., Pandey, P., Chanda, D. D., Chakravarty, A., Bora, D., & Bhattacharjee, A. (2019). AcrAB-TolC efflux pump system plays a role in carbapenem non-susceptibility in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 19(1), 210. <https://doi.org/10.1186/S12866-019-1589-1>
- Choi, S. G., Shin, M., & Kim, W. Y. (2025). Targeting the DNA damage response (DDR) of cancer cells with natural compounds derived from *Panax ginseng* and other plants. *Journal of Ginseng Research*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.JGR.2024.04.001>
- Chowdhury, N., Suhani, S., Purkaystha, A., Begum, M. K., Raihan, T., Alam, Md. J., Islam, K., & Azad, A. K. (2019). Identification of AcrAB-TolC Efflux Pump Genes and Detection of Mutation in Efflux Repressor AcrR from Omeprazole Responsive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Causing Urinary Tract Infections. *Microbiology Insights*, 12, 117863611988962. <https://doi.org/10.1177/1178636119889629>
- Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., & Maisch, T. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>
- Ciusa, M. L., Marshall, R. L., Ricci, V., Stone, J. W., & Piddock, L. J. V. (2022). Absence, loss-of-function, or inhibition of *Escherichia coli* AcrB does not increase expression of other efflux pump genes supporting the discovery of AcrB inhibitors as antibiotic adjuvants. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 633–640. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB452>
- Compagne, N., Vieira Da Cruz, A., Müller, R. T., Hartkoorn, R. C., Flipo, M., & Pos, K. M. (2023). Update on the Discovery of Efflux Pump Inhibitors against Critical Priority Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 12(1), 180. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12010180>
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2013.02.009>
- Cui, S., Guo, X., Wang, S., Wei, Z., Huang, D., Zhang, X., Zhu, T. C., & Huang, Z. (2024). Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals*, 17(10), 1274. <https://doi.org/10.3390/PH17101274>
- da Cunha, I. V., da Silva Oliveira, D. D., Calefi, G. G., Silva, N. B. S., Martins, C. H. G., Rezende Júnior, C. de O., & Tsubone, T. M. (2025). Photosensitizer associated with efflux pump inhibitors as a strategy for photodynamic therapy against bacterial resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 284, 117197. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117197>

- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317–364. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>
- Dé, E., Baslé, A., Jaquinod, M., Saint, N., Malléa, M., Molle, G., & Pagès, J. M. (2001). A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Molecular Microbiology*, 41(1), 189–198. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02501.X>
- De Gaetano, G. V., Lentini, G., Famà, A., Coppolino, F., & Beninati, C. (2023). Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps. *Antibiotics*, 12(6), 965. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12060965>
- Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 7(3), 66. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS7030066>
- Du, D., van Veen, H. W., Murakami, S., Pos, K. M., & Luisi, B. F. (2015). Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, 33, 76–91. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2015.07.015>
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523–539. <https://doi.org/10.1038/S41579-018-0048-6>
- Duda-Madej, A., Viscardi, S., Niezgodka, P., Szewczyk, W., & Wińska, K. (2025). The Impact of Plant-Derived Polyphenols on Combating Efflux-Mediated Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9), 4030. <https://doi.org/10.3390/IJMS26094030>
- Feng, X., Wang, K., Cao, S., Ding, L., & Qiu, F. (2021). Pharmacokinetics and Excretion of Berberine and Its Nine Metabolites in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 594852. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.594852>
- Fiedler, S., Bender, J. K., Klare, I., Halbedel, S., Grohmann, E., Szewczyk, U., & Werner, G. (2016). Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(4), 871–881. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKV420>
- Fitzpatrick, A. W. P., Llabrés, S., Neuberger, A., Blaza, J. N., Bai, X. C., Okada, U., Murakami, S., Van Veen, H. W., Zachariae, U., Scheres, S. H. W., Luisi, B. F., & Du, D. (2017). Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nature Microbiology*, 2(7), 1–8. <https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2017.70>
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2048009/>
- Fongang, H., Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2023). Global burden of bacterial infections and drug resistance. *Advances in Botanical Research*, 106, 1–20. <https://doi.org/10.1016/BS.ABR.2022.08.001>

- Friebel, M., & Meinke, M. (2006). Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration. *Applied Optics*, *45*(12), 2838–2842. <https://doi.org/10.1364/AO.45.002838>
- Fujita, M., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2005). Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Immunology*, *49*(4), 391–396. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2005.TB03732.X>
- Gajic, I., Tomic, N., Lukovic, B., Jovicevic, M., Kekic, D., Petrovic, M., Jankovic, M., Trudic, A., Mitic Culafic, D., Milenkovic, M., & Opavski, N. (2025). A Comprehensive Overview of Antibacterial Agents for Combating Multidrug-Resistant Bacteria: The Current Landscape, Development, Future Opportunities, and Challenges. *Antibiotics*, *14*(3), 221. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14030221>
- Galgano, M., Pellegrini, F., Catalano, E., Capozzi, L., Del Sambro, L., Sposato, A., Lucente, M. S., Vasinioti, V. I., Catella, C., Odigie, A. E., Tempesta, M., Pratelli, A., & Capozza, P. (2025). Acquired Bacterial Resistance to Antibiotics and Resistance Genes: From Past to Future. *Antibiotics*, *14*(3), 222. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14030222>
- Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S., & Pathania, R. (2023). Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology (United Kingdom)*, *169*(5), 001333. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.001333>
- Ghazal, T. S. A., Schelz, Z., Vidács, L., Szemerédi, N., Veres, K., Spengler, G., & Hohmann, J. (2022). Antimicrobial, Multidrug Resistance Reversal and Biofilm Formation Inhibitory Effect of *Origanum majorana* Extracts, Essential Oil and Monoterpenes. *Plants*, *11*(11), 1432. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11111432>
- Giannakara, M., & Koumandou, V. L. (2022). Evolution of two-component quorum sensing systems. *Access Microbiology*, *4*(1). <https://doi.org/10.1099/ACMI.0.000303>
- Guo, Y., Cai, S., Gu, G., Guo, Z., & Long, Z. (2015). Recent progress in the development of sortase A inhibitors as novel anti-bacterial virulence agents. *RSC Advances*, *5*(62), 49880–49889. <https://doi.org/10.1039/C5RA07568H>
- Hasdemir, U. O., Chevalier, J., Nordmann, P., & Pagès, J. M. (2004). Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(6), 2701–2706. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2701-2706.2004>
- Hassan, K. A., Fagerlund, A., Elbourne, L. D. H., Vörös, A., Kroeger, J. K., Simm, R., Tourasse, N. J., Finke, S., Henderson, P. J. F., Økstad, O. A., Paulsen, I. T., & Kolstø, A. B. (2017). The putative drug efflux systems of the *Bacillus cereus* group. *PLOS ONE*, *12*(5), e0176188. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176188>
- Hassan, K. A., Liu, Q., Elbourne, L. D. H., Ahmad, I., Sharples, D., Naidu, V., Chan, C. L., Li, L., Harborne, S. P. D., Pokhrel, A., Postis, V. L. G., Goldman, A., Henderson, P. J. F., & Paulsen, I. T. (2018). Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Research in Microbiology*, *169*(7–8), 450–454. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2018.01.001>

- Hassan, K. A., Liu, Q., Henderson, P. J. F., & Paulsen, I. T. (2015). Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems. *MBio*, *6*(1), e01982-14. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01982-14>
- Huang, Lulu, Wu, C., Gao, H., Xu, C., Dai, M., Huang, Lingli, Hao, H., Wang, X., & Cheng, G. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics*, *11*(4), 520. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11040520>
- Huo, T., Zhang, W., Yu, Z., Zheng, W., Wu, Y., Ren, Q., Wan, Z., Cao, J., Wang, Z., & Shi, X. (2025). In situ structure and assembly of the ABC-type tripartite pump MacAB-TolC. *Communications Biology*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/S42003-025-08236-Z>
- Hurst, A. N., Scarbrough, B., Saleh, R., Hovey, J., Ari, F., Goyal, S., Chi, R. J., Troutman, J. M., & Vivero-Escoto, J. L. (2019). Influence of cationic meso-substituted porphyrins on the antimicrobial photodynamic efficacy and cell membrane interaction in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1), 134. <https://doi.org/10.3390/ijms20010134>
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Weaver, N. D., Wool, E. E., Han, C., Hayoon, A. G., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-Elsalam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., ... Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, *400*(10369), 2221–2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Iskandar, K., Ahmed, N., Paudyal, N., Ruiz Alvarez, M. J., Balasubramani, S. P., Saadeh, D., Ullah Baig, S., Sami, H., Hammoudi Halat, D., Pavlović, N., Roques, C., Rizvi, M., Salameh, P., Hamed, F., & Van Dongen, M. (2025). Essential Oils as Antimicrobial Agents Against WHO Priority Bacterial Pathogens: A Strategic Review of In Vitro Clinical Efficacy, Innovations and Research Gaps. *Antibiotics*, *14*(12), 1250. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14121250>
- Jo, I., Hong, S., Lee, M., Song, S., Kim, J. S., Mitra, A. K., Hyun, J., Lee, K., & Ha, N. C. (2017). Stoichiometry and mechanistic implications of the MacAB-TolC tripartite efflux pump. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *494*(3–4), 668–673. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.10.102>
- Joshi, P., Singh, S., Wani, A., Sharma, S., Jain, S. K., Singh, B., Gupta, B. D., Satti, N. K., Koul, S., Khan, I. A., Kumar, A., Bharate, S. B., & Vishwakarma, R. A. (2014). Osthonol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. *MedChemComm*, *5*(10), 1540–1547. <https://doi.org/10.1039/C4MD00196F>
- Kalia, N. P., Mahajan, P., Mehra, R., Nargotra, A., Sharma, J. P., Koul, S., & Khan, I. A. (2012). Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(10), 2401–2408. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS232>
- Kanagaratnam, R., Sheikh, R., Alharbi, F., & Kwon, D. H. (2017). An efflux pump (MexAB-OprM) of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with antibacterial activity of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine*, *36*, 194–200. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2017.10.010>
- Kermani, A. A., Macdonald, C. B., Burata, O. E., Ben Koff, B., Koide, A., Denbaum, E., Koide, S., & Stockbridge, R. B. (2020). The structural basis of promiscuity in small multidrug resistance transporters. *Nature Communications*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19820-8>

- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S13756-019-0559-6>
- Khan, F., Jeong, G. J., Tabassum, N., Mishra, A., & Kim, Y. M. (2022). Filamentous morphology of bacterial pathogens: regulatory factors and control strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18), 5835–5862. <https://doi.org/10.1007/S00253-022-12128-1>
- Khan, S., Khan, S. N., Akhtar, F., Misba, L., Meena, R., & Khan, A. U. (2020). Inhibition of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*: Nanoparticles induced photoinactivation in presence of efflux pump inhibitor. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 157, 165–174. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2020.10.007>
- Kim, H. W., Seok, Y. S., Cho, T. J., & Rhee, M. S. (2020). Risk factors influencing contamination of customized cosmetics made on-the-spot: Evidence from the national pilot project for public health. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57978-9>
- Knight, D. B., Rudin, S. D., Bonomo, R. A., & Rather, P. N. (2018). *Acinetobacter nosocomialis*: Defining the Role of Efflux Pumps in Resistance to Antimicrobial Therapy, Surface Motility, and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1902. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01902>
- Lam, M., Dimaano, M. L., Oyetakin-White, P., Retuerto, M. A., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A., Cooper, K. D., & Baron, E. D. (2014). Silicon Phthalocyanine 4 Phototoxicity in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6), 3029. <https://doi.org/10.1128/AAC.01448-13>
- Lamarche, M. G., & Déziel, E. (2011). MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One*, 6(9), e24310. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024310>
- Lamers, R. P., Cavallari, J. F., & Burrows, L. L. (2013). The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *PLOS ONE*, 8(3), e60666. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060666>
- Lange, N., Szlasa, W., Saczko, J., Chwilkowska, A., Wojcik, M., Preis, E., & Litscher, G. (2021). Potential of Cyanine Derived Dyes in Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*, 13(6), 818. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13060818>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Sánchez Valenzuela, A., Casado Muñoz, M. del C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiology*, 44, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.009>
- Liu, Y., Zhu, J., Liu, Z., Zhi, Y., Mei, C., & Wang, H. (2025). Flavonoids as Promising Natural Compounds for Combating Bacterial Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(6), 2455. <https://doi.org/10.3390/IJMS26062455>
- Liu, Y., Zhu, R., Liu, X., Li, D., Guo, M., Fei, B., Ren, Y., You, X., & Li, Y. (2023). Effect of piperine on the inhibitory potential of MexAB-OprM efflux pump and imipenem resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 185, 106397. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2023.106397>

- Llor, C., & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5(6), 229. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(1), 135. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5369031/>
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., & Lee, V. J. (2001). Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 105–116. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.105-116.2001>
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
- Lu, M. (2016). Structures of multidrug and toxic compound extrusion transporters and their mechanistic implications. *Channels*, 10(2), 88–100. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1106654>
- Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V., & Pagès, J. M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1223–1229. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL493>
- Mahmoudi, H., Bahador, A., Pourhajibagher, M., & Alikhani, M. Y. (2018). Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 9(3), 154. <https://doi.org/10.15171/JLMS.2018.29>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10101310>
- Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Kishimoto, K., Katsura, T., Ogawa, O., & Inui, K. I. (2006). Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(8), 2127–2135. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006030205>
- Mirza, Z. M., Kumar, A., Kalia, N. P., Zargar, A., & Khan, I. A. (2011). Piperine as an inhibitor of the MdeA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(10), 1472–1478. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.033167-0>
- Moore, O. A., Gao, Y., Chen, A. Y., Brittain, R., & Chen, Y. C. (2016). The Extraction, Anticancer Effect, Bioavailability, and Nanotechnology of Baicalin. *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care*, 2(1), 11. <https://doi.org/10.23937/2572-3278.1510011>
- Moradialvand, M., Asri, N., Jahdkaran, M., Beladi, M., & Hourri, H. (2024). Advancements in Nanoparticle-Based Strategies for Enhanced Antibacterial Interventions. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 82(4), 3071–3090. <https://doi.org/10.1007/S12013-024-01428-0>
- Moulick, S., & Roy, D. N. (2024). Bioflavonoid Baicalein Modulates Tetracycline Resistance by Inhibiting Efflux Pump in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 30(9), 363–371. <https://doi.org/10.1089/MDR.2024.0099>

- Mouwakeh, A., Kincses, A., Nové, M., Mosolygó, T., Mohácsi-Farkas, C., Kiskó, G., & Spengler, G. (2019). Nigella sativa essential oil and its bioactive compounds as resistance modifiers against Staphylococcus aureus. *Phytotherapy Research*, 33(4), 1010–1018. <https://doi.org/10.1002/PTR.6294>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 403107. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00539>
- Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tomiyama, D., Yui, K., Katsuki, M., Ikeda, K., Nonaka, A., & Miyamoto, T. (2015). Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on Bacillus subtilis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(5), 845–854. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.993356>
- Negi, N., Prakash, P., Gupta, M. L., & Mohapatra, T. M. (2014). Possible Role of Curcumin as an Efflux Pump Inhibitor in Multi Drug Resistant Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(10), DC04–DC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8329.4965>
- Nikaido, H. (2010). Structure and Mechanism of RND-Type Multidrug Efflux Pumps. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 77 1, 1–60. <https://doi.org/10.1002/9780470920541.CH1>
- Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Frontiers in Microbiology*, 12, 737288. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.737288>
- Nitulescu, G., Nicorescu, I. M., Olaru, O. T., Ungurianu, A., Mihai, D. P., Zanfrescu, A., Nitulescu, G. M., & Margina, D. (2017). Molecular Docking and Screening Studies of New Natural Sortase A Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2217. <https://doi.org/10.3390/IJMS18102217>
- Nusrat, N., Ahmad Zahra, M., Ahmed, A., & Haque, F. (2023). Assessment of potential pathogenic bacterial load and multidrug resistance in locally manufactured cosmetics commonly used in Dhaka metropolis. *Scientific Reports*, 13(1), 7787. <https://doi.org/10.1038/S41598-023-34782-9>
- Oh, J., Oh, J., Ryu, J. S., Lee, M., Lee, M., Jung, J., Jung, J., Jung, J., Han, S., Han, S., Chung, H. J., Chung, H. J., Chung, H. J., Park, Y., Park, Y., & Park, Y. (2020). Three-dimensional label-free observation of individual bacteria upon antibiotic treatment using optical diffraction tomography. *Biomedical Optics Express*, 11(3), 1257–1267. <https://doi.org/10.1364/BOE.377740>
- Olsen, I. (2015). New promising β -lactamase inhibitors for clinical use. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(7), 1303–1308. <https://doi.org/10.1007/S10096-015-2375-0>
- Omwenga, E. O., & Awuor, S. O. (2024). The Bacterial Biofilms: Formation, Impacts, and Possible Management Targets in the Healthcare System. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2024(1), 1542576. <https://doi.org/10.1155/CJID/1542576>
- Otter, J. A., Vickery, K., Walker, J. T., deLancey Pulcini, E., Stoodley, P., Goldenberg, S. D., Salkeld, J. A. G., Chewins, J., Yezli, S., & Edgeworth, J. D. (2015). Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *The Journal of Hospital Infection*, 89(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2014.09.008>

- Pagès, J. M., & Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 826–833. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2008.12.011>
- Pajkos, A., Vickery, K., & Cossart, Y. (2004). Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *Journal of Hospital Infection*, 58(3), 224–229. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2004.06.023>
- Parvin, F., Hu, H., Whiteley, G. S., Glasbey, T., & Vickery, K. (2019). Difficulty in removing biofilm from dry surfaces. *The Journal of Hospital Infection*, 103(4), 465–467. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2019.07.005>
- Pasqua, M., Bonaccorsi di Patti, M. C., Fanelli, G., Utsumi, R., Eguchi, Y., Trirocco, R., Prosseda, G., Grossi, M., & Colonna, B. (2021). Host - Bacterial Pathogen Communication: The Wily Role of the Multidrug Efflux Pumps of the MFS Family. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 723274. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.723274>
- Pedreira, A., Vázquez, J. A., & García, M. R. (2022). Kinetics of Bacterial Adaptation, Growth, and Death at Didecyltrimethylammonium Chloride sub-MIC Concentrations. *Frontiers in Microbiology*, 13, 758237. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.758237>
- Peng, H., Chen, I. A., & Qimron, U. (2024). Engineering Phages to Fight Multidrug-Resistant Bacteria. *Chemical Reviews*, 125(2), 933–971. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.4C00681>
- Piddock, L. J. V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629–636. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1464>
- Pietrowska, A., Guźniczka, M., Kublicka, A., Matczuk, A., Wieliczko, A., Ulatowska-Jarża, A., & Buzalewicz, I. (2025). Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology. *Industrial Crops and Products*, 233, 121378. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2025.121378>
- Pietrowska, A., Hołowacz, I., Ulatowska-Jarża, A., Guźniczka, M., Matczuk, A. K., Wieliczko, A., Wolf-Baca, M., & Buzalewicz, I. (2022). The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of Escherichia Coli by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6137. <https://doi.org/10.3390/IJMS23116137>
- Piksa, M., Lian, C., Samuel, I. C., Pawlik, K. J., Samuel, I. D. W., & Matczyszyn, K. (2023). The role of the light source in antimicrobial photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 52(5), 1697–1722. <https://doi.org/10.1039/D0CS01051K>
- Poudel, A. N., Zhu, S., Cooper, N., Little, P., Tarrant, C., Hickman, M., & Yao, G. (2023). The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 18(5), e0285170. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0285170>
- Prasch, S., Duran, A. G., Chinchilla, N., Molinillo, J. M. G., Macías, F. A., & Bucar, F. (2019). Resistance modulatory and efflux-inhibitory activities of capsaicinoids and capsinoids. *Bioorganic Chemistry*, 82, 378–384. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2018.10.062>

- Przygoda, M., Bartusik-Aebisher, D., Dynarowicz, K., Ciešlar, G., Kawczyk-Krupka, A., & Aebisher, D. (2023). Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16890. <https://doi.org/10.3390/IJMS242316890>
- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106103>
- Qin, X., Wu, Y., Zhao, Y., Qin, S., Ji, Q., Jia, J., Huo, M., Zhao, X., Ma, Q., Wang, X., Chen, X., Zhang, H., Zhang, M., Yang, L., Li, W., & Tang, J. (2024). Revealing active constituents within traditional Chinese Medicine used for treating bacterial pneumonia, with emphasis on the mechanism of baicalein against multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 321, 117488. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2023.117488>
- Rajagopal, M., & Walker, S. (2017). Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 404, 1. https://doi.org/10.1007/82_2015_5021
- Rajesh, S., Koshi, E., Philip, K., & Mohan, A. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(4), 323–327. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.92563>
- Redmond, R. W., & Kochevar, I. E. (2006). Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5), 1178. <https://doi.org/10.1562/2006-04-14-IR-874>
- Ren, J., Wang, M., Zhou, W., & Liu, Z. (2024). Efflux pumps as potential targets for biofilm inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1315238. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1315238>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.3.482>
- Richmond, G. E., Evans, L. P., Anderson, M. J., Wand, M. E., Bonney, L. C., Ivens, A., Chua, K. L., Webber, M. A., Mark Sutton, J., Peterson, M. L., & Piddock, L. J. V. (2016). The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. *MBio*, 7(2), e00430-16. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00430-16>
- Roccaro, A. S., Blanco, A. R., Giuliano, F., Rusciano, D., & Enea, V. (2004). Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in Staphylococci by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 1968–1973. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.1968-1973.2004>
- Sabino, C. P., Wainwright, M., Ribeiro, M. S., Sellera, F. P., dos Anjos, C., Baptista, M. da S., & Lincopan, N. (2020). Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 208, 111893. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.111893>
- Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Pawar, J. S., Akhter, N., & Lucy, I. B. (2023). Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(3), 103582. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2023.103582>
- Sanchez-Carbonel, A., Mondragón, B., López-Chegne, N., Peña-Tuesta, I., Huayan-Dávila, G., Blitchtein, D., Carrillo-Ng, H., Silva-Caso, W., Aguilar-Luis, M. A., & del Valle-Mendoza, J. (2021). The effect of

- the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*, *16*(12), e0259915. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0259915>
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, *42*(4), 321–324. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2007.01.006>
- Sekyere, J. O., & Amoako, D. G. (2017). Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 228. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00228>
- Serbanescu, D., Ojkic, N., & Banerjee, S. (2021). Cellular resource allocation strategies for cell size and shape control in bacteria. *FEBS Journal*, *289*(24), 7891–7906. <https://doi.org/10.1111/febs.16234>
- Setiawan, F., Wahjuningrum, D. A., Yudianto, A., Radhianto, E., Sunariani, J., & Bhardwaj, A. (2021). The inhibition effect of capsaicin extract against *Staphylococcus aureus*: An in vitro experimental study. *Journal of International Oral Health*, *13*(4), 393–399. <https://doi.org/10.4103/JIOH.JIOH-45-21>
- Seukep, A. J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S. D., & Guo, M. (2020). Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(4), 277–290. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2019.11.002>
- Sharafi, T., Ghaemi, E. A., Rafiee, M., & Ardebili, A. (2024). Combination antimicrobial therapy: in vitro synergistic effect of anti-staphylococcal drug oxacillin with antimicrobial peptide nisin against *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *23*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12941-024-00667-6>
- Sharifi, A., Mohammadzadeh, A., Salehi, T. Z., Mahmoodi, P., & Nourian, A. (2021). Cuminum cyminum L. Essential Oil: A Promising Antibacterial and Antivirulence Agent Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 667833. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.667833>
- Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research*, *149*(2), 129. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_2079_17
- Sheng, L., Li, X., & Wang, L. (2022). Photodynamic inactivation in food systems: A review of its application, mechanisms, and future perspective. *Trends in Food Science & Technology*, *124*, 167–181. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.04.001>
- Soni, J., Sinha, S., & Pandey, R. (2024). Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1370818. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1370818>
- Sora, V. M., Wallet, C., Meroni, G., Loustau, T., Rohr, O., Zecconi, A., & Schwartz, C. (2026). Antimicrobial Resistance: How Can We Overcome the Problem? *Antibiotics*, *15*(1), 82. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS15010082>
- Srinivasan, V. B., Rajamohan, G., & Gebreyes, W. A. (2009). Role of AbeS, a Novel Efflux Pump of the SMR Family of Transporters, in Resistance to Antimicrobial Agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(12), 5312–5316. <https://doi.org/10.1128/AAC.00748-09>

- Stavri, M., Piddock, L. J. V., & Gibbons, S. (2007). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1247–1260. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL460>
- Sunarti, L. S. (2024). Bacterial Contamination in Food: Sources, Risks, and Prevention Strategies. *International Journal of Pathogen Research*, 13(6), 90–100. <https://doi.org/10.9734/IJPR/2024/V13I6324>
- Surur, A. K., de Oliveira, A. B., De Annunzio, S. R., Ferrisse, T. M., & Fontana, C. R. (2024). Bacterial resistance to antimicrobial photodynamic therapy: A critical update. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 255, 112905. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2024.112905>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tegos, G. P., Masago, K., Aziz, F., Higginbotham, A., Stermitz, F. R., & Hamblin, M. R. (2008). Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9), 3202. <https://doi.org/10.1128/AAC.00006-08>
- Télez, G. A., Zapata, J. A., Toro, L. J., Henao, D. C., Bedoya, J. P., Rivera, J. D., Trujillo, J. V., Rivas-Santiago, B., Hoyos, R. O., & Castano, J. C. (2018). Identification, Characterization, Immunolocalization, and Biological Activity of Lucilin Peptide. *Acta Tropica*, 185, 318–326. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2018.06.003>
- Tocci, N., Iannelli, F., Bidossi, A., Ciusa, M. L., Decorosi, F., Viti, C., Pozzi, G., Ricci, S., & Oggioni, M. R. (2012). Functional Analysis of Pneumococcal Drug Efflux Pumps Associates the MATE DinF Transporter with Quinolone Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 248–253. <https://doi.org/10.1128/AAC.01298-12>
- Uc-Cachón, H., María Molina-Salinas, G., & Berteina-Raboin, S. (2025). Comprehensive Overview of Antibacterial Drugs and Natural Antibacterial Compounds Found in Food Plants. *Antibiotics*, 14(2), 185. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14020185>
- van Dun, S. C. J., Verheul, M., Pijls, B. G. C. W., Scheper, H., van der Does, A. M., Nibbering, P. H., & de Boer, M. G. J. (2025). Effectiveness of clindamycin-based exposure strategies in experimental mature staphylococcal biofilms. *Microbiology Spectrum*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01947-24>
- Vashisht, P., Singh, L., Saini, G. S., Gill, A., Verma, D., Sharma, A., Bihola, A., Sahni, O., Kaur, J., & Chauhan, D. S. (2025). Review of potential clean label ingredients in yogurt, cheese and ice cream sector. *Food and Humanity*, 4, 100474. <https://doi.org/10.1016/J.FOOHUM.2024.100474>
- World Health Organization. (2024). *Antimicrobial Resistance Diagnostic Initiative*.
- Youf, R., Müller, Max, Balasini, A., Thétiot, F., Müller, Mareike, Hascoët, A., Jonas, U., Schönherr, H., Lemerrier, G., Montier, T., & Le Gall, T. (2021). Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics*, 13(12), 1995. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13121995>

-
- Zavišić, G., Ristić, S., Petričević, S., Janković, D., & Petković, B. (2024). Microbial Contamination of Food: Probiotics and Postbiotics as Potential Biopreservatives. *Foods*, *13*(16), 2487. <https://doi.org/10.3390/FOODS13162487>
- Zhang, L., Tian, X., Sun, L., Mi, K., Wang, R., Gong, F., & Huang, L. (2024). Bacterial Efflux Pump Inhibitors Reduce Antibiotic Resistance. *Pharmaceutics*, *16*(2), 170. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16020170>
- Zhang, S., Wang, J., & Ahn, J. (2023). Advances in the Discovery of Efflux Pump Inhibitors as Novel Potentiators to Control Antimicrobial-Resistant Pathogens. *Antibiotics*, *12*(9), 1417. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12091417>
- Zhao, J., Hellwig, N., Djahanschiri, B., Khera, R., Morgner, N., Ebersberger, I., Wang, J., & Michel, H. (2022). Assembly and Functional Role of PACE Transporter PA2880 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Spectrum*, *10*(2), e0145321. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01453-21>
- Zhou, X. Y., Ye, X. G., He, L. T., Zhang, S. R., Wang, R. L., Zhou, J., & He, Z. S. (2016). In vitro characterization and inhibition of the interaction between ciprofloxacin and berberine against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antibiotics*, *69*(10), 741–746. <https://doi.org/10.1038/JA.2016.15>
- Zhou, Z., Chen, R., Li, P., Fan, P., Ma, L., Cai, X., Hou, Y., Li, B., & Su, J. (2025). Natural borneol improves cellular uptake of curcumin to enhance its photodynamic bactericidal activity against *Escherichia coli* ATCC 8739. *Food Microbiology*, *127*, 104686. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2024.104686>
- Zhu, X., Liu, W., Lametsch, R., Aarestrup, F., Shi, C., She, Q., Shi, X., & Knöchel, S. (2011). Phenotypic, proteomic, and genomic characterization of a putative ABC-transporter permease involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Foodborne Pathogens and Disease*, *8*(4), 495–501. <https://doi.org/10.1089/FPD.2010.0697>
- Zwama, M., & Nishino, K. (2021). Ever-adapting rnd efflux pumps in gram-negative multidrug-resistant pathogens: A race against time. *Antibiotics*, *10*(7), 774. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070774>

Wykształcenie

Tytuły zawodowe

- 2021 – obecnie Politechnika Wroclawska, Szkoła Doktorska, dziedzina nauk inżynieryjno-technicznych, dyscyplina inżynieria biomedyczna.
- 2020 – 2021 Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, studia II stopnia (magisterskie) na kierunku inżynieria biomedyczna w specjalności optyka biomedyczna. Uzyskanie tytułu magistra z wyróżnieniem w dniu 9 lipca 2021 r.
Praca magisterska „*Wykorzystanie mikroskopu holograficznego do badania biofilmu bakteryjnego*”
Promotor: dr inż. Iwona Hołowacz, prof. uczelni
- 2016 – 2020 Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, studia stacjonarne I stopnia (inżynierskie) na kierunku inżynieria biomedyczna w specjalności optyka biomedyczna. Uzyskanie tytułu inżyniera z wyróżnieniem w dniu 6 lutego 2020 r.
Praca inżynierska „*Wykorzystanie mikroskopu holograficznego do różnicowania tkanek zwierzęcych*”
Promotor: dr inż. Iwona Hołowacz, prof. uczelni

Dorobek naukowy

Publikacje

1. Pietrowska, A., Hołowacz, I., Ulatowska-Jarża, A., Guźniczak, M., Matczuk, A. K., Wieliczko, A., Wolf-Baca, M., & Buzalewicz, I. (2022). The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of Escherichia Coli by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6137. <https://doi.org/10.3390/ijms23116137>
IF₂₀₂₂: 5,6
MNiSW₂₀₂₂: 140 pkt
Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 5
2. Rusak, A., Buzalewicz, I., Mrozowska, M., Wiatrak, B., Haczekwicz-Leśniak, K., Olbromski, M., Kmiecik, A., Krzyżak, E., Pietrowska, A., Moskal, J., Podhorska-Okolów, M., Podbielska, H., & Dzięgiel, P. (2023). Multimodal study of CHI3L1 inhibition and its effect on angiogenesis, migration, immune response and refractive index of cellular structures in glioblastoma. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 161, 114520. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114520>
IF₂₀₂₃: 6,9
MNiSW₂₀₂₃: 140 pkt
Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 7
3. Buzalewicz, I., Kaczorowska, A., Fijałkowski, W., Pietrowska, A., Matczuk, A. K., Podbielska, H., Wieliczko, A., Witkiewicz, W., & Jędruchiewicz, N. (2024). Quantifying the Dynamics of Bacterial Biofilm Formation on the Surface of Soft Contact Lens Materials Using Digital Holographic Tomography to Advance Biofilm Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2653. <https://doi.org/10.3390/ijms25052653>
IF₂₀₂₄: 4,9
MNiSW₂₀₂₄: 140 pkt
Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 7
4. Pietrowska, A., Guźniczak, M., Kublicka, A., Matczuk, A., Wieliczko, A., Ulatowska-Jarża, A., & Buzalewicz, I. (2025). Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy

to modulate bacterial growth and morphology. *Industrial Crops and Products*, 233, 121378. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121378>

IF₂₀₂₄: 6,2

MNiSW₂₀₂₄: 200 pkt

Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 0

5. Talarczyk, A., Kublicka, A., Matczuk, A., Wieliczko, A., Ulatowska-Jarza, A., & Buzalewicz, I. (2026). Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 797, 153214. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.153214>

IF₂₀₂₄: 2,2

MNiSW₂₀₂₄: 100 pkt

Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 0

Dane na 22.02.2026 r.:

- Sumaryczny Impact Factor publikacji (zgodnie z rokiem publikacji): 25.8
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji (zgodnie z rokiem publikacji): 720 pkt
- Sumaryczna liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań): 19
- Indeks Hirscha (według bazy Web of Science): 3

Konferencje

Konferencje o zasięgu krajowym:

1. Prezentacja referatu ustnego pt. "Combined antimicrobial photodynamic therapy: a new approach for modern treatment", XXIII Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering (PCBBE 2023): 27-29.09.2023, Łódź.
(Autorzy: Aleksandra Pietrowska, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Iwona Hołowacz, Anna K. Matczuk, Alina Wieliczko, Igor Buzalewicz)
2. Prezentacja referatu ustnego pt. "Perspektywy wykorzystania inhibitorów pomp efflux pochodzenia roślinnego w terapii antybakteryjnej", VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Perspektywy wykorzystania roślin w nauce i przemyśle”: 23.11.2024.
(Autorzy: Aleksandra Pietrowska, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Anna K. Matczuk, Alina Wieliczko, Igor Buzalewicz)
3. Prezentacja referatu ustnego pt. „Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology”, Conference for Young Biomedical Engineering Researchers (CYBER 2025): 23.06.2025, Wrocław.
(Autorzy: Aleksandra Pietrowska, Guźniczak Mateusz, Kublicka Agata, Anna K. Matczuk, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Igor Buzalewicz)

Konferencje o zasięgu międzynarodowym:

4. Prezentacja referatu ustnego pt. "Multifunctional phenotyping of bacteria by digital holotomography and Kelvin probe microscopy: a new approach for multipurpose diagnostics", 2022 2nd International Symposium on Biomedical Engineering and Computational Biology (BECB 2022) : 13-15.08.2022, Nanchang, China, online.
(Autorzy: Aleksandra Pietrowska, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Iwona Hołowacz, Paweł Żyłka, Alina Wieliczko, Igor Buzalewicz)
5. Współautorka badań przedstawianych w formie referatu (prezentacja ustna) pt. „New perspectives in bacteria sensing based on label-free, multiparametric, optical phenotyping of single cells by quantitative phase imaging”, Biosensors 2023 : 33rd Anniversary World Congress on Biosensors: 5-8.06.2023, Busan, South Korea.
(Autorzy: Igor Buzalewicz, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Aleksandra Pietrowska, Anna K. Matczuk, Mirela J. Wolf-Baca, Alina Wieliczko)

-
6. Prezentacja referatu ustnego pt. "Ocena efektywności przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem ilościowego obrazowania fazy", InterTechDOC'24: IX Międzynarodowa Interdyscyplinarna Konferencja Uczelni Technicznych: 20-21.05.2024, Ustroń.
(Autorzy: Aleksandra Pietrowska, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Mateusz Guźniczak, Anna K. Matczuk, Alina Wieliczko, Igor Buzalewicz)
 7. Współautorka badań przedstawianych w formie referatu (prezentacja ustna) pt. „Analiza biomechaniki struktur przestrzennych tworzonych przez bakterie po zastosowaniu terapii przeciwdrobnoustrojowych” InterTechDOC'24: IX Międzynarodowa Interdyscyplinarna Konferencja Uczelni Technicznych: 20-21.-05.2024, Ustroń.
(Autorzy: Mateusz Guźniczak, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Kamila Korzekwa, Igor Buzalewicz, Aleksandra Pietrowska)

Projekty badawcze

1. Stypendystka w projekcie OPUS21: Wieloparametryczne fenotypowanie bakterii i formowanych przez nie struktur przestrzennych (nr rej.: 2021/41/B/ST7/04002), 12.2022 – 12.2024

Zakres prac obejmował: wykonywanie eksperymentów skupionych na optycznych pomiarach struktur przestrzennych (pojedyncze komórki, mikrokolonie, biofilmy) tworzonych przez bakterie wybranych gatunków z wykorzystaniem cyfrowej tomografii holograficznej, mikroskopii konfokalnej, w tym optymalizacja warunków pomiaru, wstępna analiza wyników, gromadzenie danych zgodnie z planem zarządzania danymi, sporządzanie zestawień i raportów. W ramach tego projektu wykonałam pomiary z wykorzystaniem cyfrowego holotomografu, których wyniki zostały omówione w niniejszej rozprawie.

2. Kierownik projektu Minigranty (edycja 2024) dla doktorantów Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej: Wpływ inhibitorów pomp efflux pochodzenia naturalnego na kinetykę wzrostu bakterii w pożywce płynnej, 04.2024-12.2024.

Przygotowany przeze mnie wniosek uzyskał finansowanie w trybie konkursowym, co pozwoliło na zakup odczynników i materiałów zużywalnych, niezbędnych do realizacji pomiarów z wykorzystaniem bioreaktora. Oczekiwany rezultatem było ustalenie stężenia poszczególnych inhibitorów pomp efflux, które wpływają na charakterystykę rozwoju hodowli. W ramach projektu wykorzystano 6 inhibitorów pomp efflux. Były to: kapsaicyna, piperyna, kurkumina, berberyna, palmatyna i kumaryna. Każdy gatunek bakterii, w zależności od warunków inkubacji, cechuje się swoistą krzywą kinetyczną. Z tego względu przeprowadzona została obserwacja kinetyki wzrostu w celu pozyskania informacji na temat zmian w jej charakterystyce wywołanych obecnością EPI. Badania wykazały, że wykorzystując inhibitory pomp efflux można modulować wzrost i morfologię bakterii.

Ukończone szkolenia i kursy

1. Certyfikowane, praktyczne warsztaty on-line, organizowane przez firmę Merck dotyczące filtracji analitycznej, oceny stanu higienicznego powierzchni produkcyjnych, justowania przyrządów do pomiaru objętości, cytometrii przepływowej, filtracji membranowej oraz chromatografii cieczowej, marzec-czerwiec 2022.
2. Webinarium edukacyjne, organizowane przez firmę Thorlabs dotyczące wykorzystania OCT w obrazowaniu biofilmu bakteryjnego, 13.03.2022.
3. Kurs „Dydaktyka Szkoły Wyższej”, organizowany przez Wydział Zarządzania Politechniki Wrocławskiej, 22.06.2022.
4. Kurs szkoleniowy „Quantitative Phase Imaging at Cellular Level”, składający się z programu praktycznego i laboratoryjnego zorganizowany na Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej w ramach programu PhotonHub Europe Demo Centre, 23.09.2022.
5. Webinar organizowany przez Narodowe Centrum Nauki – Szkolenie dla wnioskodawców: Oferta konkursowa NCN. Konkursy krajowe i międzynarodowe, 21.03.2023.
6. Udział w seminarium „Najnowsze trendy w badaniach biologicznych”, organizowane przez firmę Altium oraz Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszwelda Polskiej Akademii Nauk, 12.09.2023, Wrocław.
7. Warsztaty z mikroskopii holotomograficznej, organizowane przez firmę Altium, firmę Tomocube oraz Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszwelda Polskiej Akademii Nauk, 13.09.2023, Wrocław.
8. Warsztaty „Raman Spectroscopy of carbon materials” i „The use of fluorescence microscopy”, organizowane jako wydarzenie towarzyszące XXIII Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering (PCBBE 2023), 26.09.2023, Łódź.
9. Kurs „ABC promocji nauki”, organizowany przez Ośrodek Przetwarzania Informacji – Państwowy Instytut Badawczy, 15.01.2025.
10. Kurs „Wstęp do badań klinicznych”, organizowany przez AstraZeneca, 16.01.2025.

Praktyka zawodowa

1. Przygotowanie materiałów dydaktycznych (wprowadzenia teoretyczne, listy projektów) dotyczących 6 zajęć oraz 6 zadań projektowych do realizacji w oprogramowaniu OSLO EDU w ramach kursu Przyrządy i Układy Optyczne dla studentów studiów I stopnia na kierunku Inżynieria biomedyczna.
2. Współautorstwo karty przedmiotu Projektowanie Przyrządów i Układów Optycznych dla studentów studiów I stopnia na kierunku Inżynieria biomedyczna.
3. Prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów studiów I stopnia na kierunku Inżynieria biomedyczna:
 - Rok akademicki 2021/2022
 - ✓ Podstawy Biofotoniki – laboratorium, 30 godzin
 - Rok akademicki 2022/2023
 - ✓ Przyrządy i Układy Optyczne – projekt, 60 godzin
 - Rok akademicki 2023/2024
 - ✓ Przyrządy i Układy Optyczne – projekt, 30 godzin
 - ✓ Optyczne Czujniki Chemiczne i Biosensory – projekt, 15 godzin
 - ✓ Podstawy Biofotoniki – laboratorium, 15 godzin
 - Rok akademicki 2024/2025
 - ✓ Przyrządy i Układy Optyczne – projekt, 30 godzin

Nagrody/stypendia

1. Laureatka konkursu na stypendium o zwiększonej wysokości na rok akademicki 2022/2023 dla doktorantów Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej.
2. Laureatka konkursu na stypendium o zwiększonej wysokości na rok akademicki 2024/2025 dla doktorantów Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej.
3. Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej w programie PRIMUS – premiowanie publikacji najwyższej punktowanych w całej uczelni (artykuł w czasopiśmie naukowym, któremu przypisano 200 pkt w wykazie) za drugi kwartał 2025 r.
4. Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej w programie PRIMUS 3 – aktywność publikacyjna doktorantów Politechniki Wrocławskiej za czwarty kwartał 2025 r.