



УДК 616.314.17-002.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY USING MONOCHROME LIGHT WITH DIFFERENT WAVELENGTHS AND METHYLENE BLUE ON CANDIDA ALBICANS AND ESCHERICHIA COLI CULTURES (IN VITRO STUDIES)

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ МОНОХРОМНОГО СВІТЛА З РІЗНОЮ ДОВЖИНОЮ ХВИЛІ ТА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО НА КУЛЬТУРИ CANDIDA ALBICANS ТА ESCHERICHIA COLI (ДОСЛІДЖЕННЯ IN VITRO)

Liubchenko O. V./ Любченко О. В.

d.m.s., prof. / д.м.н., доц

ORCID:0009-0008-0368-2189

Velihoria I.Y./Велігоря І.Є.

s.m.s., as.prof. / к.м.н., доц

ORCID: 0000-0002-0426-2126

Pushkar L.Y./Пушкар Л.Ю.

s.m.s., as.prof. / к.м.н., доц

ORCID: 0000-0001-6975-6971

Severyn L.V./ Северин Л.В.

s.m.s. / к.м.н.

ORCID:0009-0000-3471-4106

Tsyhanoba N.B./Циганова Н.Б.

s.m.s., as.prof. / к.м.н., ас.

ORCID: 0000-0001-7973-0177

KhNMU, Kharkiv, Ukraine, Nauki 4, 61000

ХНМУ, Харків, Україна, Науки 4, 61000

Анотація. В роботі розглядаються питання антибактеріальної активності фотодинамічної терапії з використанням метиленового синього на культури *Candida albicans* та *Escherichia Coli*. Метою дослідження було вивчення *in vitro* вплив монохромного світлодіодного випромінювання з різною довжиною хвилі (червоний, зелений, фіолетовий та синій) з щільністю потужності 3 мВт/см² та потужністю 25 мВт та часом експозиції 3 і 5 хвилин та з фотосенсибілізатором (1% розчин метиленового синього) і без фотосенсибілізатора на ріст колоній стандартних культур *E. Coli* та *Candida albicans*. Результати досліджень показують, що самотійна дія світлового випромінювання не призводить до суттєвого пригнічення росту культури *E. Coli*, час експозиції не впливав на ріст культури. Попередня обробка чашок із культурою *E. Coli* фотосенсибілізатором - 1% водним розчином метиленового синього, знижує ріст культури *E. Coli* у порівнянні з контролем (контроль - $4,23 \times 10^7$ КУО в 1 мл, вплив лише 1% розчином метиленового синього - 2×10^5 КУО/мл) у 211,5 рази. За поєднаної дії 1% розчином метиленового синього та світла різної довжини хвилі протягом 3 та 5 хвилин ріст культури *E. Coli* відсутній. Самостійна дія світлового випромінювання не призводить до суттєвого пригнічення росту культури *Candida albicans*, час експозиції не впливав на ріст культури. Попередня обробка чашок із культурою *Candida albicans* фотосенсибілізатором - 1% водним розчином метиленового синього, . знижує ріст культури *Candida albicans* у порівнянні з контролем (контроль - $8,8 \times 10^7$ КУО в 1 мл, вплив лише 1% розчином метиленового синього - $1,3 \times 10^7$ КУО/мл) у 6,7 рази. За поєднаної дії 1% розчином метиленового синього та світла різної довжини хвилі протягом 3 та 5 хвилин



ріст культури *Candida albicans* пригнічується, затримка росту колоній пропорційна часу експозиції. Довжина хвилі впливає на інтенсивність росту колоній *Candida albicans* від максимального до мінімального значення КУО наступним чином: червоне світло, зелене світло, фіолетове світло, синє світло.

Ключові слова: монохромне світлодіодне випромінювання, метиленовий синій, культури *E. Coli* та *Candida albicans*.

Вступ.

Порожнина рота є довкіллям понад 700 видів мікроорганізмів. При дії загальних та місцевих несприятливих факторів відбувається зміна мікробіоти порожнини рота в дисбіотичний стан [1]. Патобіоти, які є комменсалами, набувають патогенних властивостей і активно ростуть [2]. *Candida albicans* і *Escherichia coli* (*E. coli*) відносяться до патобіотів і сприяють розвитку багатфакторних захворювань слизової оболонки ротової порожнини [1,3].

Використання антибіотиків широкого спектра дії сприяє зростанню числа грибкових інфекцій [4,5]. Різні види *Candida* можуть організовуватися в біоплівки, що призводить до підвищеної вірулентності та стійкості до терапії [6]. Тому пошук нових альтернативних методів лікування є актуальним.

В теперішній час велика увага приділяється вивченню впливу світла на організм. Фотобіомодуляція (PBM) - лікування світлом, що використовує неіонізуючі форми джерел світла - лазери (low-level laser therapy (LLLT), світлодіоди (light emitting diodes (LEDs) і широкосмугові випромінювачі світла [7]. Світлодіоди виявилися чудовим варіантом для створення фототерапевтичних апаратів з монохромним випромінюванням, що дає можливість варіювати спектром випромінювання у широкому діапазоні, у якому довжини хвиль, із яких воно складається, розрізняються не більше, ніж на десяті частки нанометра. Це прості прилади, надійні і довговічні. Вони мають високу інтенсивність світіння під заданим кутом, можливість вибору джерела випромінювання у будь-якій ділянці видимого та ближнього інфрачервоного діапазонів спектра, безпечні для пацієнта і лікаря [8].

Фотодинамічна терапія (ФДТ) – метод лікування, заснований на використанні двох компонентів – фотосенсибілізатора (спеціального лікарського засобу) і джерела неіонізуючого світла, що генерує випромінювання з певною довжиною хвилі [9], яка забезпечує безболісну і швидку дезінфекцію



локалізованих ділянок ротової порожнини без побічного впливу, в тому числі і профілактику стоматологічних захворювань.

Метиленовий синій (МБ) — синій барвник з окислювально-відновними та катіонними тіазиновими властивостями, що широко використовується в антимікробній фотодинамічній терапії (aPDT–MB) [10].

Велика кількість досліджень встановила, що фотодинамічна терапія з метиленовим синім ефективно знижує кількість видів *Candida* [11, 12, 13, 14, 15]. Фотодинамічна терапія метиленовим синім визнана ефективною в терапії різних патологічних станів порожнини рота і, як було показано, є корисною та дієвою терапією. ФДТ- це додатковим підхід до контролю розвитку/зростання біоплівки ротової порожнини в клінічних ситуаціях. [16].

Поєднання МБ з LED або тільки LED знижає метаболічну активність та загальну кількість багатовидової субгінгівальної біоплівки у дослідженні *in vitro* [17].

Крім того, фунгіцидна активність фотодинамічної терапії залежить від типу фотосенсибілізатора та відповідної довжини хвилі світла [11].

Отже, вкрай важливо впроваджувати стратегії, які здатні запобігати та контролювати дисбактеріоз ротової порожнини, щоб уникнути серйозних ускладнень, включаючи захворювання серця, легень та інші системні захворювання. Тому вкрай важливо впроваджувати альтернативні стратегії, які можуть подолати недоліки традиційної терапії, зокрема використання антибіотиків широкого спектра дії [18,19].

Мета.

Метою дослідження було вивчення *in vitro* впливу монохромного світлодіодного випромінювання з різною довжиною хвилі (червоний ($\lambda=658\text{nm}$), зелений ($\lambda=525\text{nm}$), фіолетовий ($\lambda=405\text{nm}$) та синій ($\lambda=470\text{nm}$)) з щільністю потужності 3 мВт/см^2 та потужністю 25 мВт з часом експозиції 3 і 5 хвилин на ріст колоній *E. Coli* та *Candida albicans* з фотосенсибілізатором (1% розчин метиленового синього) і без фотосенсибілізатора на ріст колоній стандартних культур *E. Coli* та *Candida albicans*.



Матеріали та методи дослідження.

З добової культури *E. Coli*, вирощеної на агарі Мюллера-Хінтона робили одномільярду завись у фізіологічному розчині за стандартом каламутності розводили до 10^{-4} (робоче розведення). Засівали дослідні та контрольні чашки каліброваної петлею (об'єм, що засівається дорівнював 0,005 мл) або піпеткою (об'єм, що засівається - 0,05 мл).

На поживне середовище засівалась добова культура *Candida albicans* у вигляді каламутної суспензії у фізіологічному розчині, яка була розтитрована до 10^{-5} . Засів на дослідні і контрольні чашки робили калібрувальною петлею (об'єм, що засівається - 0,005 мл) і піпеткою (об'єм, що засівається - 0,05 мл).

Для опромінення чашок використовували монохромний світлодіодний випромінювач з довжиною хвилі $\lambda=405\text{nm}$ (фіолетовий), $\lambda=470\text{nm}$ (синій), $\lambda=525\text{nm}$ (зелений), $\lambda=658\text{nm}$ (червоний), з вихідною щільністю потужності випромінювання 3 мВт/см^2 та потужністю 25 мВт. Діаметр випромінюючої поверхні світлодіодного джерела світла абсолютно відповідав діаметру опромінюваної чашки і склав 3,5 см. Тривалість опромінення становила 3 і 5 хвилин. Відстань від світлодіодного випромінювача до поверхні поживного середовища складала 15 мм.

У якості сенсibilізатора використовували 1% розчин метиленового синього.

Дослідження проводили у темній приміщенні без потрапляння прямих сонячних променів. На поверхню чашки наносили культуру, потім фотосенсibilізатор обсягом 0,1 (покриваючи всю поверхню поживного середовища) і витримували 20 хв перед впливом певним світлом. Досвід робили у потрібних повторенні.

Після фотовпливу та обробки сенсibilізатором чашки з культурою поміщували термостат (37°C). Облік кількості мікроорганізмів, що вижили, оцінювали кількістю колоніє утворюючих одиниць (КУО) в 1 мл. Підрахунок КУО в дослідних і контрольних групах проводили після 48 і 72 годин витримки культури в термостаті.



Поставлені такі контролі:

- 1 – без впливу світла та без попередньої обробки фотосенсибілізатором;
- 2 – без впливу світлом та з обробкою фотосенсибілізатором;
- 3 – впливаючи світлом 3 хв і без обробки фотосенсибілізатором;
- 4 – впливаючи світлом 5 хв і без обробки фотосенсибілізатором;
- 5 - поєднаний вплив метиленового синього в якості фотосенсибілізатора та різних джерел світла протягом 3 хв.

6 - поєднаний вплив метиленового синього як фотосенсибілізатора і різних джерел світла протягом 5 хв.

Результати та їх обговорення.

В умовах *in vitro* була проведена оцінка ефективності дії монохромного світлодіодного випромінювання з і без фотосенсибілізатора на ріст колоній стандартних культур *Candida albicans* і *E. Coli*. протягом 3 та 5 хвилин.

Отримані дані результатів впливу чотирьох різних джерел світла на ріст культури *E. Coli* представлені в таблиці 1 та на рисунку 1.

Таблиця 1 - Фотодинамічний ефект на культуру *E. Coli* при використанні фотосенсибілізатора та світла з різною довжиною хвилі

Показники		Кількість колоній, що вирости (середнє значення КУО в 1 мл×10 ⁷)			
				Фотосенсибілізатор	
				1% розчин метиленового синього	
Контроль		4,23		0,02	
Час пливу		3 хв	5 хв	3 хв	5 хв
Світло	Червоне	4,73	3,54	0	0
	Зелене	3,25	4,25	0	0
	Сине	4,47	2,74	0	0
	Фіолетове	4,2	5,4	0	0

Як видно з таблиці 1 та рисунку1 окрема дія тільки світлом не призводить до суттєвого зменшення росту колоній *E. Coli*. При впливі на чашки з культурою *E. Coli* ізольовано тільки світлом ми спостерігаємо зниження росту колоній *E. Coli* в 1,2 рази при впливі на культуру червоним світлом при експозиції в 5



хвилин, середнє значення КУО в 1 мл дорівнює $3,54 \times 10^7$, вплив зеленим світлом при експозиції в 3 хвилини призводить до зниження росту колоній в 1,3 рази, середнє значення КУО в 1 мл дорівнює $3,25 \times 10^7$. Вплив синім світлом протягом 5 хвилин знижує ріст колоній до середнього значення КУО в 1 мл $2,74 \times 10^7$, що в 1,5 рази менше у порівнянні з контролем. Вплив фіолетовим світлом протягом 5 хвилин сприяло росту колоній, середнє значення КУО в 1 мл дорівнювало $5,4 \times 10^7$, що в 1,2 рази вище за контрольні дані.

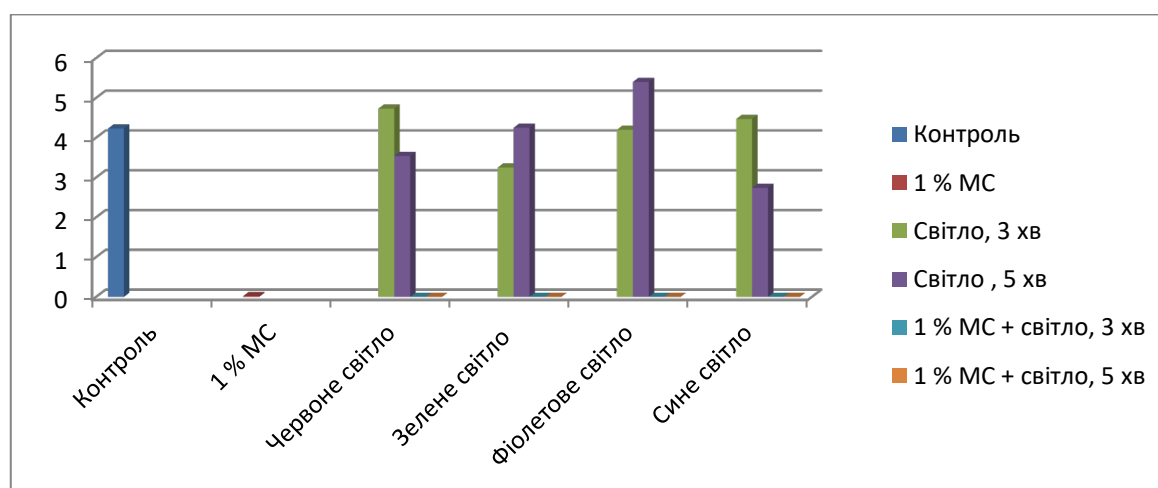


Рисунок 1 - Фотодинамічний ефект на культуру E. Coli при використанні фотосенсибілізатора та світла з різною довжиною хвилі

У всіх інших випадках вплив світла при експозиції в 3 і 5 хвилин призводив до росту колоній E. Coli до рівня контролю, що вказує на низьку ефективність дії світла на зменшення кількості колоній E. Coli і що воно не надаватиме бактерицидної та бактеріостатичної дії на мікроорганізми при проведенні лікувальних маніпуляцій.

Ізольована дія фотосенсибілізатора показала наступні дані: вплив 1% водного розчину метиленового синього на культуру E. Coli призвело до зниження росту колоній мікроорганізмів і середнє значення КУО в 1 мл дорівнювало $0,02 \times 10^7$, що в 211,5 рази менше у порівнянні з контролем, і це свідчить про значну антимікробну активність цього препарату [10].



У дослідних чашках при поєднаній дії метиленового синього та випромінювання з різною довжиною хвилі росту колоній не спостерігалось, що свідчить про пригнічення росту *E. Coli* під дією фотосенсибілізатора та світла [16,17].

Отримані дані результатів впливу чотирьох різних джерел світла та фотосенсибілізатора на зростання культури *Candida albicans* представлені у таблиці 2 та на рисунку 2.

Таблиця 2 - Фотодинамічний ефект на культуру *Candida albicans* при використанні фотосенсибілізатора та світла з різною довжиною хвилі

Показники		Кількість колоній, що вирости (середнє значення КУО в $1 \text{ мл} \times 10^7$)			
				Фотосенсибілізатор	
				1% розчин метиленового синього	
Контроль		8,8		1,3	
Час впливу		3 хв	5 хв	3 хв	5 хв
Світло	Червоне	8,3	9,0	1,9	1,6
	Зелене	8,9	7,3	0,9	0,8
	Синє	9,1	7,5	0	0,1
	Фіолетове	7,4	10,3	0,9	0,3

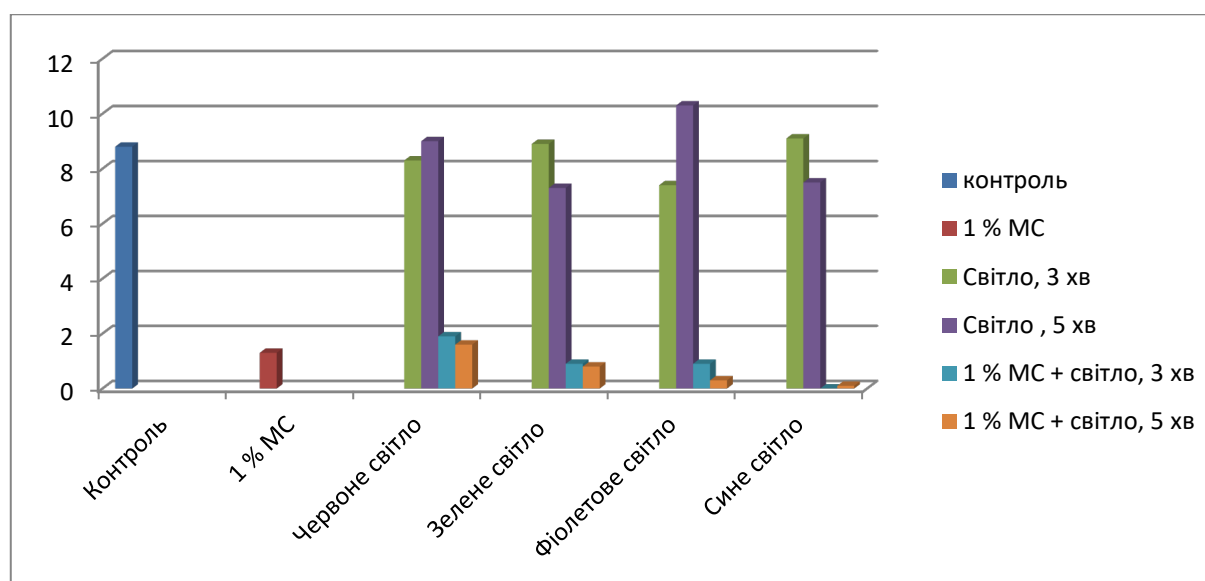


Рисунок 2 - Фотодинамічний ефект на культуру *Candida albicans* при використанні фотосенсибілізаторів та світла з різною довжиною хвилі



Як видно з таблиці 2 та на рисунку 2, окремий вплив світлом протягом 3 і 5 хвилин не впливає на зниження росту колоній *Candida albicans*.

У контрольних пробах відзначається зростання культури та середнє значення КУО в 1 мл дорівнює $8,8 \times 10^7$.

При дії червоним світлом на *Candida albicans* з експозицією 3 хвилини цей показник дорівнює $8,3 \times 10^7$ КУО в 1 мл, а при експозиції 5 хвилин - $9,0 \times 10^7$ КУО в 1 мл. При дії зеленим світлом протягом 3 хилин показники росту колоній *Candida albicans* були $8,9 \times 10^7$ КУО в 1 мл, тоді як дія цим світлом тривалістю 5 хвилин призвела до неістотного зниження росту і склала $7,3 \times 10^7$ КУО в 1 мл.

Дія синього світла аналогічно дії зеленого, при дії протягом 3 хвилин ми відзначали ріст колоній до показника $9,1 \times 10^7$ КУО в 1 мл, тоді як більш тривалий вплив світла уповільнювало ріст до $7,5 \times 10^7$ КУО в 1 мл.

Дія фіолетового світла викликала наступні зміни: 3-х хвилинний вплив світла сповільнив ріст колоній до $7,4 \times 10^7$ КУО в 1 мл, а при дії протягом 5 хвилин ми спостерігаємо незначний ріст колоній мікроорганізмів до $10,3 \times 10^7$ КУО в 1 мл.

Ізольована дія фотосенсибілізатора показала наступні дані: дія 1% водного розчину метиленового синього на культуру *Candida albicans* призвела до зниження росту мікроорганізму в 6,7 рази, що свідчить про антимікробну активність даного препарату [10,21].

Доповнивши дію фотосенсебілізатора світлом, ми отримали дані, які наведені в таблиці 2 та на малюнку 2.

Отримані результати показали, що поєднання фотосенсебілізатора і світла різної довжини хвилі, крім червоного світла, призводять до суттєвого пригнічення росту колоній *Candida albicans*.

При впливі на чашки з культурою *Candida albicans* червоним світлом протягом 3 хвилин відзначали незначне збільшення колоній у порівнянні з контролем до $1,9 \times 10^7$ КУО в 1 мл, коли дію світла продовжували до 5 хвилин, показники росту колоній знижувалися до $1,6 \times 10^7$ КУО в 1 мл у порівнянні з контролем.



При дії зеленого світла і метиленового синього ми відзначали зниження росту колоній *Candida albicans* в 1,5 рази з тенденцією посилення ефекту в залежності від часу: $0,9 \times 10^7$ КУО в 1 мл (3 хв) і $0,8 \times 10^7$ КУО в 1 мл (5 хв).

Поєднана дія метиленового синього і фіолетового світла також знижує ріст колоній *Candida albicans*. Ріст колоній сповільнюється при дії протягом 3 хвилин до $0,9 \times 10^7$ КУО в 1 мл, а при дії протягом 5 хвилин цей показник знижується в 3 рази відносно часу дії і в 4,3 рази у порівнянні з контролем і становить $0,3 \times 10^7$ КУО в 1 мл.

Спільна дія синього світла та сенсебілізатора впливає наступним чином на *Candida albicans*: при дії синім світлом протягом 3 хвилин ми спостерігаємо відсутність росту колоній, тоді при 5 хвилинах впливу світла ріст колоній *Candida albicans* становить $0,1 \times 10^7$ КУО в 1 мл, що в 88 разів нижче контролю, це свідчить, що фотодинамічна терапія синім світлом з метиленовим синім ефективно знижує кількість видів *Candida albicans*, що підтверджує попередні дослідження [11,12,13,14,15].

Довжина хвилі впливає на інтенсивність росту колоній *Candida albicans* від максимальної кількості КУО до мінімальної наступним чином: червоний знижує кількість КУО в 4,63 рази через 3 хвилини і в 5, 5 разів через 5 хвилин, зелене світло ще сильніше зупиняє ріст - в 9,8 разів після впливу протягом 3 хвилин і в 11 разів після 5 хвилин, фіолетове світло - знижує в 9,8 разів через 3 хвилини впливу і в 29.3 рази - через 5 хвилин, синє світло - призводить до відсутності росту колоній після 3 хвилин впливу і зменшення інтенсивності утворення колоній в 88 разів при впливі світлом протягом 5 хвилин.

Отримані дані підтверджують дослідження з оптимізації довжини хвилі, часу дії та виду фотосенсибілізатора для покращення фунгіцидної дії на види *Candida* [11,20].

Висновки.

Результати досліджень показують, що самотійна дія світлового випромінювання не призводить до суттєвого пригнічення росту культури *E. Coli*, тривалість експозиції не впливає на ріст культури.



Попередня обробка чашок із культурою *E. Coli* фотосенсибілізатором - 1% водним розчином метиленового синього, знижує ріст культури *E. Coli* у порівнянні з контролем (контроль - $4,23 \times 10^7$ КУО в 1 мл, вплив 1% розчином метиленового синього – 2×10^5 КУО/мл) у 211,5 рази.

При сумісному впливі 1% розчином метиленового синього та світла різної довжини хвилі (червоний, зелений, фіолетовий, синій) протягом 3 та 5 хвилин ріст культури *E. Coli* відсутній.

Самостійна дія світлового випромінювання не призводить до суттєвого пригнічення росту культури *Candida albicans*, тривалість експозиції не впливав на ріст культури.

Попередня обробка чашок із культурою *Candida albicans* фотосенсибілізатором - 1% водним розчином метиленового синього, знижують ріст культури *Candida albicans* у порівнянні з контролем (контроль - $8,8 \times 10^7$ КУО в 1 мл, вплив 1% розчином метиленового синього - $1,3 \times 10^7$ КУО/мл) у 6,7 рази.

При спільній дії 1% розчином метиленового синього та світла різної довжини хвилі (червоний, зелений, фіолетовий, синій) протягом 3 та 5 хвилин ріст культури *Candida albicans* пригнічується, затримка росту колоній пропорційна часу експозиції.

Довжина хвилі впливає на інтенсивність росту колоній *Candida albicans* від максимального до мінімального значення КУО наступним чином: червоне світло, зелене світло, фіолетове світло, синє світло.

Література.

1. Thomas C, Minty M, Vinel A, Canceill T, Loubières P, Burcelin R, et al. Oral Microbiota: A Major Player in the Diagnosis of Systemic Diseases. *Diagnostics*. 2021; 11: 1376.
2. Cugini C, Ramasubbu N, Tsiagbe VK, Fine DH. Dysbiosis From a Microbial and Host Perspective Relative to Oral Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*. 2021; 12: 617485



3. Wang Y, Li J, Zhang H, Zheng X, Wang J, Jia X, et al. Probiotic *Streptococcus salivarius* K12 Alleviates Radiation-Induced Oral Mucositis in Mice. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 684824.
4. Fusco A, Contaldo M, Savio V, Baroni A, Ferraro GA, Di Stasio D, et al. An Unconventional Oral Candidiasis in an Immunocompetent Patient. *Journal of Fungi*. 2023; 9: 295.
5. Kamble A, Jabin Z, Agarwal N, Anand A. Effectiveness of Oral Probiotics in Reducing *S. mutans* Count in Caries-active Children: A Comparison with Chlorhexidine and Herbal Mouthrinse (Hiora®®). *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2022; 15: S207–S211.
6. Contaldo M. Use of Probiotics for Oral Candidiasis: State of the Art and Perspective. A Further Step Toward Personalized Medicine? *Frontiers in Bioscience-Elite*. 2023; 15: 6.
7. Mosca, Rodrigo & Ong, Adrian & Albasha, Omar & Bass, Kathryn & Arany, Praveen. (2019). Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. *Advances in Skin & Wound Care*. 32. 157-167. 10.1097/01.ASW.0000553600.97572.d2.
8. Фототерапевтичні апарати Коробова А. – Коробова В. серії «Барва»: науково-популярне видання / А. М. Коробов, В. А. Коробов, Т. О. Лісна. – Х. : 2015 – 176 с.
9. Qi M, Chi M, Sun X, Xie X, Weir MD, Oates TW, Zhou Y, Wang L, Bai Y, Xu HHK. Novel nanomaterial-based antibacterial photodynamic therapies to combat oral bacterial biofilms and infectious diseases. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:6937-6956
<https://doi.org/10.2147/IJN.S212807>.
10. João, Paulo & Tardivo, João & Auro, Del & Giglio, Auro & Oliveira, Carla & Gabrielli, Dino & Junqueira, Helena & Tada, Dayane & Severino, Divinomar & De, Rozane & Turchiello, Fátima & Baptista, Mauricio. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2. 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.



11. Khozeimeh F, Tavangar A, Razzaghi-Abyaneh M, Amini M, Ghayour M. Evaluation of the Effects of Photodynamic Therapy With Methylene Blue on Different Candida Species In Vitro. *J Lasers Med Sci*. 2023 Sep 18;14:e34. doi: 10.34172/jlms.2023.34. PMID: 38028872; PMCID: PMC10658125.
12. Cardozo APM, da Silva DdFT, Fernandes KPS, et al. Antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue and its derivatives in animal studies: Systematic review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2024; 40:e12978. doi:10.1111/phpp.12978
13. Fekrazad R, Ghasemi Barghi V, Poorsattar Bejeh Mir A, Shams-Ghahfarokhi M. In vitro photodynamic inactivation of *Candida albicans* by phenothiazine dye (new methylene blue) and Indocyanine green (EmunDo®) Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015;12(1):52–7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.006. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
14. Azizi A, Amirzadeh Z, Rezai M, Lawaf S, Rahimi A. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B*. 2016;158:267–73. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.027. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]⁹
15. Daliri F, Azizi A, Goudarzi M, Lawaf S, Rahimi A. In vitro comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene blue on *Candida albicans* colonies. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;26:193–8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.03.017.
16. Moreti, Lucieni & Assis, Livia & Fernandes, Karina & Kozusny-Andreani, Dora & Santos Souza, José Antonio & Tim, Carla. (2022). Methylene blue-mediated photodynamic therapy in the treatment of oral microbiota. A Systematic Review. *Research, Society and Development*. 11. e53411629001. 10.33448/rsd-v11i6.29001
17. Bueno-Silva B, Parma-Garcia J, Frigo L, Suárez LJ, Macedo TT, Uyeda FH, Melo MARdC, Sacco R, Mourão CF, Feres M, et al. Antimicrobial Activity of Methylene Blue Associated with Photodynamic Therapy: In Vitro Study in Multi-Species Oral Biofilm. *Pathogens*. 2024; 13(4):342. <https://doi.org/10.3390/pathogens13040342>



18. Mariana B Rebelo, Cláudia S Oliveira, Freni K Tavaría. Novel Strategies for Preventing Dysbiosis in the Oral Cavity. Front. Biosci. (Elite Ed) **2023**, 15(4), 23. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1504023>

19. Shankargouda Patil, Roopa S Rao, DS Sanketh, N Amrutha Microbial Flora in Oral Diseases The Journal of Contemporary Dental Practice, November-December 2013;14(6):1202-1208

20. Du M, Li F, Hu Y. A Uniform Design Method Can Optimize the Combinatorial Parameters of Antimicrobial Photodynamic Therapy, Including the Concentrations of Methylene Blue and Potassium Iodide, Light Dose, and Methylene Blue's Incubation Time, to Improve Fungicidal Effects on Candida Species. Microorganisms. 2023; 11(10):2557. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102557>

21. Yaren Kayabaş, Oytun Erbaş Methylene blue and its importance in medicine D J Med Sci 2020;6(3):136-145 doi: 10.5606/fng.btd.2020.25035

Abstract. The paper examines the antibacterial activity of photodynamic therapy using methylene blue on *Candida albicans* and *Escherichia Coli* cultures. The aim of the study was to study in vitro the effect of monochrome LED radiation with different wavelengths (red, green, violet and blue) with a power density of 3 mW/cm² and a power of 25 mW and an exposure time of 3 and 5 minutes and with a photosensitizer (1% methylene blue solution) and without a photosensitizer on the growth of colonies of standard *E. Coli* and *Candida albicans* cultures. The results of the studies show that the independent action of light radiation does not lead to significant inhibition of the growth of *E. Coli* cultures, the exposure time did not affect the growth of the culture. Pretreatment of the plates with the *E. Coli* culture with a photosensitizer - 1% aqueous solution of methylene blue, reduces the growth of the *E. Coli* culture compared to the control (control - 4.23×10^7 CFU in 1 ml, exposure to only 1% methylene blue solution - 2×10^5 CFU/ml) by 211.5 times. With the combined action of 1% methylene blue solution and light of different wavelengths for 3 and 5 minutes, the growth of the *E. Coli* culture is absent. The independent action of light radiation does not lead to significant inhibition of the growth of the *Candida albicans* culture, the exposure time did not affect the growth of the culture. Pretreatment of the plates with the *Candida albicans* culture with a photosensitizer - 1% aqueous solution of methylene blue, . reduces the growth of *Candida albicans* culture compared to the control (control - 8.8×10^7 CFU in 1 ml, exposure to only 1% methylene blue solution - 1.3×10^7 CFU/ml) by 6.7 times. With the combined action of 1% methylene blue solution and light of different wavelengths for 3 and 5 minutes, the growth of *Candida albicans* culture is inhibited, the delay in colony growth is proportional to the exposure time. The wavelength affects the growth intensity of *Candida albicans* colonies from the maximum to the minimum CFU value as follows: red light, green light, violet light, blue light.

Key words: monochrome LED radiation, methylene blue, *E. Coli* and *Candida albicans* cultures.