

# Detekcija biofilma na keramičkim pločicama pomoću ATP bioluminiscencije

---

**Kovač, Bruno**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:210711>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Kovač

DETEKCIJA BIOFILMA NA KERAMIČKIM PLOČICAMA POMOĆU ATP  
BIOLUMINISCENCIJE

Završni rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Kovač

DETEKCIJA BIOFILMA NA KERAMIČKIM PLOČICAMA POMOĆU ATP  
BIOLUMINISCENCIJE

Završni rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana 10.09.2021., na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Dijana Tomić Linšak, dipl. sanit. ing.
2. izv. prof. dr. sc. Vanja Vasiljev, dipl. sanit. ing.
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Rad ima 33 stranice, 5 slika, 5 grafova, 4 tablice i 15 literaturnih navoda.

## SAŽETAK

ATP bioluminiscencija metoda je kojom se provodi mjerenje učinkovitosti higijenskih postupaka u raznim industrijskim pogonima, ustanovama zdravstvene skrbi, ali i u ugostiteljstvu. U prisutnosti ATP-a, luciferaza zajedno s kofaktorima D-luciferinom i kisikom producira svjetlo, odnosno energiju. Količina produciranog svjetla (energije) mjeri se luminometrom i izražava se u RLU (eng. *Relative Light Units*). Osim ATP-a iz mikroorganizama, mjeri se i ATP od ostataka proizvoda na površini. Ne postoji puno podataka o korištenju ove metode za detekciju biofilma te je stoga cilj rada bio prikazati učinkovitost sredstva za čišćenje Bis Duo Active na uništavanju bakterijskog biofilma na keramičkim pločicama *in vitro*. Na keramičkim pločicama dimenzija 2,5 x 2,5 cm stvoren je biofilm bakterija *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* i *Listeria monocytogenes* tijekom 24 sata. Te su pločice zatim tretirane radnim koncentracijama sredstva za čišćenje tijekom 10 minuta. Nakon ispiranja mjerio se RLU pomoću luminometra te određivao CFU/mL nasadivanjem deseterostrukih razrjeđenja na Müller-Hinton agar i brojanjem poraslih kolonija. Također se ispitala korelacija dobivenih rezultata.

Obje radne koncentracije sredstva za čišćenje (5% i 20%) pokazale su se kao vrlo učinkovite u uništavanju stvorenog bakterijskog biofilma na keramičkim pločicama. Korišteno sredstvo za čišćenje pokazalo se najučinkovitije na primjeru redukcije broja bakterija na pločici biofilma *S. aureus* kod mjerenja vrijednosti RLU, dok je prilikom izračunavanja CFU/mL zaključeno da je najučinkovitije djelovalo na pločici biofilma *L. monocytogenes*. Gledajući postotke inhibicije, nešto slabiju djelotvornost sredstvo za čišćenje pokazalo je na primjeru pločice biofilma *S. Typhimurium* u oba slučaja. RLU i CFU/mL vrijednosti pokazuju vrlo jaku povezanost te koreliraju u vrijednosti 0,95770.

Zaključno, ATP bioluminiscencija pokazuje dobre rezultate kod detekcije biofilma na keramičkim pločicama za sve tri ispitivane bakterije te nakon tretmana sredstvom za čišćenje pokazuje jako dobru redukciju vrijednosti. Postotak inhibicije nakon primjene tretmana dezinficijensom kod RLU je najmanje 85,62%, dok je kod CFU/mL 98,30%.

**Ključne riječi:** ATP bioluminiscencija, biofilm, dezinficijens

## SUMMARY

ATP bioluminescence is a method used to measure the effectiveness of hygienic procedures in various industrial plants, but also in catering. In the presence of ATP, luciferase together with the cofactors D-luciferin and oxygen produce light and energy, respectively. The amount of light (energy) produced is measured with a luminometer and expressed in RLU (*Relative Light Units*). In addition to ATP from microorganisms, ATP from product residues on the surface is also measured. There is not much data on the use of this method and, therefore, the aim of the research was to demonstrate the effectiveness of the cleaning agent Bis Duo Active on the destruction of bacterial biofilm on ceramic tiles *in vitro*. A biofilm of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* was created on ceramic tiles with dimensions of 2.5 x 2.5 cm over 24 hours. These plates were then treated with working concentrations of detergent for 10 minutes. After washing, RLU was measured with a luminometer, and CFU/mL was determined by plating ten-fold dilutions on Müller-Hinton agar and counting the grown colonies. The correlation between the obtained results was also examined.

Both working concentrations of cleaning agent (5% and 20%) proved to be very effective on destroying the created bacterial biofilm on ceramic tiles. The cleaning agent used proved to be most effective in the example of reducing the number of bacteria on the *S. aureus* biofilm plate when measuring RLU values, while the CFU/mL calculation concluded that it had the most effective effect on the *L. monocytogenes* biofilm plate. Looking at the percentages of inhibition, the cleanser's effectiveness was slightly lower in the example of the *S. Typhimurium* biofilm plate in both cases. RLU and CFU/mL values show a very strong correlation and correlate in value 0,95770.

In conclusion, ATP bioluminescence shows good results in the detection of biofilm on ceramic tiles of all three tested bacteria and, after treatment with a cleaning agent, shows a very good reduction in value. The percentage of inhibition after disinfection treatment in RLU is at least 85,62%, while in CFU/mL 98,30%.

**Key words:** ATP bioluminescence, biofilm, disinfectant

SADRŽAJ	
SAŽETAK .....	III
SUMMARY .....	IV
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA.....	1
1.1. Definicija biofilma i komunikacija bakterija unutar njega .....	1
1.2. Dezinfekcija .....	3
1.3. Struktura ATP-a i ATP bioluminiscencija.....	4
1.4. RLU i CFU korelacija .....	7
1.5. Karakteristike bakterija korištenih u radu.....	9
1.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.5.2. <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	10
1.5.3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	13
3. MATERIJALI I POSTUPCI .....	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Laboratorijski pribor i uređaji.....	14
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Korišteni mikroorganizmi.....	14
3.2. Postupci.....	15
3.2.1. Priprema keramičkih pločica za obradu bez tretmana dezinficijensom .....	15
3.2.1.1. Mjerenje RLU na keramičkim pločicama bez tretmana dezinficijensom.....	15
3.2.1.2. Određivanje CFU na keramičkim pločicama bez tretmana dezinficijensom..	16
3.2.2. Priprema keramičkih pločica za obradu s tretmanom dezinficijensom.....	17
3.2.2.1. Mjerenje RLU na keramičkim pločicama tretiranih dezinficijensom .....	19
3.2.2.2. Određivanje CFU na keramičkim pločicama tretiranih dezinficijensom .....	19
3.2.3. Izračunavanje postotaka inhibicije nakon primjene dezinficijensa.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Prikaz dobivenih RLU vrijednosti prije i nakon tretmana dezinficijensima .....	21
4.2. Prikaz dobivenih CFU/mL vrijednosti prije i nakon tretmana dezinficijensima .....	23
4.3. Prikaz dobivene korelacije podataka.....	25
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. LITERATURA .....	31
8. ŽIVOTOPIS .....	33

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA

Prije otprilike 150 godina, znanstvenici su primijetili da na površinama koje su u doticaju s tekućinom rastu bakterije i stvaraju nakupine istih te su time počela prva istraživanja. Tako je 1848. godine Antonie van Leuwenhoek, „otac mikroskopa“, pomoću svog mikroskopa opisao agregate „animalcules“-a koje je on strugao s površina zuba. S druge strane, 1934. godine Claude Zobell je mikroskopom pregledavao morske populacije i zaključio da su te bakterije adherirane na površinama kako bi stvorile sesilnu populaciju.

Zaključeno je da bakterije adheriraju za čvrstu površinu i žive u sesilnim zajednicama s određenim ciljem, a to je tvorba strukture koju nazivamo biofilm. Život u biofilmu bakterijama daje niz prednosti koje su opisane u nastavku rada. Otkrićem navedenog, počeo je veći interes znanstvenika na temu biofilma i načina na koji on nastaje te što nudi. (1)

### 1.1. Definicija biofilma i komunikacija bakterija unutar njega

Jednostavnija definicija biofilma je da je biofilm sesilna zajednica bakterija u vlastitoj sluzi koja se formira na mjestu gdje tekućina dodiruje čvrstu podlogu. Proširena definicija je: „biofilmom se smatra sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno te uronjene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a očituju izmijenjen fenotip zbog promijenjene brzine reprodukcije i transkripcije gena koja se ne uočava u planktonskih mikroorganizama. Bakterije koje čine biofilm zaštićene su od negativnih utjecaja okoliša, imaju sposobnost disperzije i pokazuju vrlo veliku rezistenciju na djelovanje antibakterijskih čimbenika kao što su antibiotici.“ (2)

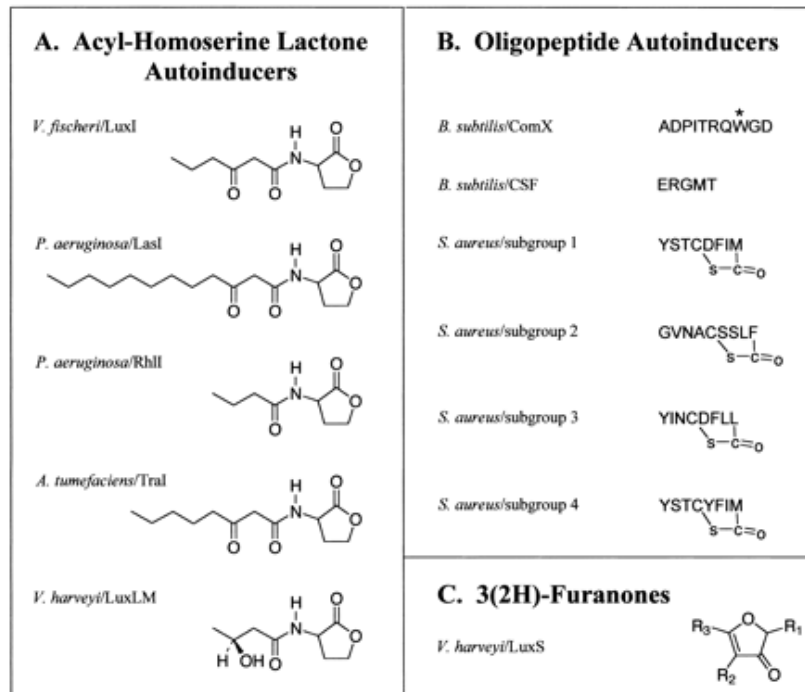
Da bi došlo do formiranja biofilma, prvo treba doći do adherencije bakterije na površinu. Bakterija to čini pomoću adhezina koji mogu biti dio stanične stijenke bakterije ili ih bakterije izlučuju u obliku sluzave mase koja je građena od lanaca polisaharida. Najčešće su adhezini prisutni u obliku fimbrija, a to su proteinski izdanci na površini bakterijske stanice vidljivi samo pomoću elektronskog mikroskopa, a nazivaju se još i pili. Nakon što se bakterija pomoću pila adherira na površinu i formira zreli biofilm, na sluzavi izvanstanični matriks otpada 80-85% biofilma, dok mikroorganizmi čine ostatak. (2)

Komunikaciju bakterija u biofilmu možemo podijeliti na komunikaciju među bakterijama pripadnicima iste vrste i komunikaciju među bakterijama različitih vrsta, pri čemu se koriste različite signalne molekule kako bi bakterijama u blizini priopćile da se pripreme na neugodne promjene u okolini. Prema definiciji, detekcija kvoruma (eng. *quorum sensing*) je inicijacija ekspresije gena pri graničnoj koncentraciji međustaničnih signalnih molekula koji se nazivaju



autoinduktori. Detekcija kvoruma predstavlja oblik intraspecijske komunikacije. Dva su osnovna tipa autoinduktorskih molekula:

- AHL (acil homoserin lakton) koje stvaraju gram negativne bakterije i
- AIP (autoinduktorski peptidi) koje stvaraju gram pozitivne bakterije.

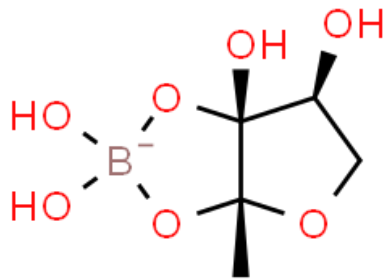


Slika 1. Tipovi i primjeri autoinduktorskih molekula

(<https://www.researchgate.net/publication/277243998> Cooperative signal amplification for molecular communication in nanonetworks)

Detekcija kvoruma bakterijskoj populaciji u biofilmu doprinosi na puno načina. Ona omogućava bakterijama ponašanje poput višestaničnog organizma te razgradnju složenih kemijskih struktura (kao što su to polimeri) i osiguravanje dovoljne količine hranjivih tvari. Također čini bakterije nevidljivima obrambenim mehanizmima domaćina sve dok se broj bakterija ne poveća u dovoljnoj mjeri. Populacija bakterija može kontrolirati ekspresiju gena u cijeloj zajednici.

Za razliku od komunikacije među bakterijama iste vrste, u komunikaciji među bakterijama različite vrste, bakterije koriste univerzalni bakterijski jezik – molekulu AI-2 (eng. Autoinducer-2). Kemijski gledano, AI-2 je furanozilborat diester (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>BO<sub>7</sub><sup>-</sup>) te je njegova zadaća poticanje ekspresije gena u stacionarnoj fazi i inhibicija početka replikacije DNK. (3)



Slika 2. Kemijska struktura signalne molekule AI-2 (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393894.html>)

Prednosti života u biofilmu su dostupnost hranjivih stvari, zaštita od antibiotika i ostalih fizikalnih i kemijskih čimbenika te diseminacija (mogućnost širenja). Bakterije u biofilmu su 150 do 3000 puta otpornije prema klornim preparatima nego pojedinačno. Nakon dezinfekcije, bakterije produciraju više vanstanične sluzi da se bolje zaštite. Unutar biofilma potrebna je preko stotinu puta veća koncentracija antibiotika da se uništi stanica. (4)

## 1.2. Dezinfekcija

Dezinfekcija je postupak uklanjanja i/ili uništavanja vegetativnih oblika mikroorganizama, ali ne i njihovih spora. Može se provesti fizikalnim i kemijskim postupcima. U fizikalne metode ubrajaju se filtracija, upotreba mikrovalova te pasterizacija. U kemijske metode spada primjena dezinficijensa. Kemijski dezinficijensi uništavaju vegetativne stanice patogena. Neki dezinficijensi reduciraju prolaznu mikrobiotu kože i kao takvi se mogu upotrebljavati za dezinfekciju ruku i kože, dok su drugi dezinficijensi vrijedni samo u upotrebi na neživim površinama. Kemijske dezinficijense možemo razvrstati prema djelotvornosti i prema kemijskom sastavu. Visok stupanj djelotvornosti imaju oni dezinficijensi koji uništavaju sve mikroorganizme, čak i bakterijske spore u produljenom vremenu djelovanja. Srednji stupanj djelotvornosti imaju dezinficijensi koji ni u duljem vremenu djelovanja ne mogu uništiti bakterijske spore, ali ostale oblike mogu. Dezinficijensi niskog stupnja djelotvornosti djelotvorni su prema vegetativnim bakterijama i ovijenim virusima. (2)

Prema kemijskom sastavu dijele se na:

- a. alkohol bazirane,
- b. dezinficijense s halogenim elementom,
- c. klorheksidin,
- d. vodikov peroksid,
- e. površinski aktivne spojeve,

- f. fenole,
- g. glutaraldehid i formaldehid. (2)

U metode prirodne dezinfekcije još se svrstava dezinfekcija pomoću sunčeve svjetlosti, dezinfekcija taloženjem te dezinfekcija pomoću bakteriofaga.

Djelotvornost dezinficijensa ovisi o brojim čimbenicima među kojima se nalaze vrsta mikroorganizma i njihov oblik, broj mikroorganizama, kemijski sastav i koncentracija dezinficijensa, pH sredine, temperatura, čistoća površine te vrijeme potrebno za postizanje dezinficijenskog učinka. (5)

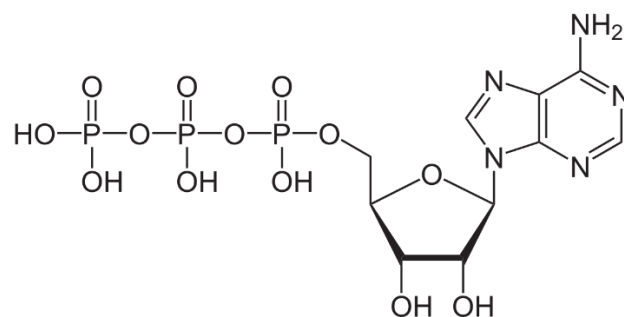
Dezinficijensi djeluju najčešće na jedan od slijedećih načina:

- a. onemogućavaju sintezu stanične stijenke mikroorganizma,
- b. oštećuju citoplazmatsku membranu,
- c. ometaju mijenu tvari mikroorganizama djelovanjem na enzimske procese i
- d. denaturiraju bjelančevine mikroorganizama. (5)

### 1.3. Struktura ATP-a i ATP bioluminiscencija

ATP bioluminiscencija je brz, jednostavan i visoko osjetljiv proces koji daje uvid u količinu svjetla koju producira bakterija zahvaljujući reakciji ATP-a s luciferinom i luciferazom.

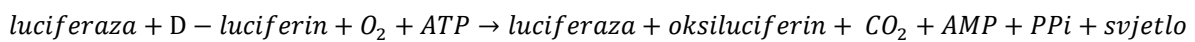
Adenozin trifosfat (ATP) molekula je vrlo važna za organizam. Ima središnju ulogu u prijenosu slobodne energije. ATP sastoji se od purinske baze adenina, šećera riboze i tri fosfatne skupine, a u stanicama se obično nalazi u obliku labavog kompleksnog spoja magnezija. Energija je pohranjena u obliku fosfoanhidridne veze koja se stvara između fosfatnih skupina u molekuli. (6)



Slika 3. Kemijska struktura adenozin trifosfata  
(<https://biologydictionary.net/wp-content/uploads/2017/01/ATP-Structure.jpg>)

ATP se može hidrolizirati u adenzin difosfat (ADP) i jedan fosfatni ostatak koji nazivamo ortofosfat (Pi) ili u adenzin monofosfat (AMP) i dva fosfatna ostatka koji nazivamo pirofosfat (PPi), prilikom čega se oslobađa određena količina energije. ATP nastaje tijekom oksidacije molekula hranjivih sastojaka i kontinuirano se troši i stvara. Molekula ATP-a sadrži dvije energijom bogate fosfoanhidridne veze budući da sadrži tri fosfatne skupine. (6)

ATP bioluminiscencija je metoda koja se još naziva tehnikom mjerenja energije. Temelji se na mogućnosti mjerenja ATP molekule koju posjeduju bakterije i ostala živa bića (7). U prisutnosti ATP-a, luciferaza zajedno s kofaktorima D-luciferinom i kisikom producira svjetlo prema sljedećoj reakciji: (8)

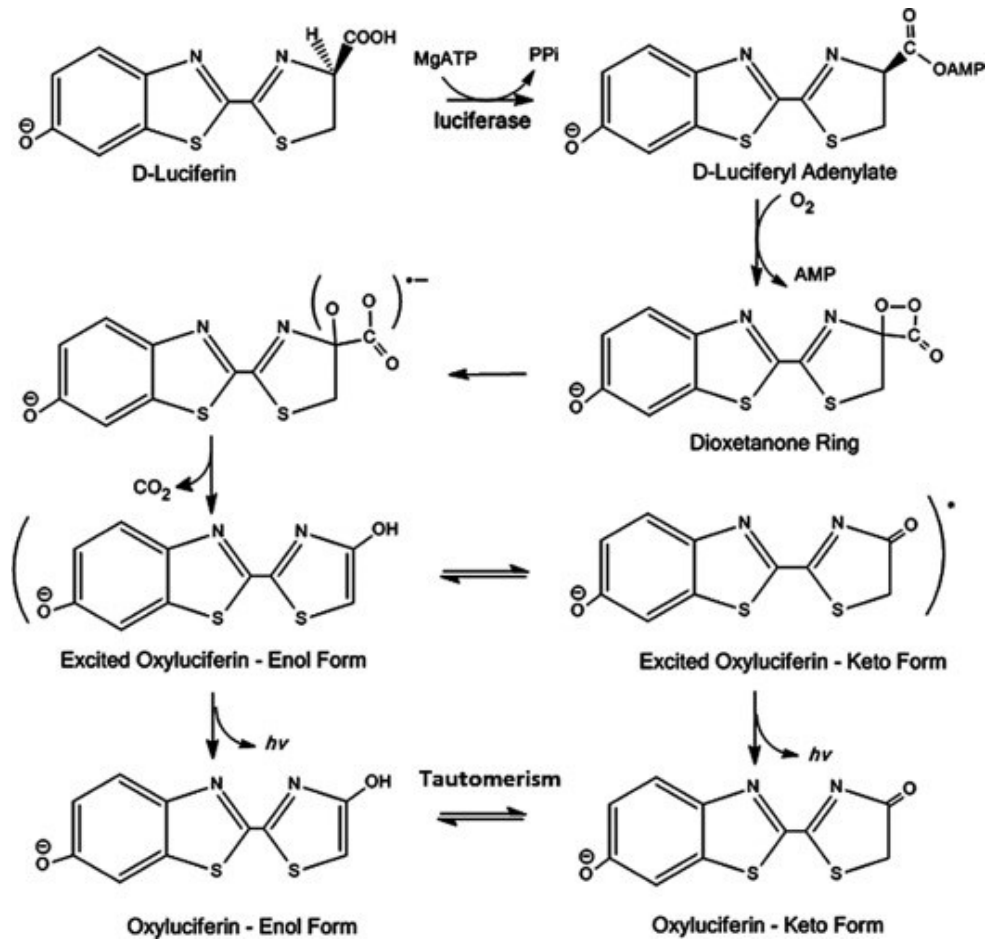


Ova kemijska reakcija katalizirana je enzimom luciferazom. Luciferaze su skupina enzima koji kada oksidiraju supstrat (luciferin) produciraju svjetlo. Osim bakterijskih luciferaza, luciferaze mogu poteći iz žarnjaka (*Renilla reniformis*), kopepoda (*Gaussia princeps*) i rakova (*Cypridina noctiluca*). (9)

Ukratko, do emisije svjetla dolazi jer se u reakciji formira oksiluciferin u elektronski pobuđenom stanju. Budući da je oksiluciferin u pobuđenom stanju, on otpušta foton svjetlosti te se vraća u osnovno nepobuđeno stanje, što je sukladno njegovoj težnji. (7)

Detaljnije govoreći, D-luciferin uz pomoć enzima luciferaze i otpuštanja pirofosfata tvori D-luciferil adenilat. Nakon aktivacije ATP-om, D-luciferil adenilat oksidira i nastaje dioksietanonski prsten. Dekarboksilacija tog produkta uzrokuje formiranje oksiluciferina u pobuđenom stanju koji tautomerizira i postoji u keto-enolnim formama. Reakcijom se otpušta foton energije (kvant) koji oksiluciferin vraća u osnovno stanje. (Slika 4.) (7)

Količina emitiranog svjetla mjeri se luminometrom. Luminometar je uređaj koji ima svoj softver i jednu komoru u koju se stavljaju specifični brisni štapići. Nakon što se uzorak prebrisan brisnim štapićem stavi u komoru luminometra, odabire se program „ATP Surface Test“ i u roku od deset sekundi na ekranu luminometra ispisuje se RLU vrijednost. RLU (eng. *Relative Light Units*) vrijednost proporcionalna je količini ATP-a koji se nalazio na brisnoj površini. (Slika 5.) (10)



Slika 4. Kemijska reakcija D-luciferina u oksiluciferin  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128119822000032>



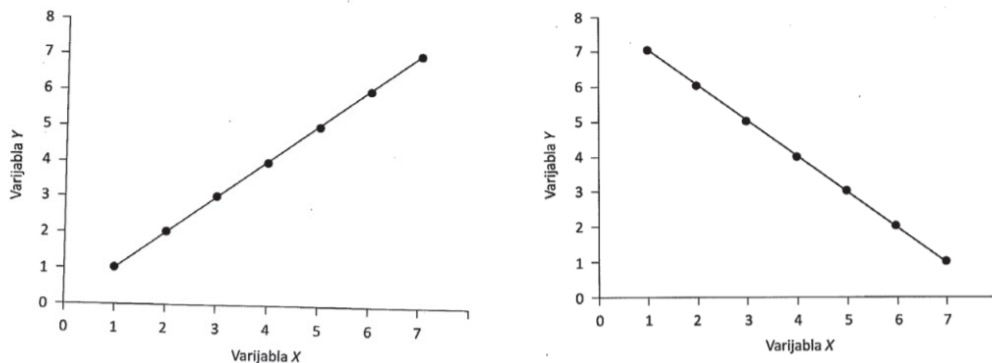
Slika 5. 3M Clean-Trace™ uređaj za očitavanje brzog ATP Surface testa - luminometar

U reakciji kataliziranoj bakterijskom luciferazom, reducirani flavin mononukleotid (FMNH<sub>2</sub>) oksidira aldehid u karboksilnu kiselinu. Formira se pobuđeni hidrosiflavin koji je dehidriran produktom flavinom mononukleotidom (FMN) i emitira plavo-zelenu svjetlost. (7)



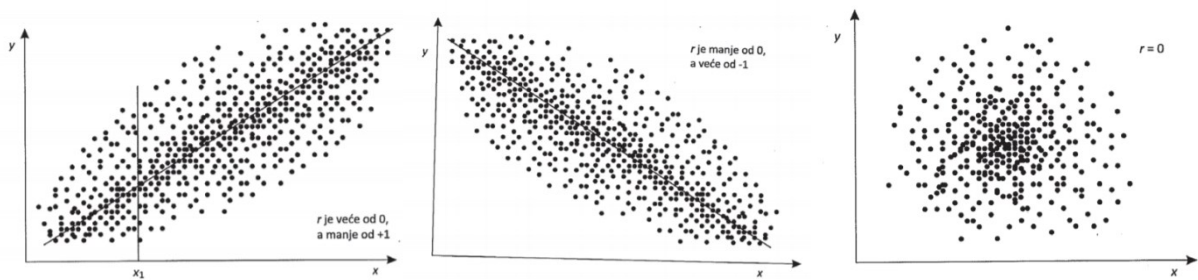
#### 1.4. RLU i CFU korelacija

Korelacija predstavlja povezanost varijabli. Može biti jednostruka te onda predstavlja povezanost između dvije varijable i višestruka gdje predstavlja više varijabli povezanih jednom zavisnom varijablom. Matematička funkcija kojom modeliramo povezanost varijabli naziva se regresija. Ako je ta jednostruka povezanost modelirana pravcem govorimo o linearnoj regresiji. Ukoliko je jednostruka povezanost modelirana nelinearnom krivuljom riječ je o nelinearnoj regresiji. Regresija može biti i višestruka koja se bazira na modelu linearne povezanosti više varijabli s jednom zavisnom. U slučaju jednostruke korelacije, važan je podatak Pearsonov koeficijent korelacije „ $r$ “. To je broj koji pokazuje koliko je povezanost ove dvije varijable bliska funkcijskoj povezanosti. Funkcija povezanost iskazuje se jednadžbom. Osim funkcije povezanosti, postoji statistička povezanost gdje svakoj vrijednosti jedne varijable odgovara više različitih vrijednosti druge varijable. Pearsonov koeficijent korelacije može poprimiti vrijednosti iz intervala  $|r| \leq 1$  gdje  $|r| = 1$  označava potpunu korelaciju. (11)



Slika 6. Prikaz potpune pozitivne i potpune negativne korelacije (Petz B., Kolesarić V., Ivanec D. Petzova statistika. 5.izd. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2012)

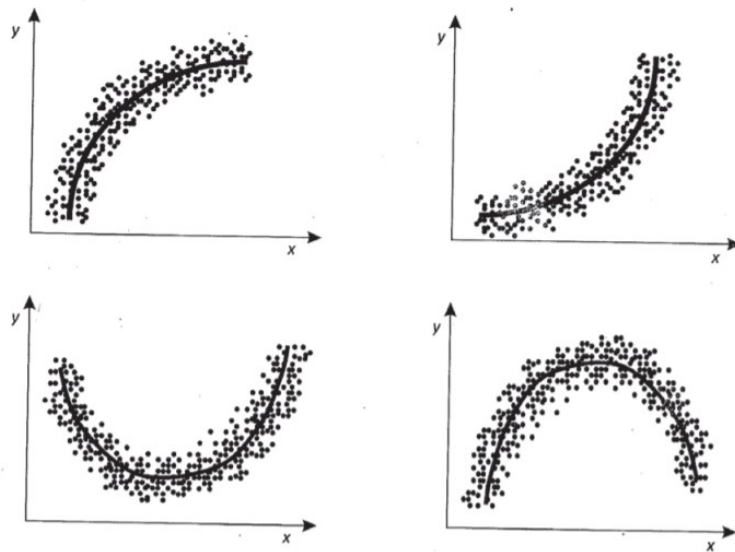
Na slici 6. lijevi graf predstavlja potpunu pozitivnu korelaciju gdje je  $r = 1$ , a desni graf potpunu negativnu korelaciju gdje je  $r = -1$ . Vidljivo je da je lijevi graf linearno rastući, a desni graf linearno padajući. (11)



Slika 7. Kvalitativne ocjene Pearsonovog koeficijenta korelacije (Petz B., Kolesarić V., Ivanec D. Petzova statistika. 5.izd. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2012)

Na gornjoj slici (slika 7.) prvi graf s lijeva prikazuje nepotpunu pozitivnu korelaciju, srednji graf prikazuje nepotpunu negativnu korelaciju, a zadnji nepostojeću korelaciju. (11)

Osim linearne povezanosti, postoje i različiti oblici nelinearne povezanosti čiji su primjeri prikazani na slici 8.



Slika 8. Različiti oblici nelinearne povezanosti između dvije varijable (Petz B., Kolesarić V., Ivanec D. Petzova statistika. 5.izd. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2012)

Prema Borisu Petzu, u znanostima koje se bave živim bićima, praktički je skoro pa nemoguće dobiti potpunu povezanost, bilo linearnu ili zakrivljenu te su dva su opća razloga tome. U navedenim područjima, uvijek postoje složene, ne jednostavne veze među pojavama, odnosno varijablama koje promatramo, pa ako računamo korelaciju između samo dvije varijable, vrlo je vjerojatno da nećemo dobiti niti potpunu niti veliku povezanost istih izraženu koeficijentom korelacije. Kao drugi razlog navedena je nesavršenost mjerenja. (11)

Bolja mjera za ocjenu povezanosti varijabli od Pearsonovog koeficijenta korelacije je koeficijent determinacije. Označava se sa „ $R^2$ “. Koeficijent determinacije zapravo je kvadrat Pearsonovog koeficijenta korelacije. Dvostruko veći Pearsonov koeficijent korelacije ne znači dvostruko, već četverostruko jaču povezanost. (11) Za primjer, ukoliko je  $r = 0,3$  ( $R^2 = 0,09$ ) znači da samo 9% podataka varijabli zajednički varira, odnosno preostalih 91% varijacija dolazi od drugih doprinosa, a ne od povezanosti tih varijabli. Dakle,  $R^2$  daje postotak (%) mogućnosti da linearnim modelom predvidimo vrijednost zavisne varijable.

U slučaju ovog rada, navedeno bi trebalo značiti da što je RLU vrijednost za jedno mjerenje veća, to je i CFU vrijednost veća te obrnuto. Ukoliko je RLU vrijednost za jedno mjerenje manja, to će i CFU vrijednost biti manja. Isto tako, jedna od mogućnosti je da korelacije između CFU i RLU vrijednosti neće biti.

## **1.5. Karakteristike bakterija korištenih u radu**

### **1.5.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* je prema klasifikaciji gram pozitivna okrugla bakterija koja formira nakupine bakterije u obliku grozda. Vrlo je čest uzročnik infekcija u ljudi. Stanovnik je vlažnih dijelova kože te nosnog vestibula, a kao normalna mikrobiota nalazi se u probavnom sustavu. *S. aureus* na površini stanične stijenke posjeduje polisaharidnu kapsulu. Lanci N-acetilmuramične kiseline i N-acetilglikozamina povezani pentaglicinskim mostovima tvore peptidoglikan, makromolekulu od koje je građena stanična stijenka. Druga bitna komponenta stanične stijenke, a antigenski specifična za *S. aureus* je teikoična kiselina. (2)

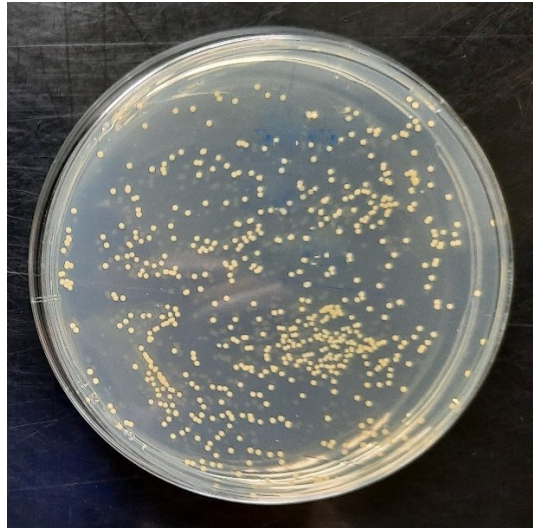
Širi se od čovjeka do čovjeka izravnim ili neizravnim kontaktom, preko različitih predmeta i kapljicama pri kihanju i kašljanju. (2)

Ova bakterija formira bjelkaste kolonije koje s vremenom mogu postati žućkaste i od tuda naziv *aureus* (zlatni). Na krvnom agaru, vidljiva je uska zona  $\beta$ -hemolize. Prema količini kisika koja mu je potrebna za preživljavanje, svrstava se u kategoriju fakultativnih anaeroba, ali najbolje raste aerobno (u prisutnosti kisika) na temperaturama između 18 °C i 40 °C. Fakultativni anaerobi su organizmi koji podnose kisik, ali rastu i bez njegove prisutnosti u okolini. Od ostalih karakteristika vezanih za strukturu i fiziologiju, *S. aureus* ne posjeduje flagele, ne formira spore i nepokretan je. Producira nekoliko enzima od kojih je najvažnija koagulaza. (2)

Enterotoksini *S. aureus* imaju sposobnost uzrokovati gastrointestinalne simptome (2). Spomenuti enterotoksini mogu se pojaviti u mesnim ili ribljim salatama koje nisu čuvane na odgovarajući način, u jajima i proizvodima koji sadrže jaja (kreme i umaci) te u mliječnim



proizvodima, čokoladi, kolačima i sladoledima (12). Smatra se da enterotoksini djeluju direktno na neuralne receptore gornjeg dijela probavnog sustava pritom dovodeći do stimulacije centra za povraćanje. *S. aureus* infektivan je ako je riječ o ozljedi ili nekom drugom čimbeniku koji omogućuje neometan ili olakšan pristup tkivu ili organima (2).



Slika 9. Kolonije *Staphylococcus aureus* na Mueller-Hinton agaru

*S. aureus* može izazvati otrovanje hranom, no u tom slučaju uopće nema infekcije budući da se toksin proizvodi u hrani, a toksin dopijeva u probavni sustav konzumacijom hrane u kojoj se egzotoksin nalazi. Nakon par sati počinju simptomi kao što su povraćanje i proljev, bez temperature. Oporavak je brz. *S. aureus* uzročnik je bakterijemije, endokarditisa, pneumonije i drugih sustavnih infekcija. (2)

Osjetljiv je na povišenu temperaturu i dezinficijense korištene u bolnicama. Može rasti u halofilnim uvjetima, kao i u prisutnosti visoke koncentracije šećera. Mogućnost rasta u prisutnosti visoke koncentracije šećera omogućuje mu da raste u različitoj hrani. Lako se prilagođava na različite uvjete okoline, a vrlo lako stječe rezistenciju na antibiotike kao što je to na primjer meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA). (2)

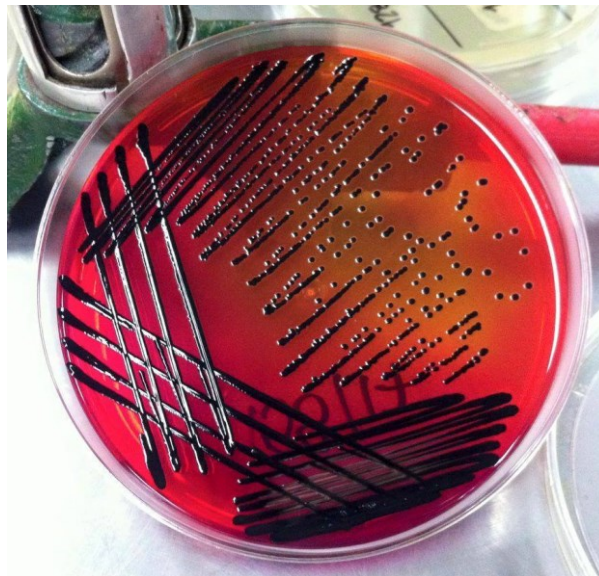
### 1.5.2. *Salmonella* Typhimurium

U rodu *Salmonella* postoje samo dvije vrste: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori* u kojoj ima više od 2500 serotipova. Humani se patogeni nalaze u vrsti *Salmonella enterica* u podvrsti

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* koja broji oko 1400 serotipova, unutar koje se nalazi *Salmonella* Typhimurium. (2)

*Salmonella* Typhimurium je gram negativni fakultativno anaerobi asporogeni štapić. Pokretna je zahvaljujući peritrihijalnim flagelama i nema vidljivu kapsulu. Otporna je na vanjske uvjete i dugo preživljava izvan domaćina. Pokazuje termorezistenciju tako da može preživjeti 48 sati na temperaturi od 42 °C i može preživjeti zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici. Osjetljiva je na kiseli pH i klor pa ju kloriranje vode za piće uništava. Temperatura od 56 °C ju ubija za 20 do 30 minuta. (2)

U čovjeka, *S. Typhimurium* najčešće uzrokuje upalu sluznice želuca te tankog i debelog crijeva, odnosno gastroenteritis. Zoonotične salmoneloze česte su u razvijenim zemljama zbog učestalog načina prehrane u restoranima brze hrane, a izvor zoonotičnih salmoneloza je kontaminirana hrana životinjskog podrijetla ili kontaminirana voda. Najčešće su izvor jaja i nedovoljno termički obrađeno meso peradi te mlijeko i mliječni proizvodi. Infektivna doza je  $10^6 - 10^8$  salmonela. (2)



Slika 10. *Salmonella* Typhimurium na XLD agaru  
(<https://microbenotes.com/salmonella-typhimurium-on-xld-agar/>)

Najbolje raste na SS ili XLD (eng. xilose lysine deoxychocolate) agaru gdje se očituje laktoza negativnim kolonijama koje u sredini imaju crnu točku zbog produkcije sumporovodika ( $H_2S$ ) koji sa solima željeza stvara željezni sulfid. (2)

### 1.5.3. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* je asporogeni gram pozitivni štapić. Govoreći o potrebi za kisikom, aerob je ili fakultativni anaerob. Nema kapsulu i na 37 °C nije pokretna, ali može biti pokretna

ukoliko se uzgoji na temperaturi koja je niža od 30 °C. Na krvnom agaru prisutna je uska zona β-hemolize među kolonijama. (2)

*L. monocytogenes* ulazi u čovjekov organizam kroz probavni sustav. One bakterije koje prođu crijevnu barijeru, putem krvi inficiraju hepatocite. Ima izraženu predilekciju za posteljicu i mozak. Infekcija posteljice može rezultirati infekcijom ploda. (2)

Listerioza je infekcija uzrokovana bakterijom *L. monocytogenes* te se može očitovati različitim kliničkim slikama, ovisno o tome koliko je neka hrana kontaminirana, koliko je virulentan soj te kakva je osjetljivost domaćina. Kolonizacija crijeva obično prolazi bez simptoma, u novorođenčadi i starijih osoba najizraženija je klinički izražena listerioza. Može doći do bakterijemije, sepse i infekcije središnjeg živčanog sustava. (2)

*L. monocytogenes* uzročnik je zoonoze. Prenosi se na čovjeka uglavnom preko kontaminirane hrane, posebno mlijeka i mliječnih proizvoda, ali i mesa, ribe, školjki (2). Uz njih, izdvaja se i nedovoljno termički obrađena piletina i fermentirane kobasice (12). Pretpostavlja se da je infektivna doza za ljude  $10^7$  -  $10^{10}$  bakterija po gramu namirnice. Otporna je na postupke koji se primjenjuju u obradi hrane te raste pri niskim temperaturama pa se umnaža i u namirnicama skladištenim u hladnjacima (2).



Slika 11. *Listeria monocytogenes* na krvnom agaru  
(<https://medium.com/@MicrobeADay/listeria-monocytogenes-646c323d0039>)

## 2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga rada bio je detektirati biofilm bakterija *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium te *Listeria monocytogenes* na keramičkim pločicama *in vitro* pomoću ATP bioluminiscencije te odrediti RLU i CFU/mL na tim površinama bez tretmana dezinficijensom i sa tretmanom dezinficijensom dvjema različitim koncentracijama te usporediti njihovu učinkovitost, odrediti postotak inhibicije i vrijednost korelacije te dvije varijable.

Hipoteza ovog istraživanja je bila da što je na nekoj površini više bakterija, biti će više ATP-a prisutno, samim time biti će veća RLU vrijednost, ali i CFU/mL. Sve ovo trebalo bi vrijediti i obrnuto. Druga hipoteza je ta da je 20%-tni dezinficijens djelotvorniji od 5%-tnog, odnosno da će se primjenom 20%-tnog dezinficijensa dobiti niže vrijednosti RLU i CFU/mL nego primjenom 5%-tnog dezinficijensa.

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Laboratorijski pribor i uređaji**

- Epruvete
- Plastični L štapić
- Plastične i staklene Petrijeve zdjelice
- Plastična šprica od 10 mL
- Müller – Hinton agar
- Brisni štapići 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100
- 3M Clean-Trace™ uređaj za očitavanje brzog ATP Surface testa - luminometar
- Multikolonijalna pipeta s nastavcima
- Inkubator
- Bunsenov plamenik
- Ultrazvučna kupelj
- Tresilica
- Mikrotitarska ploča s jažicama
- Pinceta
- Automatske pipete: 10-1000 µL, 20-100 µL, 20-200 µL
- Nastavci za automatske pipete
- Štoperica

##### **3.1.2. Kemikalije**

- Fiziološka otopina
- Autoklavirana voda iz slavine
- 5% sredstvo za čišćenje Bis duo Active (Saponia, Hrvatska)
- 20% sredstvo za čišćenje Bis duo Active (Saponia, Hrvatska)
- Neutralizacijsko sredstvo pH 9 + tiosulfat

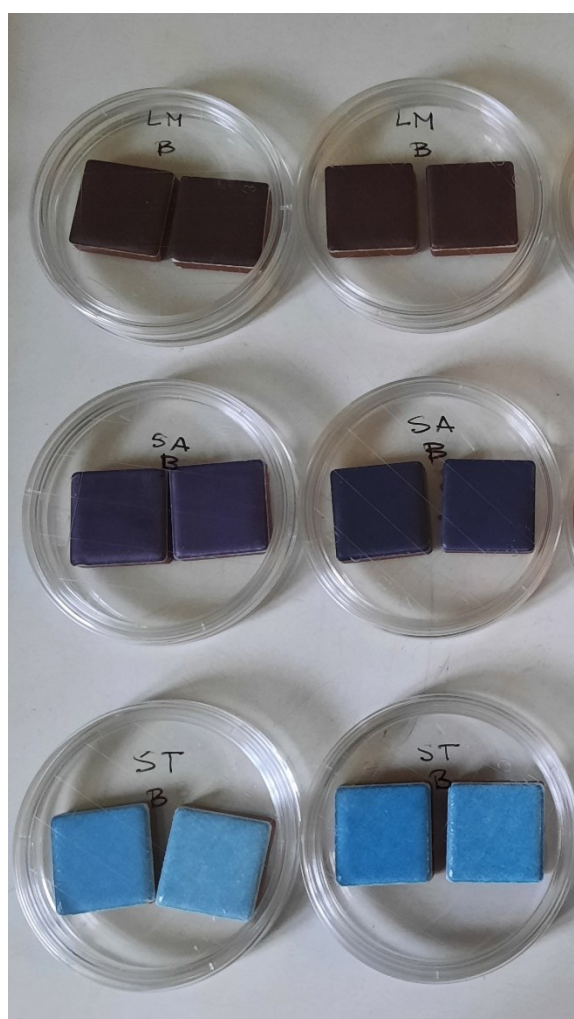
##### **3.1.3. Korišteni mikroorganizmi**

Za potrebe rada korištene su sljedeće bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Bakterije su čuvane na -80°C u glicerol bujonu. Neposredno prije korištenja u pokusima, bakterije su nasadene na MH agar i kultivirane na 37°C tijekom 24 sata.

## 3.2. Postupci

### 3.2.1. Priprema keramičkih pločica za obradu bez tretmana dezinficijensom

Korištene keramičke pločice veličine su 2,5 cm x 2,5 cm. Pločice su prvo stavljene u Petrijevu zdjelicu te su prelivene agarom na način da gornja strana ostane izložena zraku. Pripremljena je bakterijska suspenzija od  $10^6$  CFU/mL u Mueller-Hinton bujonu za svaku od korištenih bakterija. Pločice su zatim prelivene pripremljenim bakterijskim suspenzijama te stavljene na inkubaciju uz miješanje 24 sata. Nakon toga, izvađene su sterilnom pincetom, isprane sterilnom fiziološkom otopinom te prebačene u nove Petrijeve zdjelice, posebno za *S. aureus*, *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*.

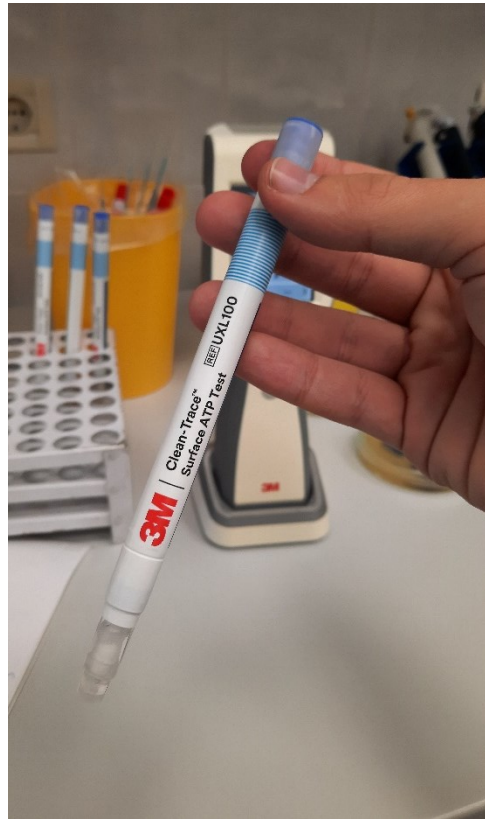


Slika 12. Priprema keramičkih pločica za obradu

#### 3.2.1.1. Mjerenje RLU na keramičkim pločicama bez tretmana dezinficijensom

Kompletna površina pločice je prebrisana brisnim štapićem 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100. Svaki mikroorganizam koji je bio na površini sadrži ATP i reagirat će s reagensom na dnu brisnog štapića i producirati određenu količinu svjetla koju će luminometar

očitati. Reagens je luciferin i luciferaza. Brisni štapić uronjen je u reagens i miješano je lijevo-desno jednu minutu. Nakon jedne minute, brisni štapić stavljen je u 3M Clean-Trace™ luminometar. Odabran je program ATP Surface Test i u roku od deset sekundi uređaj je dao RLU vrijednost. Za svaku pločicu napravljeno je deset mjerenja, nakon svake minute jedno.

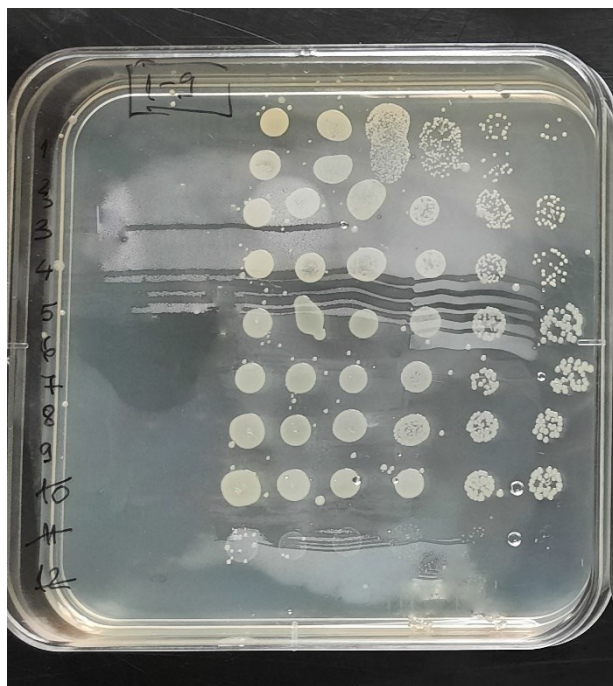


Slika 13. Brisni štapić 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100

### 3.2.1.2. Određivanje CFU na keramičkim pločicama bez tretmana dezinficijensom

Pločica je sterilnom pincetom prebačena iz Petrijeve zdjelice u epruvetu u koju je prethodno stavljeno 10 mL fiziološke otopine. Epruveta je vorteksirana te je iz uzorka uzeto 200  $\mu$ L i prebačeno u prvi stupac mikrotitarske pločice s jažicama. Rađena je serija deseterostrukih razrjeđenja. Pomoću multikanalne pipete ostale jažice su napunjene sa 180  $\mu$ L fiziološke otopine. Nakon toga iz prve jažice, gdje je izvorni uzorak, uzeto je 20  $\mu$ L te prebačeno u 180  $\mu$ L fiziološke otopine stupac do i tako je redom napravljeno pet razrjeđenja. Zatim je iz jažica u kojima je napravljeno razrjeđenje uzimano po 10  $\mu$ L te prebačeno na Mueller-Hinton agar u obliku kapi te ostavljeno preko noći u inkubatoru na  $(35\pm 1)$  °C kako bi kolonije narasle.



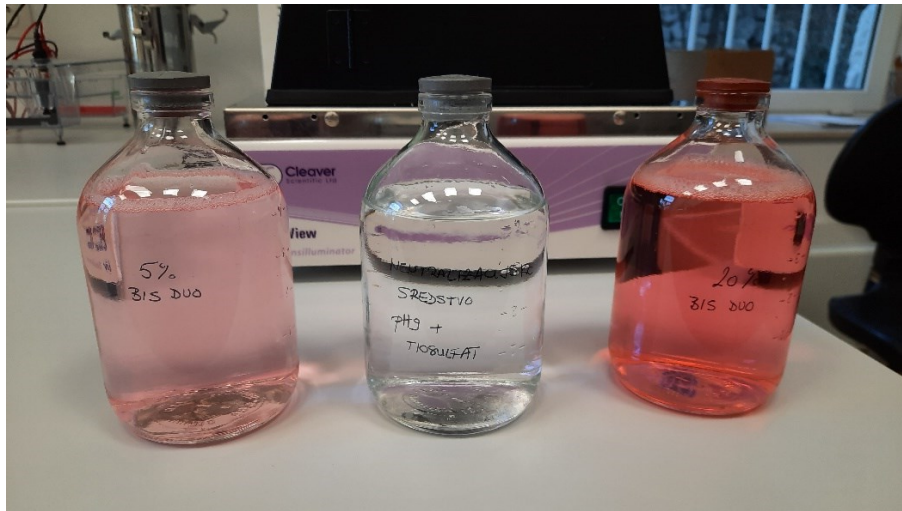


Slika 14. Porast kolonija *S.aureus*, *S. Typhimurium* i *L.monocytogenes* različitih razrjeđenja na agaru

### 3.2.2. Priprema keramičkih pločica za obradu s tretmanom dezinficijensom

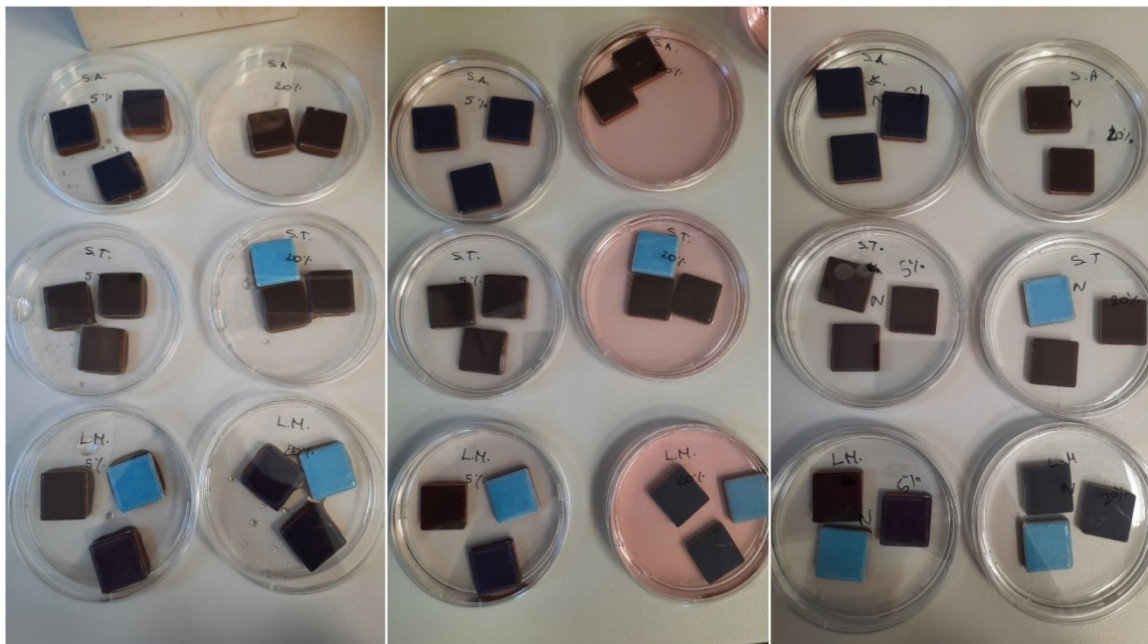
Korištene keramičke pločice veličine su 2,5 cm x 2,5 cm. Uzeto je šest malih Petrijevih zdjelica – za *S aureus*, *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes* po dvije – i u njih su stavljene keramičke pločice. Jedna od dvije Petrijeve zdjelice za određenu bakteriju određena je za tretman s 5%-tnim dezinficijensom, a druga za tretman 20%-tnim dezinficijensom. Svaka Petrijeva zdjelica sadržavala je tri keramičke pločice uzete iz agara. Keramičke pločice uzete iz agara prije ubacivanja u Petrijeve zdjelice i tretmana, isprane su pomoću šprice od 10 mL u kojoj je bila sterilna fiziološka otopina. U Petrijeve zdjelice označene s „5%“ uliveno se 5%-tnog dezinficijensa Bis duo Active, a u Petrijeve zdjelice označene s „20%“ uliveno se 20%-tnog dezinficijensa Bis duo Active i to na način da je površina keramičkih pločica kompletno prekrivena dezinficijensom.





Slika 15. Korišteni dezinficijens BIS DUO Active koncentracija 5% i 20% te neutralizacijsko sredstvo pri pH 9 s tiosulfatom

U takvim uvjetima pločice su stajale deset minuta nakon čega su prebačene u unaprijed pripremljene Petrijeve zdjelice u kojima je bilo uliveno neutralizacijsko sredstvo pri pH 9 i tiosulfat gdje su također stajale deset minuta. Prebacivane su analogno; keramičke pločice *S. aureus* iz 5%-tnog dezinficijensa prebačene su u Petrijevu zdjelicu označenu s „S.A. 5% N“ i tako redom kako su stavljanje u radne koncentracije dezinficijensa. Nakon deset minuta u neutralizaciji, keramičke pločice su redom vađene i prebačene u čiste Petrijeve zdjelice. Kontrole (kontrolne pločice) su direktno iz agara prebačene u epruvete s 10 mL fiziološke otopine.



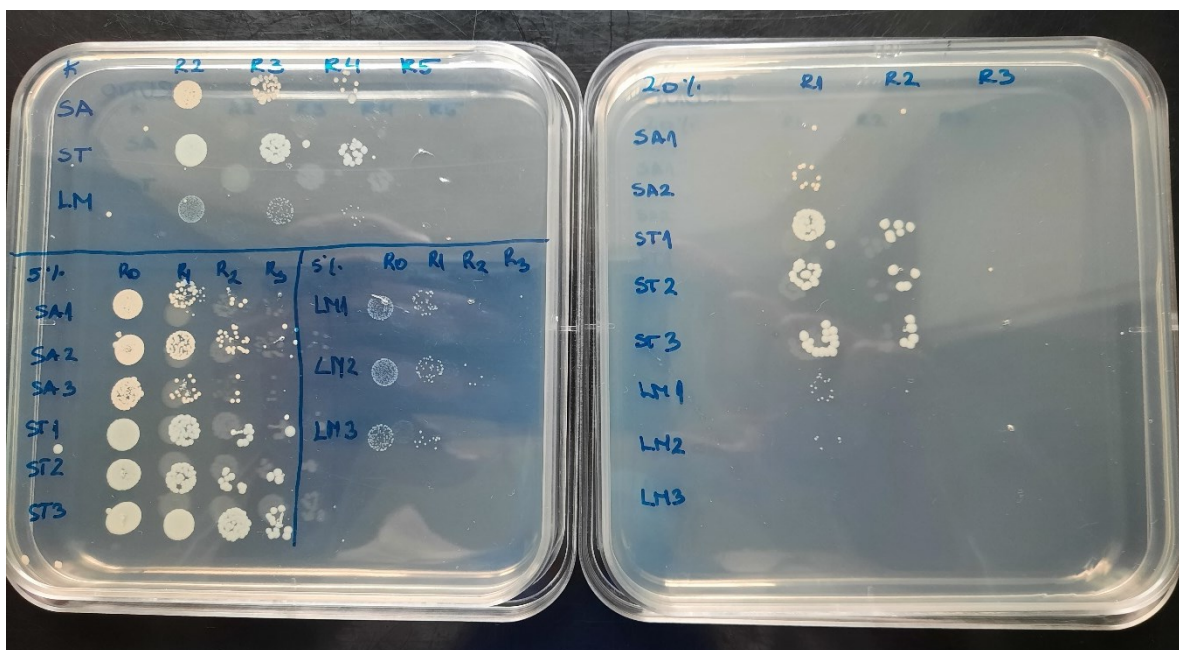
Slika 16. Prikaz keramičkih pločica prije stavljanja u dezinficijens, keramičkih pločica u 5% i 20% dezinficijensu te keramičkih pločica u neutralizacijskom sredstvu

### 3.2.2.1. Mjerenje RLU na keramičkim pločicama tretiranih dezinficijensom

Postupak je isti kao i za keramičke pločice koje nisu bile tretirane dezinficijensom. Prebrisana je površina keramičke pločice brisnim štapićem 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100, ubačena u reagens koji je dio navedenog brisnog štapića, miješano je lijevo-desno jednu minutu i nakon toga stavljeno u luminometar koji je dao RLU vrijednost. Napravljeno je deset mjerenja, nakon svake minute jedno.

### 3.2.2.2. Određivanje CFU na keramičkim pločicama tretiranih dezinficijensom

Tretirane pločice su prebačene iz čiste Petrijeve zdjelice u epruvete s 10 mL fiziološke otopine. Epruvete su stavljene minutu u ultrazvučnu kupelj te se ponavlja postupak kao s keramičkim pločicama koje nisu bile tretirane dezinficijensom. Rađena je serija deseterostrukih razrjeđenja. Napravljeno je pet razrjeđenja za kontrolne pločice i po tri razrjeđenja za pločice koje su tretirane. Na Müller-Hinton agar nasušeno je 10 $\mu$ L u obliku kapi drugog, trećeg i četvrtog razrjeđenja kontrola; 10  $\mu$ L u obliku kapi nultog, prvog, drugog i trećeg razrjeđenja pločica tretiranih 5%-tnim dezinficijensom te 10  $\mu$ L u obliku kapi prvog, drugog i trećeg razrjeđenja pločica tretiranih 20%-tnim dezinficijensom. Na Müller-Hinton agar nasušeno je 100  $\mu$ L nultog razrjeđenja pločica tretiranih 20%-tnim dezinficijensom i razmazano plastičnim L štapićem. Inkubirano preko noći na (35 $\pm$ 1) °C. Drugi dan je očitano i izračunane su vrijednosti.



Slika 17. Prikaz rasta kolonija bakterija nakon tretmana dezinficijensom na Müller-Hinton agaru

### 3.2.3. Izračunavanje postotaka inhibicije nakon primjene dezinficijensa

Postotci inhibicije računani su prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 1 - \frac{N_{\text{tretman}}}{N_{\text{kontrola}}} * 100$$

Postotci inhibicije računani su posebno za RLU i posebno za CFU/mL sa srednjim vrijednostima  $N_{\text{tretman}}$  i  $N_{\text{kontrola}}$  za svaku korištenu bakteriju.

$N_{\text{tretman}}$  je srednja vrijednost svih vrijednosti RLU ili CFU/mL nakon tretmana, a  $N_{\text{kontrola}}$  je srednja vrijednost svih vrijednosti RLU ili CFU/mL bez tretmana dezinficijensom. Postotak inhibicije računan je u odnosu na tretman s 5%-tnim dezinficijensom i bez tretmana te u odnosu na tretman s 20%-tnim dezinficijensom i bez tretmana kako bi usporedili učinak korištenih radnih koncentracija sredstva Bis duo Active.

#### 4. REZULTATI

Na temelju izvršenih metoda rada, dobiveni rezultati analizirani su u MS Excel-u i u programu Statistica. Statistica je prvenstveno korištena za izračun Pearsonovog koeficijenta korelacije, koeficijenta determinacije i prikaz 2D scatterplot dijagrama korelacije, a za preostali prikaz rezultata korišten je MS Excel. Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički.

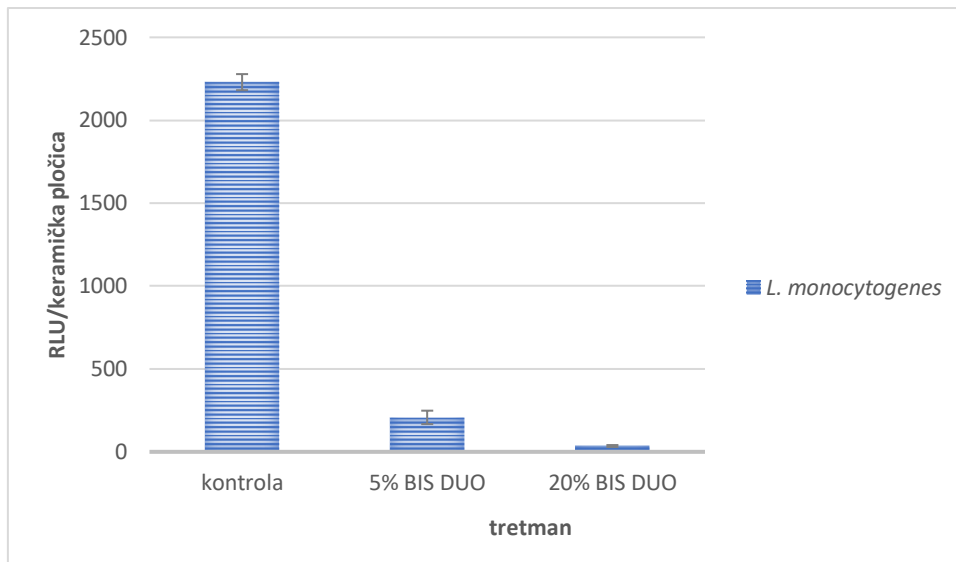
##### 4.1. Prikaz dobivenih RLU vrijednosti prije i nakon tretmana dezinficijensima

Luminometrom su dobivene vrijednosti RLU. Zapisane su u tablicu te obrađene. Izračunana je srednja vrijednost, standardna devijacija i postotak inhibicije. U računu su uzete srednje vrijednosti. Vrijednosti su zaokružene na dvije decimale. Rezultati su prikazani tablično i grafički. U Tablici 1. prikazane su srednje vrijednosti te pripadajuće standardne devijacije za kontrolne pločice, pločice tretirane 5% dezinficijensom i pločice tretirane 20% dezinficijensom za *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *S. aureus*.

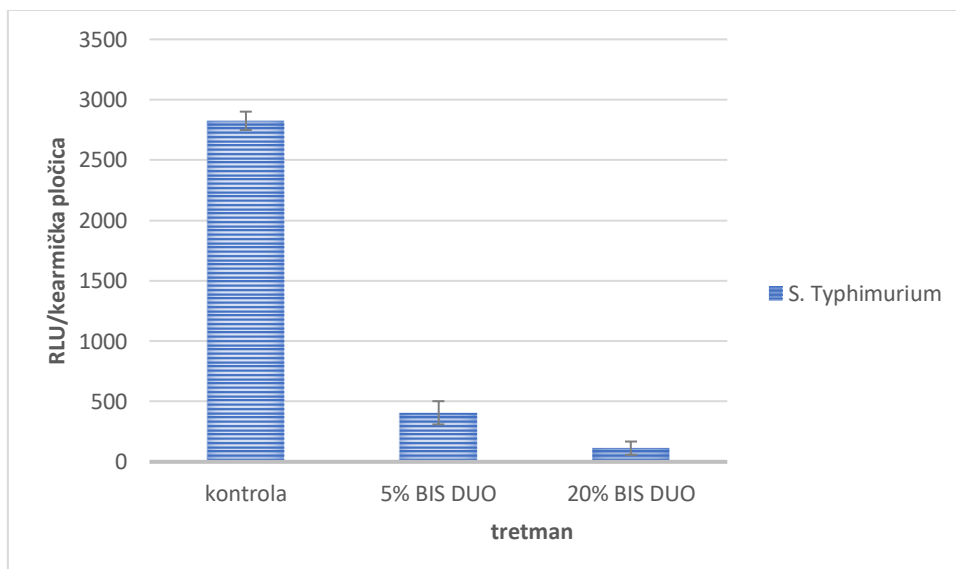
Tablica 1. Prikaz srednje vrijednosti RLU i standardne devijacije RLU za kontrolne pločice, pločice tretirane 5% dezinficijensom i pločice tretirane 20% dezinficijensom za *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *S. aureus*

	srednja vrijednost ± standardna devijacija (RLU)		
	kontrolna pločica	5% BIS DUO	20% BIS DUO
<i>Listeria monocytogenes</i>	2229,80±48,49	207,75±40,56	35,14±5,69
<i>Salmonella Typhimurium</i>	2825,20±75,97	406,25±96,34	112,75±55,37
<i>Staphylococcus aureus</i>	3468,71±514,69	156,50±54,03	59,50±5,81

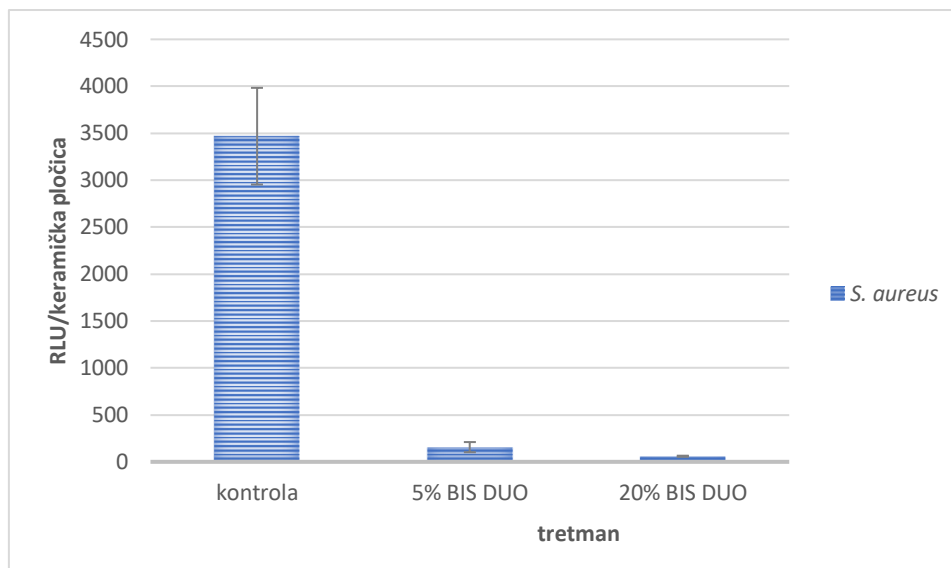
Iz gornje tablice vidljivo je da je najveći broj bakterija bio u biofilmu *S. aureusa*, zatim kod *S. Typhimurium* te konačno kod *L. monocytogenes*. Nakon primjene bilo koje od dvije korištene koncentracije dezinficijensa, broj bakterija se smanjuje. Postotak inhibicije prikazan je u Tablici 2.



Graf 1. Prikaz RLU vrijednosti na kontrolnoj pločici te nakon tretmana dezinficijensom na primjeru biofilma *L. monocytogenes*



Graf 2. Prikaz RLU vrijednosti na kontrolnoj pločici te nakon tretmana dezinficijensom na primjeru *S. Typhimurium*



Graf 3. Prikaz RLU vrijednosti na kontrolnoj pločici te nakon tretmana dezinficijensom na primjeru *S. aureusa*

Tablica 2. Postoci inhibicije za *L.monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *S. aureus* nakon tretmana 5% dezinficijensom i 20% dezinficijensom

	postotak inhibicije (%)	
	5% BIS DUO	20% BIS DUO
<i>Listeria monocytogenes</i>	90,68	98,42
<i>Salmonella Typhimurium</i>	85,62	96,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	95,50	98,28

Gornja tablica (tablica 2.) prikazuje postotke inhibicije za korištene bakterije nakon tretmana dezinficijensom dvjema različitim koncentracijama. Postotak inhibicije korištenjem 5% dezinficijensa najizraženiji je kod *S. aureusa* te iznosi 95,50%, dok je kod *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes* inhibicija nešto slabija. Korištenjem 20% dezinficijensa inhibicija je veća u svakom od navedenih slučajeva.

#### 4.2. Prikaz dobivenih CFU/mL vrijednosti prije i nakon tretmana dezinficijensima

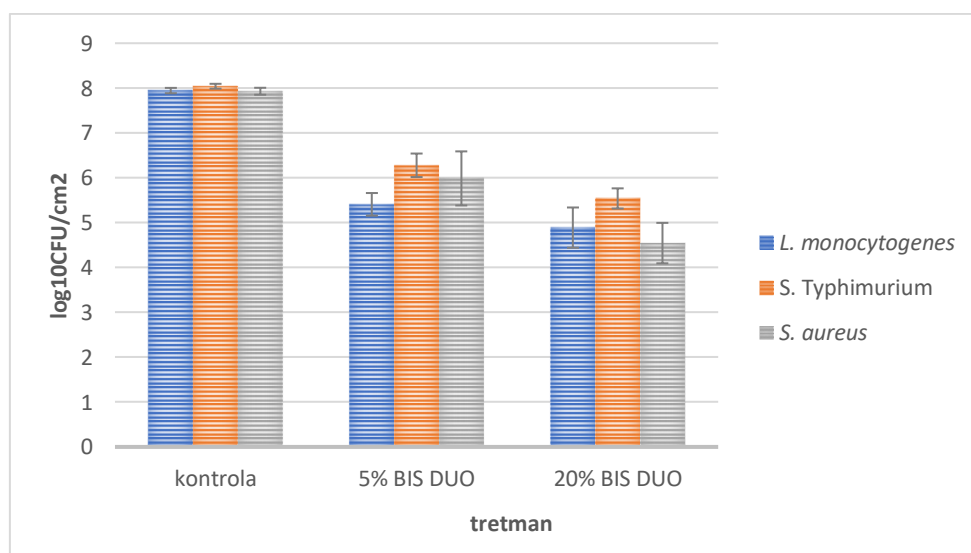
Izbrojane su porasle kolonije bakterija na hranjivim podlogama te vrijednosti upisane u tablicu. Izračunana je srednja vrijednost, standardna devijacija i logaritamska vrijednost. Za prikaz podataka i izradu grafova korištene su srednje vrijednosti, a ne pojedinačne, kako bi izračun bio jednostavniji. Vrijednosti su zaokružene na dvije decimale. U Tablici 3. prikazane su

logaritamske srednje vrijednosti i standardne devijacije keramičkih pločica podvrgnutih tretmanu i kontrolnih keramičkih pločica za korištene bakterije.

Tablica 3. Logaritamske srednje vrijednosti i standardne devijacije keramičkih pločica biofilma *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *S. aureus* podvrgnutih tretmanu dezinficijensom i kontrolnih keramičkih pločica

	logaritamska srednja vrijednost ± logaritamska standardna devijacija (log <sub>10</sub> CFU/mL)		
	kontrolna pločica	5% BIS DUO	20% BIS DUO
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,94±0,06	5,41±0,25	4,89±0,49
<i>Salmonella Typhimurium</i>	8,04±0,05	6,28±0,26	5,54±0,23
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,93±0,08	5,99±0,60	4,54±0,45

Iz tablice 3. može se vidjeti da je najveći broj kolonija porastao na kontrolnoj pločici biofilma *S. Typhimurium*, zatim na pločici *L. monocytogenes* te na pločici *S. aureusa*. Nakon primjene tretmana, broj bakterija se smanjuje. Postotak inhibicije prikazan je u tablici 4.



Graf 4. Prikaz logaritamskih srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za CFU/mL na kontrolnim pločicama i nakon tretmana dezinficijensom

Gornji graf (Graf 4.) prikazuje skupni prikaz smanjivanja vrijednosti CFU/mL nakon tretmana 5% i 20% dezinficijensom.



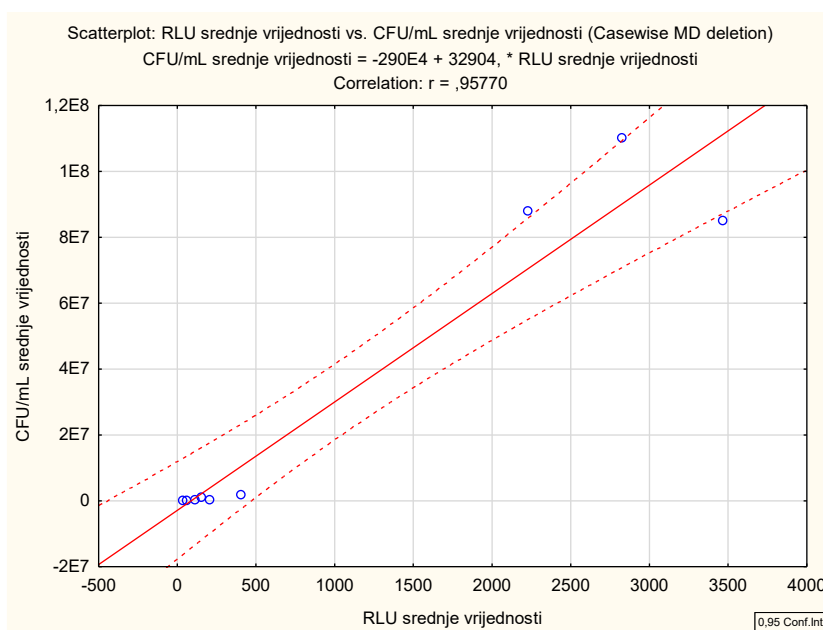
Tablica 4. Postoci inhibicije za *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *S. aureus* nakon tretmana 5% dezinficijensom i 20% dezinficijensom

	postotak inhibicije (%)	
	5% BIS DUO	20% BIS DUO
<i>Listeria monocytogenes</i>	99,71	99,91
<i>Salmonella Typhimurium</i>	98,30	99,96
<i>Staphylococcus aureus</i>	98,86	99,95

Tablica 4. prikazuje postotke inhibicije za korištene bakterije nakon tretmana dezinficijensom različitih koncentracija. Postotak inhibicije nešto je manji prilikom primjene 5% dezinficijensa, ali je svejedno u vrlo visokom postotku (minimalno 98,30% na primjeru *S. Typhimurium*). Postotak inhibicije najizraženiji je kod *L. monocytogenes*. Kod sva tri primjera bakterija, 20% dezinficijens pokazuje veću inhibiciju i samim time učinkovitost.

### 4.3. Prikaz dobivene korelacije podataka

Za izračun Pearsonovog koeficijenta korelacije i koeficijenta determinacije između RLU i CFU/mL varijabli korišten je programski paket TIBCO Statistica. U Statisticu su upisane srednje vrijednosti RLU-a te CFU/mL kako bi se dobio podatak o povezanosti varijabli te je napravljen korelacijski dijagram.



Graf 5. Korelacijski dijagram srednjih vrijednosti RLU i CFU/mL



2D scatterplot dijagramom prikazana je korelacija ove dvije varijable. Prema Petzu (literatura br. 11), dobivena vrijednost Pearsonovog koeficijenta determinacije nalazi se u intervalu 0,70 – 0,99 te vrijednost koeficijenta determinacije u intervalu 0,49 – 0,98 što dovodi do zaključka da ove dvije varijable prikazuju jaku povezanost, a korelacija je pozitivna i nepotpuna.

Kada dobivenu vrijednost korelacije ( $r=0,95770$ ) kvadriramo, dobivamo vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije koji iznosi  $R^2 = 0,91718929$  što govori da približno 92% podataka zajednički varira.

## 5. RASPRAVA

Adenozin trifosfat (ATP) molekula je koja je prisutna u svim živim organizmima. Središnja je molekula u organizmu i glavni prijenosnik energije koja se kontinuirano i konstantno troši i stvara. Dio se te energije, zbog kemijsko-pobuđenih stanja, izbacuje u obliku fotona i očituje kao određena količina svjetla. Jedan od načina detekcije te količine svjetla je proces ATP bioluminiscencije koji se s vremenom ugradio u prehrambenu industriju kao mjera HACCP sustava kod koraka poznatog pod nazivom „kritične kontrolne točke“. To je korak u pripremi hrane gdje se može obaviti kontrola nad jednim ili više faktora radi prevencije i/ili eliminacije moguće opasnosti te je ključan za njezinu ispravnost. Eventualna mikrobiološka opasnost može se detektirati upravo ovim postupkom ATP bioluminiscencije gdje mjerena RLU vrijednost prikazuje kolika je opasnost prisutna. RLU vrijednost može značajno varirati ovisno o uzetom uzorku te može biti velika vrijednost, mala vrijednost ili vrijednost u nekom određenom odstupanju od standarda. Kao i svaka metoda, ATP bioluminiscencija ima svoje prednosti i nedostatke. Upravo je jedan od nedostataka određivanje standarda, odnosno referentne vrijednosti, kako bi za neku hranu mogli reći da je mikrobiološki ispravna i da je otklonjena sva opasnost u kritičnoj kontrolnoj točki. Drugi nedostatak je mogućnost lažno pozitivnog rezultata. Prilikom uzimanja brisa, može se dogoditi da se prebriše površina koja nije od interesa, te određeni mikroorganizmi s te površine mogu reagirati s reagensom luciferinom te dati rezultat koji nije relevantan za istraživanje. Još jedan nedostatak koji je za izdvojiti je taj što su potrebni posebni brisni štapići za uzimanje uzoraka. Nije moguće obični sterilni štapić koristiti u ovom načinu testiranja. Prednosti, s druge strane, ovog procesa su što brzo daje rezultate, jednostavan je za korištenje, visoko osjetljiv i isplativ. Pomoću posebnog brisnog štapića uzima se željeni uzorak i uzorak stupa u reakciju s reagensom. Uzorak se promućka te stavi u komoru luminometra. Na luminometru se odabir program „ATP Surface Test“ te se kroz desetak sekundi na ekranu ispisuje RLU vrijednost.

Porast infekcija povezanih sa zdravstvom na prijelazu stoljeća usredotočio je pažnju na okoliš kao na potencijalni rezervoar agensa odgovornih za takve infekcije. Kao odgovor na potrebu za objektivnim metodama procjene učinkovitosti čišćenja u zdravstvenim ustanovama i brzim metodama za otkrivanje prisutnosti patogena odgovornih za infekcije povezane sa zdravstvom, predloženo je uvođenje ATP ispitivanja površina okoliša. Sukladno tome, ATP bioluminiscencija se osim u području prehrambene industrije i sektora hrane, koristi i u području zdravstva. Za očekivati je da se sve površine u zdravstvenim ustanovama prvo moraju „na oko“ činiti čistima. No, vizualna procjena se ne može koristiti za presudu mikrobiološke

(ne)čistoće bilo koje površine te se koristi metoda ATP bioluminiscencije koja će pobliže dati predodžbu o tome koliko je ta površina zapravo čista i nekontaminirana.

Postoji shema u programu čišćenja koju je opisao C. J. Griffith sa suradnicima u istraživanju provedenom 2000. godine, a ona je slijedeća. Prvo se vrši vizualna inspekcija površine ili mjesta nakon čišćenja. Ukoliko ona nije zadovoljena pristupa se ponovnom postupku čišćenja. Ukoliko je vizualna inspekcija zadovoljena, postavlja se pitanje predstavlja li ta površina površinu visokog rizika. Ukoliko je odgovor ne, ne poduzima se ništa dalje. No, ukoliko je odgovor da, ta se površina testira metodom ATP bioluminiscencije prema ciljnim vrijednostima. Ako je rezultat zadovoljen, površina se može proglasiti čistom, no, ako rezultat nije zadovoljavajući, ponavlja se postupak čišćenja. Griffith je proveo istraživanje u bolnici gdje je uspoređivao vizualnu čistoću raznih površina s njihovom mikrobiološkom čistoćom. Mikrobiološku čistoću proveo je pomoću ATP bioluminiscencije. Neke od prostorija u bolnici koje su ispitivane su soba sa četiri kreveta, soba za odvod i otpad, soba za liječenje, toalet za pacijente, bolnička kuhinja, kada, površina kolica, ... U tim prostorijama uzorkovane su površine kao što su rukohvati, umivaonici, radne ploče, poklopci kanta za smeće, ograde za krevete, kvake na vratima i slično. Dobiveni rezultati govore da je, nakon čišćenja, 82% promatranih površina bilo vizualno čisto, no zapravo 24% mikrobiološki čisto što govori da vizualno čiste površine mogu biti kontaminirane. Za referentne vrijednosti koristio je vrijednost od 500 RLU te 2,5 CFU/mL. (13)

Budući su podaci o korištenju ATP bioluminiscencije za detekciju biofilma vrlo oskudni, cilj ovog rada bio je ispitati djelotvornost sredstva za čišćenje Bis duo Active radnih koncentracija 5% i 20% na uništavanje bakterijskog biofilma stvorenog *in vitro* na keramičkim pločicama.

Kao što se može vidjeti u rezultatima u prethodnom poglavlju rada, detektiran je biofilm na keramičkim pločicama koje jesu i koje nisu bile tretirane dezinfekcijskim sredstvom. Kontrolne pločice imaju vrlo visoke vrijednosti i RLU i CFU/mL te se primjenom 5%-tnog dezinficijensa ta vrijednost smanjuje za 85% na više. Iz rezultata je vidljivo da je 20%-tni dezinficijens učinkovitiji od 5%-tnog zbog manjih dobivenih vrijednosti – kako RLU tako i CFU/mL. Razlog tome je što je 20%-tni dezinficijens koncentriraniji i ima prodorniju moć za razliku od manje koncentriranog 5%-tnog dezinficijensa koji je nešto slabije učinkovit.

Bis duo Active kao aktivnu tvar sadrži benzalkonijev klorid, a od ostalih tvari prisutni su fosforna kiselina, fosfonati te neionski tenzidi.

Dobivena vrijednost korelacije je 0,95770. Kada tu vrijednost kvadriramo, dobivamo vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije koji iznosi  $\approx 0,917$  što znači da 91,7% podataka varijabli zajednički varira, odnosno preostalih 8,3% varijacija dolazi od drugih doprinosa, a ne od povezanosti tih varijabli.

U dostupnim istraživanjima za navedenu temu podaci su dosta oskudni, no ono što je u njima zajedničko je da mjerene vrijednosti i ATP-a i CFU/mL nakon čišćenja i tretmana opadaju, što je slučaj i u ovome radu. Ono u čemu je primjetna razlika je vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije koja je u drugim radovima i istraživanjima u nižim vrijednostima. Primjer je istraživanje Emanuela Amodia provedeno u jednoj talijanskoj bolnici 2014. godine gdje je ta vrijednost jednaka 0,54, a u ovome radu ta vrijednost iznosi 0,92 (14). Tiffi i Spiegel su 1976. godine ispitivali čistoću komunalne otpadne vode i dobili podatak da povezanost između RLU i CFU/mL varijabli iznosi samo 0,035. No, nakon provedene dezinfekcije vode klorom i klornim preparatima, ta vrijednost porasla je na 0,759 (8). S druge strane, u istraživanju provedenom 2017. godine u bolnici i bolničkim sobama, mjerenja i rezultati su pokazali da redukcija vrijednosti RLU ne korelira s redukcijom vrijednosti CFU/mL, bez obzira na to što je bila vidljiva razlika u ATP-u prije i nakon tretmana čišćenja (15).

Zaključno, ATP bioluminiscencija se ne može koristiti za konačnu presudu koliko je neka površina čista ili prljava, budući da se tom metodom mjeri i ATP od ostataka proizvoda te taj ATP utječe na rezultate (ne)čistoće površine od interesa. Stoga, ATP bioluminiscencija može se koristiti samo kao brza metoda ili indikator koliko je neka površina onečišćena i poželjno ju je kombinirati s jednom od tradicionalnih metoda detekcije.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i prikazanih rezultata, doneseni su sljedeći zaključci:

1. Potvrđena je hipoteza istraživanja (što je na nekoj površini više bakterija, veća je prisutnost ATP-a, samim time detektirane su veće RLU i CFU/mL vrijednosti i obrnuto),
2. Obje koncentracije sredstva za čišćenje pokazale su se učinkovitima – 20%-tni dezinficijens učinkovitiji je od 5%-tnog dezinficijensa,
3. Primjenom dezinficijensa smanjuje se prisutnost mikroorganizama na površinama za do 99,96%,
4. Dezinficijens je najučinkovitije djelovao na biofilm bakterije *Staphylococcus aureus*, dok se najmanje učinkovit pokazao na primjeru biofilma bakterije *Salmonella Typhimurium*,
5. Prikazana je vrlo dobra povezanost RLU i CFU/mL varijabli te one zajednički variraju u 92% podataka.

## 7. LITERATURA

- (1) Costerton J. W. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. Svibanj, 1999. [citirano:10.03.2021.]; 11(3-4):217-221. Dostupno na: [https://microbialprotectionservices.com/wp-content/uploads/2018/10/Biofilm\\_Introduction.pdf](https://microbialprotectionservices.com/wp-content/uploads/2018/10/Biofilm_Introduction.pdf)
- (2) Kalenić S. i sur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 12-14, 88-89, 118-123, 150-151, 190-193
- (3) Bhattacharyya I., Choudhury M. Quorum sensing – Let Bacteria talk. *Advanced Biotech* [Internet]. Prosinac, 2008. [citirano:10.03.2021.]; 30-33. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/239592873\\_Quorum\\_Sensing\\_Let\\_Bacteria\\_Talk](https://www.researchgate.net/publication/239592873_Quorum_Sensing_Let_Bacteria_Talk)
- (4) Stewart P., William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* [Internet] 14. srpanj 2001. [citirano:10.03.2021.]; 358(9276):135–138. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
- (5) Asaj A. *Dezinfekcija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
- (6) Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P., autori; Lovrić J., Sertić J., urednice. *Harperova ilustrirana biokemija*. 28.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 94-97
- (7) Singh A., Tiwari A., Bajpai J., Bajpai A. Polymer-Based Antimicrobial Coatings as Potential Biomaterials. *Handbook of Antimicrobial Coatings* [Internet]. 2018. [citirano:10.03.2021.]; 27-61. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811982-2.00003-2>
- (8) Shama G., Malik D. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013;216(2):115-125. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.009>
- (9) Botella E., Noone D., Salzberg L., Hokamp K., Devine S., Fogg M. et al. High-resolution temporal analysis of global promoter activity in *Bacillus subtilis*. *Methods in Microbiology*. [Internet] 2012. [citirano:10.03.2021.]; 39. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099387-4.00001-6>
- (10) 3M™ Clean-Trace™ Hygiene Monitoring and Management System - Best Practice Guide [Internet]. 3M Food Safety; 2019 [citirano: 11.03.2021]. Dostupno na: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1772561O/3m-clean-trace-best-practice-guide.pdf>

- (11) Petz B., Kolesarić V., Ivanec D. Petzova statistika. 5.izd. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2012. str. 281-336
- (12) Koprivnjak O. Kvaliteta, sigurnost i konzerviranje hrane. 1.izd. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2014. str. 99, 114
- (13) Griffith C., Cooper R., Gilmore J., Davies C., Lewis M. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *Journal of Hospital Infection*. 2000;45(1):19-28. Dostupno na: <https://doi.org/10.1053/jhin.1999.0717>
- (14) Amodio E., Cannova L., Villafrate M., Merendino A., Aprea L., Calamusa G. Analytical Performance Issues. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2013;11(2):D23-D27. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/15459624.2013.852281>
- (15) Kenters N., Huijskens E., de Wit S., van Rosmalen J., Voss A. Effectiveness of cleaning-disinfection wipes and sprays against multidrug-resistant outbreak strains. *American Journal of Infection Control*. 2017;45(8):e69-e73. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.04.290>

## **8. ŽIVOTOPIS**

Bruno Kovač rođen je 09.01.1999. godine u Rijeci. Dolazi iz Delnica gdje je 2013. završio Osnovnu školu „Ivan Goran Kovačić“, kao i Srednju školu Delnice 2017. smjer prirodoslovno-matematička gimnazija. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva je upisao u akademskoj godini 2017./2018. Član je Studentskog zbora, Fakultetskog vijeća i FOSS-a pri Medicinskom fakultetu. Predstavnik je preddiplomskog studija Sanitarnog inženjerstva te član Organizacijskog odbora Studentskog kongresa zaštite zdravlja - Sanitas. Član je Povjerenstva za izborne predmete na spomenutom fakultetu. Od studentskih poslova, radi od 2018. do danas na Katedri za medicinsku fiziku i biofiziku kao demonstrator te od 4. mjeseca 2021. godine na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije poslove vezane uz sprječavanje COVID-19 bolesti. Aktivno se snalazi i koristi programima MS Office paketa. Od jezika se služi engleskim i njemačkim.