

# FOTODINAMIČKI UČINAK KATIONSKEG PORFIRINA TMPyP3 NA REZISTENTNE BAKTERIJE U KOMUNALNOJ OTPADNOJ VODI

---

Crepulja, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:184:487308>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Antonela Crepulja

FOTODINAMIČKI UČINAK KATIONSKEG PORFIRINA TMPyP3 NA REZISTENTNE  
BAKTERIJE U KOMUNALNOJ OTPADNOJ VODI

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Antonela Crepulja

FOTODINAMIČKI UČINAK KATIONSKEG PORFIRINA TMPyP3 NA REZISTENTNE  
BAKTERIJE U KOMUNALNOJ OTPADNOJ VODI

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

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

Diplomski rad obranjen je 17. srpnja na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

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

Rad ima 56 stranica, 23 slike, 14 tablica, 56 literaturnih navoda.

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin na ukazanom povjerenju i prenesenom znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti s Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci na sintezi kemijskog spoja korištenog u istraživanju. Također zahvaljujem dr.sc. Marinu Gladu s odsjeka za kontrolu otpada i otpadnih voda Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije na uzorku i kemijskog analizi komunalne otpadne vode kao i Gabrijeli Begić, med. lab. ing. s Katedre za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci na angažiranosti za vrijeme provedbe istraživanja. Naposljetku, svojoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na podršci koja mi je pružena tijekom studija.*

## SAŽETAK

Fotodinamička inaktivacija jedna je od obećavajućih metoda suzbijanja širokog spektra osjetljivih, ali i rezistentnih bakterija koje postaju glavnim javnozdravstvenim problemom današnjice. Svrha ovog rada jest ispitati učinkovitost fotodinamičke inaktivacije u suzbijanju otpornih bakterija u komunalnim otpadnim vodama upotrebom kationskog hidrofilnog porfirina TMPyP3 u kombinaciji sa zračenjem ljubičaste LED lampe intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>. Fotodinamički učinak ispitan je određivanjem minimalne efektivne koncentracije (MEK) TMPyP3 i provedbom fotoinaktivacijskog testa. Ispitivanje je izvršeno na rezistentnim sojevima *Pseudomonas aeruginosa* i *Burkholderia cepacia* izoliranim iz biofilma unutar bolničkih ustanova te *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida* i *Vibrio parahaemolyticus* izoliranim iz uzorka komunalne otpadne vode. Testiranja su provedena na uzorcima sterilne vode iz slavine, sterilne otpadne vode te sirove otpadne vode. Usporedbom rezultata zaključeno je da učinkovitost TMPyP3 ovisi o karakteristikama ispitivanog soja i mehanizmima rezistencije (MEK za multirezistentni *P. aeruginosa* u uzorku sterilne otpadne vode je >100 µM, a MEK za osjetljivi soj *P. aeruginosa* pri istim uvjetima je >12 µM). Osim toga, fotoinaktivacijskim testom utvrđeno je da je učinkovitost TMPyP3 u inhibiciji multirezistentnog *P. aeruginosa* u sirovoj otpadnoj vodi smanjena zbog prisustva drugih bakterija (% inhibicije *P. aeruginosa* u sirovoj otpadnoj vodi ≈ 89% u odnosu na ≈ 92% u sterilnoj otpadnoj vodi) te da se produljenjem vremena zračenja učinkovitost ispitivanog porfirina povećava pri nižim koncentracijama.

**Ključne riječi:** fotodinamička inaktivacija, bakterijska rezistencija, TMPyP3, komunalne otpadne vode

## SUMMARY

Photodynamic inactivation is one of the promising methods of combating a wide range of susceptible, but also resistant bacteria that are about to become a major problem in field of public health. The aim of this study was to investigate the effectiveness of photodynamic inactivation on resistant bacteria in municipal wastewater using cationic hydrophilic porphyrin TMPyP3 in combination with purple LED lamp with the intensity of 40 mW/cm<sup>2</sup>. The photodynamic effect was investigated by determining the minimum effective concentration (MEC) of TMPyP3 and photoinactivation testing. The study was carried out on multiresistant strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* isolated from biofilm inside of hospital facilities and *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from municipal wastewater. The tests were done on samples of sterile tap water, sterile wastewater and raw wastewater. By comparing the results, it was concluded that the effectiveness of TMPyP3 depends on the characteristics of tested strains and resistance mechanisms (MEC for multidrug resistant *P. aeruginosa* in a sterile wastewater sample is > 100 µM and MEC for susceptible *P. aeruginosa* under the same conditions is > 12 µM). In addition, the results of photoinactivation test revealed that the efficacy of TMPyP3 in inhibition of multidrug resistant *P. aeruginosa* in raw wastewater sample was reduced due to the presence of other bacteria (% of inhibition of multiresistant *P. aeruginosa* in raw wastewater sample is ≈89% in comparison to ≈92% of inhibition in sterile wastewater) and that by prolongation of the irradiation time, the efficiency of the tested porphyrin increases at lower concentrations.

**Keywords:** Photodynamic inactivation, bacterial resistance, TMPyP3, municipal wastewater

# SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja .....	1
1.1. Komunalne otpadne vode .....	2
1.1.1. Karakteristike .....	2
1.1.2. Kondicioniranje .....	5
1.2. Bakterijska rezistencija.....	7
1.2.1. Prirodna i stečena rezistencija .....	7
1.2.2. Prisutnost rezistentnih bakterija u komunalnim otpadnim vodama .....	9
1.3. <i>Pseudomonas sp.</i> .....	10
1.3.1. Karakteristike bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
1.3.2. Infekcije uzrokovane bakterijom <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
1.3.3. Mehanizmi antimikrobne rezistencije bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.4. Mehanizam fotodinamičke inaktivacije.....	14
1.4.1. Fotofizikalni procesi.....	14
1.4.2. Fotokemijski procesi .....	15
1.5. Fotosenzibilizatori u fotodinamičkoj inaktivaciji.....	16
1.5.1. Porfirini .....	17
1.6. Utjecaj fotodinamičke inaktivacije na bakterije .....	19
1.7. Primjena fotodinamičke inaktivacije u obradi otpadnih voda .....	20
2. Cilj istraživanja .....	21
3. Materijali i metode .....	22
3.1. Materijali i uređaji .....	22
3.1.1. 5, 10, 15, 20 – tetrakis – (N – metil – 3 – piridil) porfirin tetraklorid.....	23
3.1.2. Multirezistentni sojevi <i>P. aeruginosa</i> i <i>B. cepacia</i> .....	24
3.2. Kemijska analiza komunalne otpadne vode .....	26
3.3. Mikrobiološka analiza komunalne otpadne vode .....	27
3.4. Preživljavanje multirezistentne bakterije <i>P. aeruginosa</i> .....	28
3.5. Ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 .....	29
3.6. Fotoinaktivacijski test.....	30
4. Rezultati .....	31
4.1. Kemijska analiza komunalne otpadne vode .....	31
4.2. Mikrobiološka analiza komunalne otpadne vode .....	33



4.3.	Preživljavanje multirezistentne bakterije <i>P. aeruginosa</i> .....	36
4.4.	Ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 .....	37
4.5.	Fotoinaktivacijski test na multirezistentnom <i>P. aeruginosa</i> .....	39
4.6.	Fotoinaktivacijski test na bakterijama iz sirove otpadne vode .....	43
5.	Rasprava.....	45
5.1.	Preživljavanje multirezistentne bakterije <i>P. aeruginosa</i> .....	45
5.2.	Ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 .....	46
5.3.	Fotoinaktivacijski test.....	48
6.	Zaključci .....	51
7.	Literatura.....	52
	Životopis.....	56

## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

Osim čitavog niza kemijskih spojeva i elemenata, otpadne vode, a posebno one komunalne, obiluju spektrom najrazličitijih organizama poput virusa, bakterija ili protozoa. U slučaju neuspješne dezinfekcije, navedeni organizmi mogu predstavljati izravnu ugrozu ljudskom zdravlju, a najveća zabrinutost vezana je upravo uz prisustvo rezistentnih bakterijskih sojeva koji u otpadnu vodu najčešće dospijevaju iz ispusta javnozdravstvenih ustanova. Prisutnost multirezistentnih bakterija kao i promjenjivi obrasci infektivnih bolesti podrazumijevaju napuštanje konvencionalnih metoda dezinfekcije i razvoj novih, uspješnijih tehnologija dekontaminacije otpadnih voda. Jedna od takvih metodologija jest mikrobna fotodinamička inaktivacija. Ovaj relativno novi postupak dezinfekcije, zasnovan je na interakciji fotosenzibilizirajućih kemikalija i svjetlosti pri čemu se stvaraju reaktivni kisikovi spojevi koji učinkovito narušavaju bakterijske strukture (1). Iako postoji širok spektar kemikalija koje djeluju kao fotosenzibilizatori, među najpopularnijim ubrajaju se porfirini. Naime, studije su pokazale da su porfirini učinkovitiji u fotoinaktivaciji bakterijskih sojeva od nekih drugih fotosenzibilizatora, primjerice od metilenskog modrila (2). Međutim, djelotvornost porfirina uvelike ovisi o njihovom naboju. Istraživanjima je utvrđeno da neutralni porfirini nisu sposobni inaktivirati Gram – negativne bakterije (3). Shodno tome, sintetizirani su kationski oblici, čijoj efikasnosti u prilog govore rezultati znanstvenika koji su dokazali da su takvi porfirini, u kombinaciji sa zračenjem odgovarajuće valne duljine, sposobni inaktivirati čak 95% Gram – negativnih bakterija (4).

S obzirom na uspješno djelovanje kationskih porfirina u području fotodinamičke inaktivacije, postavlja se pitanje njihove učinkovitosti u inaktivaciji rezistentnih bakterijskih sojeva. Svrha ovog rada stoga je upravo ispitivati djelovanje kationskog porfirina TMPyP3 na otporne bakterijske vrste koje se često pronalaze u komunalnim otpadnim vodama.

## 1.1. Komunalne otpadne vode

Komunalne otpadne vode su otpadne vode iz sustava javne odvodnje koje uključuju sanitarne, tj. kućanske otpadne vode, oborinske vode te otpadne vode koje su mješavina kućanskih otpadnih voda i tehnoloških i/ ili oborinskih voda određenog područja (5). Drugim riječima, radi se o otpadnoj vodi koja nastaje kao produkt otjecanja oborina i odvodnje fekalija sa sanitarnih čvorova javnih, stambenih, industrijskih i drugih objekata namijenjenih za rad ili stanovanje.

### 1.1.1. Karakteristike

Karakteristike komunalnih otpadnih voda proizlaze iz prirode geografskog područja u kojem nastaju. Jednostavnije rečeno, njihov sastav rezultat je načina življenja, klimatskih uvjeta i sustava vodoopskrbe i odvodnje. Budući da predstavljaju mješavinu ispusta iz stambenih objekata i industrijskih pogona, jasno je da su komunalne otpadne vode opterećene različitim organskim i anorganskim onečišćenjima. Među organskim onečišćivačima najčešće su prisutne masti i ulja, ugljikohidrati, bjelančevine te deterdženti, dok se pod onečišćenjima anorganskog tipa podrazumijevaju kemijski elementi poput arsena, kadmija ili kroma te suspendirane i koloidne tvari. Prosječan sastav komunalnih otpadnih voda prikazan je u tablici 1 (6).

Tablica 1. Prosječan sastav komunalnih otpadnih voda (6)

Parametar	Koncentracija, mg/l
Ukupna suha tvar	300 – 1200
Suspendirane tvari	100 – 400
Ukupno otopljene tvari	250 – 850
BPK5	100 – 400
KPK	200 – 1000
Ukupni dušik	15 – 90
Ukupni fosfor	5 – 20
pH vrijednost	7 – 7,5
kloridi	30 – 85

Iako se toksični spojevi u komunalnoj otpadnoj vodi ponekad ne pronalaze u koncentracijama štetnim za zdravlje, oni ipak mogu djelovati fitotoksično i pritom narušavati ravnotežu u prirodnim ciklusima. Međutim, najveći problem sa zdravstvenog aspekta predstavlja prisutnost različitih patogenih mikroorganizama i mikroorganizama. Zahvaljujući svom sastavu i svojstvima, komunalne otpadne vode predstavljaju pogodan medij za rast i razvoj čitavog niza virusnih i bakterijskih sojeva kao uzročnika ozbiljnih infekcija. Neki bakterijski patogeni poput *Salmonella Typhimurium*, *Enterobacter spp.* i *Enterococcus faecalis* sposobni su prilagoditi se svjetlosnom i temperaturnom režimu, sastavu i količini hranjivih tvari te preživjeti čak sto dana prije uočavanja logaritamske redukcije mikrobne populacije (7). U tablici 2. Prikazan je primjer mikroorganizama izoliranih iz komunalnih otpadnih voda.

Tablica 2. Primjeri mikroorganizama izoliranih iz komunalnih otpadnih voda (7)

Mikroorganizmi	Primjer	Bolest
Bakterije	<i>Shigella sp.</i>	Bacilarna dizenterija
	<i>Salmonella sp.</i>	Salmoneloza (gastroenteritis)
	<i>Vibrio cholerae</i>	kolera
	<i>Campylobacter jejuni</i>	kampilobakterioza (gastroenteritis)
	<i>Yersinia sp.</i>	Jersinioza (gastroenteritis)
	Enteropatogena <i>E.coli</i>	gastroenterične bolesti
Virusi	Hepatitis A virus	infektivni hepatitis
	Norwalk virusi	akutni gastroenteritis
	poliovirus	poliomijelitis
	Coxsackie virus	gripi slični simptomi
Protozoe	<i>Entamoeba hystolitica</i>	amebna dizenterija
	<i>Giardia lamblia</i>	giardijaza (gastroenteritis)
	<i>Cryptosporidium sp.</i>	Kriptosporidijaza (gastroenteritis)
	<i>Balantidium coli</i>	balantidijaza (gastroenteritis)

Kemijski i mikrobiološki profil komunalnih otpadnih voda direktno ili indirektno utječe na njihove fizikalne karakteristike. Takve vode obično su sivkastog obojenja koje je rezultat ispusta fekalija iz sanitarnih čvorova. Neugodan miris pripisuje se produkciji plinova uslijed mikrobne razgradnje ili raspada organske materije dok su suspendirane tvari najčešći uzrok zamućenja i stvaranja velike količine mulja (8).

#### 1.1.2. Kondicioniranje

Zbog toksičnog sastava, sve otpadne vode, pa tako i komunalne, prije ispuštanja u prirodne recipijente podvrgavaju se postupcima kondicioniranja. Pročišćavanje komunalnih voda ovisi o njihovim karakteristikama, no uobičajeno obuhvaća prethodnu, primarnu, sekundarnu i tercijarnu obradu.

**Prethodna obrada.** Prethodni stupanj pročišćavanja otpadnih voda u praksi je poznatiji još kao mehanički oblik pročišćavanja čija je svrha uklanjanje krupnih onečišćenja poput krutih čestica, pijeska, šljunka, mulja te masti i ulja. U ovom stupnju pročišćavanja obično se koriste uređaji poput rešetke, pjeskolova i mastolova. Rešetke grubih, srednjih ili finih profila postavljaju se na ulazu uređaja za pročišćavanje, a služe za uklanjanje krupnih čestica promjera od 3 do 100 milimetra koje imaju tendenciju nagomilavanja i začepljivanja dijelova uređaja. Iza rešetki postavljaju se pjeskolovi kojima se, smanjenjem brzine toka i primjenom centrifugalne sile, odvajaju pijesak, šljunak i druge tvari s većom brzinom taloženja i nemogućnosti biorazgradnje. Masti, ulja i ostale plivajuće tvari uklanjaju se mastolovima isplivavanjem, tj. procesom uzlaznog kretanja čestica čija je gustoća manja od gustoće vode. (9)

**Primarna obrada.** Nakon prethodnog pročišćavanja slijedi primarna obrada otpadnih voda koja se provodi s ciljem uklanjanja suspendiranih tvari. U ovom stupnju promjenjuju se fizikalni i/ili kemijski postupci kako bi se koncentracija suspendiranih čestica snizila za najmanje 50%, a vrijednost petodnevne biološke potrošnje kisika na minimalno 20 % u odnosu na prvotne

vrijednosti. Primarna obrada otpadnih voda vrši se u taložnicima u koje je moguće dodati kemijska sredstva s koagulacijskim i flokulacijskim sposobnostima radi uspješnijeg uklanjanja suspendiranih tvari. (9)

**Sekundarna obrada.** Sekundarna obrada otpadnih voda još se naziva i biološkom obradom. Riječ je o primjeni bioloških i drugih postupaka pročišćavanja pomoću kojih se koncentracija suspendiranih tvari i petodnevne biološke potrošnje kisika smanjuje za 70 do 90%, a vrijednosti kemijske potrošnje kisika na minimalno 75%. Osnovni mehanizam sekundarnog pročišćavanja jest biološka oksidacija organskih tvari, odnosno prevođenje otopljenih organskih komponenata u biomasu mikroorganizama koju je zatim moguće izdvojiti naknadnim taloženjem.

**Tercijarna obrada.** Treći stupanj pročišćavanja je zadnji korak obrade otpadnih voda prije ispuštanja u prirodne recipijente. U ovom stadiju pročišćavanja uklanjaju se uzročnici mutnoće, mirisa i boje, izdvajaju se fosfori i dušikovi spojevi te se omogućuje omekšavanje, uklanjanje metalnih iona i dezinfekcija vode. Pritom je dezinfekcija zadnji, ali i jedini obavezni korak tercijarne obrade otpadnih voda. Provodi se fizikalnim ili kemijskim postupcima, među kojima su najpoznatije dezinfekcije klorom i njegovim derivatima, ozoniranje ili dezinfekcija UV zračenjem. Iako je riječ o široko primjenjivanim i relativno uspješnim postupcima, problem stvaraju bakterijski sojevi koji se često pronalaze u komunalnim otpadnim vodama, a rezistentni su na spomenute dezinfekcijske metode. (9)



Slika 1. Prikaz postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda (10)

## 1.2. Bakterijska rezistencija

Definicija rezistencije odnosi se na sposobnost bakterija da prežive djelovanje antibiotika i drugih štetnih kemikalija. Rezistentni bakterijski sojevi široko su rasprostranjeni te predstavljaju prijetnju biljnom, životinjskom, ali i ljudskom zdravlju. Usporedbom s uobičajenim bakterijskim infekcijama, infekcije prouzrokovane rezistentnim bakterijskim vrstama očituju se znatno višom stopom mortaliteta i produljenjem bolničkog liječenja.

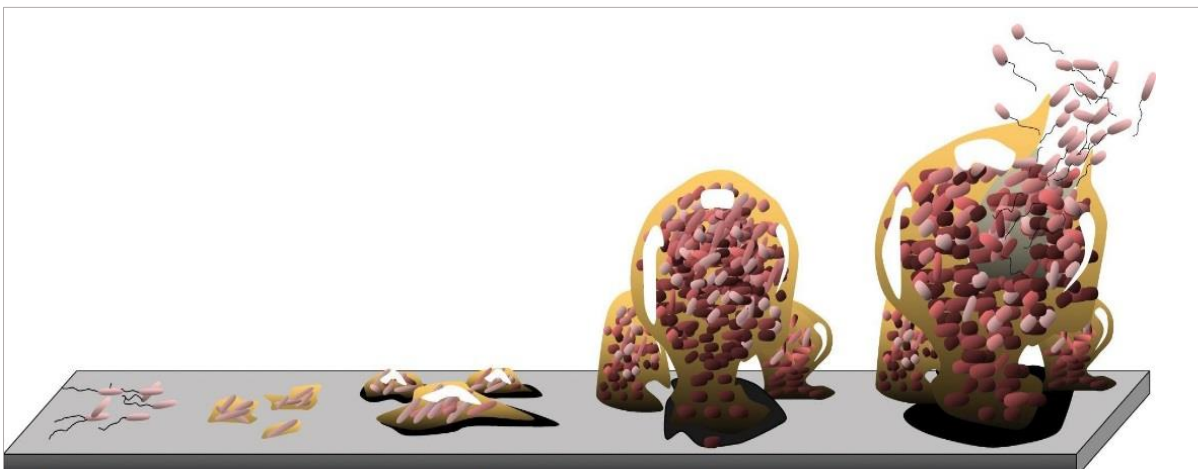
### 1.2.1. Prirođena i stečena rezistencija

Otpornost bakterijskih sojeva na antimikrobne lijekove i dezinfekcijska sredstva može biti prirođena ili stečena. Prirođena rezistencija obično je rezultat nedostatka vezujućeg mjesta, nemogućnosti ulaska kemikalija u bakterijsku stanicu ili postojanja enzima i pumpi kojima se inaktiviraju ili izbacuju štetne tvari iz stanica (11). Tako primjerice, *Pseudomonas aeruginosa* posjeduje čak četiri sustava efluksnih pumpi specifičnih za različite supstrate, a čija se aktivnost može povećati mnogim faktorima uobičajeno prisutnim u infekcijama (12). Na prodor baktericidnih ili bakteriostatskih kemikalija u unutrašnjost bakterijske stanice uvelike utječe struktura vanjske membrane. Za razliku od membrane Gram – pozitivnih bakterija, stanična membrana Gram – negativnih bakterija očituje se manjom propusnošću pa su takve bakterije prirodno otpornije na štetne kemikalije i antibiotike (13).

Osim prirodene rezistencije koja predstavlja normalan obrazac ponašanja neke bakterijske vrste, sve češće se javlja i stečena otpornost koja nastaje naknadno zbog pretjerane ili nepropisne uporabe lijekova i ostalih baktericidnih sredstava. Stečena rezistencija rezultat je mutacija ili stvaranja novih gena koji se onda prenose vertikalno na potomstvo ili horizontalno s bakterije na bakteriju. Međutim, neke bakterijske vrste mogu razviti prolaznu rezistenciju neovisno o genetičkoj promjeni i to životom unutar zajednice biofilma te mehanizmima poput bakterijske indiferencije i perzistencije (11). Biofilm označava kompleksnu zajednicu bakterija



ugrađenih u samoproizvedeni matriks koji je sastavljen od polisaharida i bjelančevina. Stvaranje biofilma povezano je s povećanom razinom mutacija i razvojem detekcije kvoruma, odnosno socijalne interakcije među bakterijama. Osim toga, unutar biofilma prisutni su vertikalni gradijenti hranjivih tvari i kisika koji su povezani sa smanjenom metaboličkom aktivnošću bakterija i produljenjem vremena umnažanja bakterijskih stanica. Smatra se da su upravo te manje ili više „uspavane“ bakterije odgovorne za neku vrstu otpornosti na vanjske prijetnje (14).



Slika 2. Slikoviti prikaz razvoja bakterijskog biofilma (15)

Nadalje, bakterijska indiferencija jest termin koji se odnosi na učinkovitost baktericidne kemikalije samo u slučaju kad su bakterije u specifičnom fiziološkom ili metaboličkom stanju. Tako primjerice,  $\beta$  - laktamski antibiotici ne pokazuju djelotvornost prema bakterijama koje nisu u fazi diobe. Perzistencija je još jedan vid prolazne rezistencije. Riječ je o metabolički neaktivnim stanicama koje su izrazito otporne na antimikrobna sredstva zbog mogućnosti ulaska u stanje mirovanja (11).

### 1.2.2. Prisutnost rezistentnih bakterija u komunalnim otpadnim vodama

Postojanje rezistentnih bakterijskih sojeva gorući je javnozdravstveni problem. Iako su primarno vezane za bolničke ustanove gdje redovito koloniziraju sve veći broj pacijenata, rezistentne bakterije danas su široko rasprostranjene u okolišu. Posebna zabrinutost vezana je uz komunalne otpadne vode. Takve vode naime, postaju sve opterećenije prisustvom širokog spektra rezistentnih bakterijskih sojeva koje se u njih ulijevaju putem ispusta bolničkih, industrijskih i stambenih objekata. Osim otpornih bakterija, u sastavu komunalnih otpadnih voda također se pronalaze i male količine antimikrobnih sredstava. Iako je često riječ o zanemarivim koncentracijama, antimikrobne kemikalije u otpadnim vodama mogu djelovati na osjetljive vrste sprječavajući njihov rast i razvoj, no isto tako mogu biti okidač za razvoj otpornosti preostalih bakterija (16).

Prisustvo tragova antimikrobnih sredstava, velika gustoća i raznolikost patogenih i nepatogenih mikroorganizama te obilje hranjivih tvari čine komunalne otpadne vode izvrsnim medijem za razvoj i širenje rezistentnih bakterija. U američkim istraživanjima provedenim između 2009. i 2010. godine iz 27% uzoraka komunalnih voda izolirani su vankomicin rezistentni enterokoki koji su danas jedni od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija (17). Nadalje, u Nizozemskoj je 2015. godine u otpadnim vodama pronađeno 17, 1% ESBL *E. coli* sojeva (sojevi koji proizvode  $\beta$  laktamaze širokog spektra) od kojih je čak 84% pokazivalo rezistenciju na tri vrste antibiotika uključujući  $\beta$  – laktame, tetracikline i aminoglikozide (18). U otpadnim vodama iz Južne Afrike 2012. godine otkriveni su sojevi aeromonasa otpornih na penicilin, oksacilin, ampicilin i vankomicin (19). Rezistentne bakterije također su pronađene u komunalnim otpadnim vodama u Hrvatskoj. Naime, 2014. godine ispitivanjem otpadne vode sakupljene u komunalnom postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba utvrđeno prisustvo bakterije *Acinetobacter baumannii* sa stečenom rezistencijom na karbapeneme (20).

### 1.3. *Pseudomonas sp.*

Bakterije iz roda *Pseudomonas* čine skupinu oportunističkih patogena ljudi, biljaka i životinja. Okarakterizirane su kao Gram – negativne bakterije štapićastog oblika koje se ubikvitarno pronalaze u različitim okruženjima poput tla, vode, vegetacije i materijala nastalog organskim raspadom (21). Općenito, riječ je o bakterijama koje rastu u aerobnim uvjetima pri temperaturnom rasponu od 4 do 42 °C. Svoju pokretljivost duguju posjedovanju jednog ili nekoliko polarnih bičeva koji se pronalaze na površini bakterijske stanice. Većina bakterijskih vrsta iz roda *Pseudomonas* prirodno je otporna na nekoliko antimikrobnih lijekova, ponajviše zbog prisustva efluks pumpi koje igraju veliku ulogu u izbacivanju toksičnih materijala iz stanice (22).

#### 1.3.1. Karakteristike bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Do danas je okarakterizirano više od 70 vrsta pseudomonasa među kojima je najpoznatiji *P. aeruginosa*. Ova bakterijska vrsta, prepoznatljiva po mirisu na lipu, sposobna je preživjeti različite okolišne uvjete. Optimalan temperaturni režim kreće se između 25 i 37 °C, a sposobnost rasta na 42 °C, razlikuje ga od većine drugih vrsta roda *Pseudomonas*. Mnogi *P. aeruginosa* sojevi produciraju jedan ili više pigmenata među kojima su najčešći zelenkasto plavi piocijanin, žućkasto zeleni pioverdin i crveno smeđi piorubin. Sposoban je preživjeti samostalno ili unutar biofilma, a zbog velikog broja enzima i metaboličkih puteva lako se prilagođava na različite hranidbene uvjete. Iako se *P. aeruginosa* obično pronalazi u okolišu gdje uzrokuje bolesti životinja i biljaka, danas je sve više prisutan u zdravstvenim ustanovama unutar kojih uzrokuje ozbiljne infekcije kod imunokompromitiranih pojedinaca. (23)



Slika 3. Piocijanin producirajuće bakterijske kolonije *P. aeruginosa* (24)

### 1.3.2. Infekcije uzrokovane bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* poznati je uzročnik širokog spektra infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi. Zbog raznolikosti enzima i metaboličkih puteva sposoban je preživjeti u različitim okruženjima samostalno ili unutar biofilma. Iz tog razloga, ova bakterija postaje jednom od najčešće izoliranih bolničkih patogena koja nerijetko onečišćuje tekućine za dijalizu, sapune ili dezinficijense, no osim toga kolonizira površine različitih medicinskih pomagala poput respiratora, bronhoskopa ili katetera. Iako je riječ o oportunističkom patogenu koji u pravilu ne uzrokuje ozbiljne infekcije u imunokompetentnih osoba, *P. aeruginosa* ozbiljna je prijetnja pojedincima s pratećim oboljenjima. U bolničkim ustanovama, *P. aeruginosa* najčešće se vezuje uz jedinice intenzivne njege, a smatran je glavnim uzrokom infekcija dišnih puteva i pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom. Osim respiratornih infekcija, ovaj oportunistički patogen u jedinicama intenzivne njege uzrokuje 3 – 7% bakterijemija kojima su najpodložnije osobe s neutropenijom, ali i osobe s infekcijama rana i opekline. Zbog kolonizacije katetera, *P. aeruginosa* nerijetko uzrokuje i infekcije urinarnog sustava, a u osoba sa šećernom bolesti dovodi do invazivnih upala vanjskog uha. Stopa mortaliteta kod infekcija

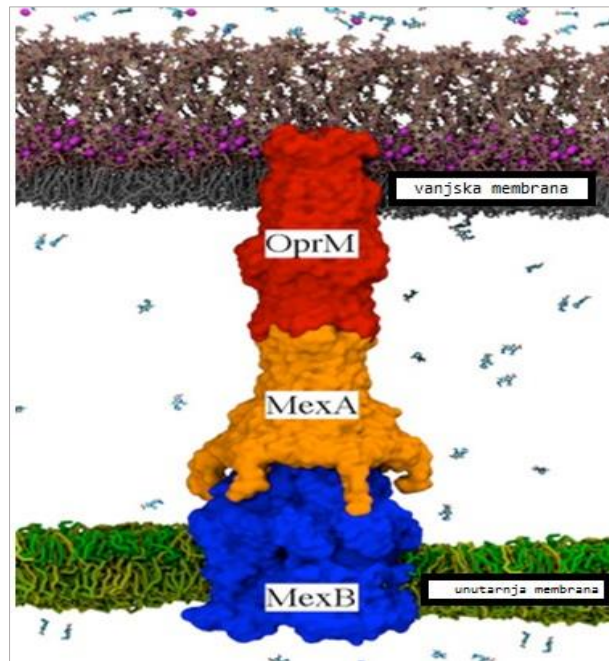
uzrokovanih ovim patogenom relativno je visoka (10 do 60% slučajeva), a obično je rezultat kombinacije oslabljenog imunološkog odgovora pacijenta i izrazite prirodene i stečene otpornosti bakterije na antimikrobne lijekove. (25)

### 1.3.3. Mehanizmi antimikrobne rezistencije bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Poznato je da je *P. aeruginosa* prirodno otporan na velik broj antimikrobnih lijekova poput makrolida, tetraciklina, flourokinolona i drugih. Njegova rezistencija zasniva se na mehanizmima koji uključuju blokiranje ulaska stranih tvari, aktivno izbacivanje toksičnih spojeva, enzimsku razgradnju i promjenu ciljnih mjesta djelovanja antimikrobnih tvari. Ulazak stranih tvari prvenstveno je limitiran strukturom stanične membrane. Budući da *P. aeruginosa* pripada skupini gram negativnih bakterija, stanična membrana mu je sastavljena od asimetričnog dvosloja lipopolisaharida i fosfolipida povezanog proteinskim kanalima, tzv. porinima. Porini predstavljaju vezu između izvanstanične okoline i unutrašnjosti stanice te omogućavaju selektivno propuštanje malih molekula, a time i ulazak antibakterijskih tvari u citoplazmu. Prilikom nekontrolirane i nepravilne uporabe antimikrobnih pripravaka, često dolazi do smanjene ekspresije proteinskih kanala. Njihovim odsustvom, spriječen je prodor antimikrobnih tvari, a time bakterijska stanica naposljetku ostaje zaštićena od oštećenja. (26)

Osim stanične membrane, efluks pumpe igraju veliku ulogu u razvoju antimikrobne rezistencije. Ove pumpe sposobne su istisnuti niz molekula iz citoplazme i periplazme bakterijske stanice poput sekundarnih metabolita, organskih otapala, dezinficijensa, ali i gotovo svih klinički dostupnih antibiotika. U bakterije *P. aeruginosa* do danas su otkrivena i dobro okarakterizirana čak četiri sustava efluksnih pumpi: MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN i MexX-MexY-OprM. Riječ je o složenim transmembranskim sustavima sastavljenim od tri dijela u koje se ubrajaju transportni protein u staničnoj membrani, porin u vanjskoj membrani i protein u periplazmatskom prostoru koji povezuje porin i transportni

protein. Pojačanim radom efluks pumpi, stanična koncentracija antimikrobnih tvari smanjuje se ispod minimalnih inhibitornih razina što rezultira razvojem rezistencije na različite grupe antimikrobnih tvari. (12; 25)



Slika 4. Slikoviti prikaz efluks sustava MexA-MexB-OprM (27)

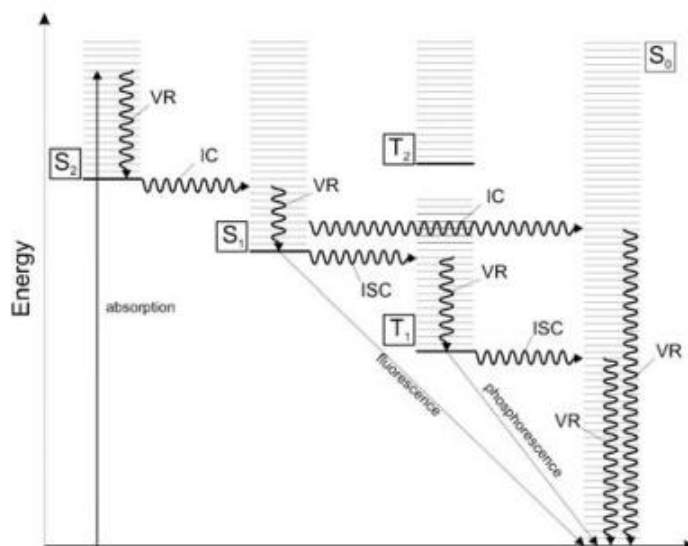
Nadalje, pretjerana uporaba antimikrobnih pripravaka kod oportunističkog patogena *P. aeruginosa* može izazvati i promjene strukture ciljnih mjesta. Tako je otpornost ove bakterije na fluorokinolone rezultat promjena u DNK girazi i topoizomerazi IV zbog mutacija QRDR regija (eng. *quinolone-resistance-determining regions*) navedenih enzima. Rezistencija na velik broj antimikrobnih lijekova pripisuje se i posjedovanju enzima poput beta laktamaza ili aminoglikozid-modificirajućih enzima koji su sposobni modificirati toksične tvari u manje štetne metabolite koji će se potom izbaciti iz stanice (25).

## 1.4. Mehanizam fotodinamičke inaktivacije

Fotodinamička inaktivacija slučajno je otkrivena davne 1900. godine kad je zapaženo da vidljiva svjetlost u kombinaciji s fotosenzibilizirajućim bojilima uspješno inaktivira mikroorganizme. Iako je isprva bila namijenjena za antitumorsku terapiju, njena daljnja upotreba u liječenju nekih drugih oboljenja nije se pretjerano razvila. Međutim, pojava bakterijskih sojeva koji su otporni na sve više antimikrobnih sredstava kao i njihova raširenost u okolišu poslužili su mnogim znanstvenicima da istraže mehanizme fotodinamičke inaktivacije, ali i njenu moguću primjenu u rješavanju ovog gorućeg javnozdravstvenog problema (28). Fotodinamička inaktivacija je naizgled jednostavan, ali zapravo vrlo složen mehanizam sastavljen od fotofizikalnih i fotokemijskih procesa koji su danas dobro opisani.

### 1.4.1. Fotofizikalni procesi

Fotofizikalni procesi koji se odvijaju tijekom fotodinamičke inaktivacije prikazani su dijagramom Jablonskog.



Slika 5. Prikaz dijagrama Jablonskog. VR (eng. *vibrational relaxation*), IC (eng. *internal conversion*), ISC (eng. *intersystem crossing*) (29)

Kada nisu pobuđene, fotosenzibilizirajuće molekule nalaze se u osnovnom stanju ( $S_0$ ), odnosno u stanju najniže energije. Apsorpcijom svjetlosti određene valne duljine, fotosenzibilizatori iz

svog osnovnog stanja, prelaze u pobuđena stanja ( $S_n$ ). Svako pobuđeno stanje podijeljeno je u nekoliko vibracijskih razina i energetske je nepovoljno u odnosu na osnovno stanje. Zbog toga se molekule vrlo brzo vraćaju u stanje  $S_0$  što se obično odvija putem dva mehanizma. U prvom slučaju, odnosno u procesu vibracijskog opuštanja (VR), fotosenzibilizirajuća molekula iz visokih vibracijskih razina pobuđenog stanja pada u energetske niža stanja sve do onog osnovnog,  $S_0$ , pri čemu se emitira fluorescencija i oslobađa višak energije. U drugom slučaju, pobuđena molekula iz singlet stanja ( $S_1$ ) međusustavnim križanjem (ISC) prelazi u izoenergijsko triplet stanje ( $T_1$ ). Nakon brze vibracijske relaksacije, molekula se iz triplet stanja vraća u svoje osnovno stanje emitiranjem fosforescencije. U procesu fotodinamičke inaktivacije mikroorganizama prelazak molekula u triplet stanje jest željena pojava budući da je, u toj fazi fotosenzibilizirajuća kemikalija spremna prenijeti elektron ili energiju na molekulu kisika, a što se onda opisuje fotokemijskim procesima. (29)

#### 1.4.2. Fotokemijski procesi

Duže zadržavanje u tripletnom stanju omogućuje fotosenzibilizirajućoj molekuli ulazak u fotokemijske procese. Fotokemijski proces okarakteriziran je reakcijom fotosenzibilizatora s molekulama kisika, a odvija se jednim od dva tipa fotokemijskih reakcija. U prvom tipu, fotosenzibilizator reagira izravno sa supstratom, u ovom slučaju sa staničnom membranom, kojoj predaje proton ili elektron. Predajom protona/elektrona dolazi do stvaranja anionskih ili kationskih radikala koji u doticaju s kisikom stvaraju reaktivne kisikove radikale. U drugom tipu fotokemijske reakcije, fotosenzibilizirajuća molekula predaje energiju neposredno molekulskom kisiku. Time se formira singletni kisik u pobuđenom stanju koji je sposoban uništiti gotovo sve tipove bioloških molekula ili stanica. Obje reakcije mogu se dogoditi i istovremeno, a ovise o vrsti fotosenzibilizatora, prirodni supstrata i koncentraciji kisika. (28)



### 1.5. Fotosenzibilizatori u fotodinamičkoj inaktivaciji

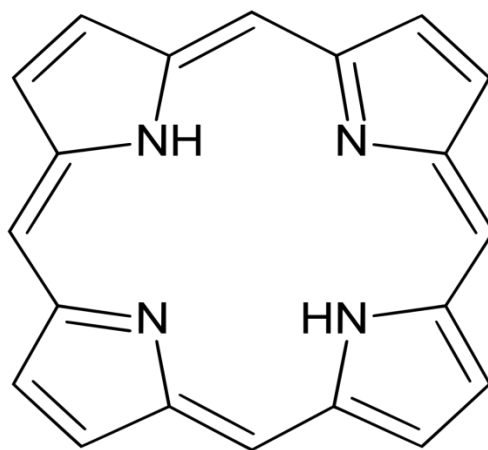
Fotosenzibilizatori su molekule koje pod djelovanjem svjetlosti stvaraju reaktivne kisikove radikale, čime su sposobne oštetiti strukture tumorskih stanica i stanica mikroorganizama te spriječiti njihovo daljnje dijeljenje. Prilikom izbora idealnog fotosenzibilizatora potrebno je voditi računa o svojstvima kao što su jednostavnost sinteze, čistoća, stabilnost, ekonomska isplativost i netoksičnost. Osim toga, iznimno je važno da fotosenzibilizirajuće molekule imaju visoke apsorpcijske vrpce budući da im to svojstvo omogućuje veću efikasnost u uništavanju ciljanih stanica pri nižim dozama i manjoj količini svjetlosti. (30)

Do danas je sintetiziran širok spektar fotosenzibilizatora koji se obično po svojoj strukturi i karakteristikama svrstavaju u četiri grupe: sintetska bojila, prirodni fotosenzibilizatori, nanokompoziti i tetra – pirolni spojevi. Metilensko i toluensko modrilo najpoznatiji su predstavnici sintetskih bojila. Popularnost su stekli zbog svog kationskog naboja koji im omogućava jednaki afinitet vezanja i za gram pozitivne i za gram negativne bakterije. Međutim, njihova upotreba u fotodinamičkoj inaktivaciji je ograničena zbog smanjene mogućnosti djelovanja na bakterije u biofilmu (31). Prirodni fotosenzibilizatori okarakterizirani su kao aktivne tvari izolirane iz biljaka. Među najznačajnijima su kumarin i hipericin čije se djelovanje u fotodinamičkoj inaktivaciji danas aktivno ispituje. Osim prirodnih fotosenzibilizatora, sve više pažnje usmjereno je i na fotoinaktivaciju nanočesticama poput fulerena i titanijevog dioksida zbog njihove učinkovitosti u stvaranju kisikovih radikala (32).

Iako su se svi navedeni fotosenzibilizatori pokazali uspješnima u inaktivaciji bakterijskih vrsta, danas se najčešće primjenjuju tetra – pirolni spojevi, odnosno ftalocijanini i porfirini.

### 1.5.1. Porfirini

Porfirini su široko rasprostranjene kemijske tvari koje pripadaju grupi heterocikličkih aromatskih spojeva. Sastavljeni su od četiri pirolna prstena međusobno povezana metinskim mostovima. Kako im naziv potječe od grčke riječi „porphura” što znači „ljubičast”, jasno je da porfirini obuhvaćaju veliku skupinu fluorescentnih kristalnih pigmenata intenzivnih boja, prirodnog ili sintetskog porijekla. Prisutnost ovih tvari ubikviratna je u prirodi gdje igraju veliku ulogu u biokemijskim procesima poput prijenosa kisika ili fotosinteze. (33)

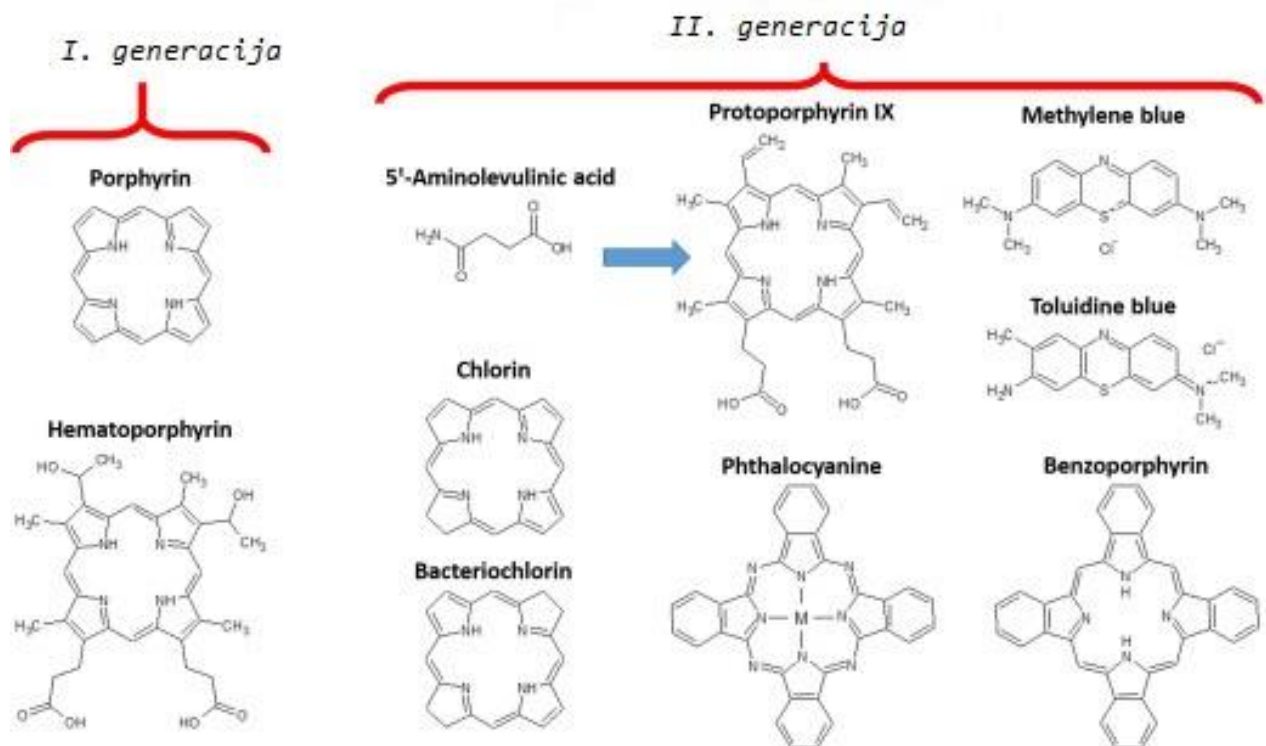


Slika 6. Prikaz strukture porfirina (34)

Zbog nesparenih elektrona koji se kreću unutar aromatskih prstena, porfirini se odlikuju visokim apsorpcijskim vrpčama u vidljivom dijelu spektra. Osim vidljive svjetlosti, apsorbiraju i valne duljine iz bliskog ultraljubičastog spektra. U vidljivom dijelu spektra uočavaju se Soret i Q vrpce. Soret vrpca obuhvaća valne duljine od 380 do 400 nm, a rezultat je elektronskog prijelaza iz osnovnog u drugo pobuđeno stanje. Q vrpce prikazuju prijelaz elektrona iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje, a javljaju se na intervalu od 500 do 750 nm. (35)

Porfirini se dijele na prvu i drugu generaciju. Prva generacija porfirina obuhvaća primitivne derivate hematoporfirina. Riječ je o kemijskim spojevima ograničene čistoće, slabe apsorpcije svjetlosti i fotoosjetljivosti. Porfirini druge generacije, poput klorina ili bakterioklorina,

sintetizirani su s ciljem rješavanja nedostataka porfirina prve generacije, a okarakterizirani su kao spojevi visoke čistoće, fotostabilnosti i bolje apsorpcije svjetlosti.



Slika 7. Prikaz porfirina prve i druge generacije (30)

Brojne grupe porfirina pokazale su se učinkovitim fotosenzibilizatorima. Pri niskim koncentracijama inaktiviraju i gram pozitivne i gram negativne bakterijske vrste, a njihova široka primjena u antimikrobnoj fotodinamičkoj inaktivaciji rezultat je sljedećih osobina: 1. dobra topivost u vodi i u organskim otapalima, 2. visok afinitet vezanja za stanične komponente, membrane, proteine i DNK, 3. aktivno uništavanje bakterijskih stanica, uključujući i rezistentne vrste, 4. velik broj mehanizama uništavanja bakterija i virusa, zbog čega je vjerojatnost stjecanja mikrobne otpornosti poprilično smanjena (35).

## 1.6. Utjecaj fotodinamičke inaktivacije na bakterije

Poznato je da su Gram – pozitivne bakterije osjetljivije na fotodinamičku inaktivaciju od Gram – negativnih bakterija. Navedena činjenica objašnjava se razlikama u građi stanične stijenke. Naime, gram negativne bakterije okružene su tankim slojem peptidoglikana na koji se nastavlja vanjska, negativno nabijena lipopolisaharidna ovojnica. Gram – pozitivnim bakterijama nedostaje vanjska membrana, a sama stanica obavijena je višestrukim slojevima peptidoglikana koji je sam po sebi porozan. Zbog propusnosti peptidoglikanskog sloja i nedostatka otporne lipopolisaharidne ovojnice, fotosenzibilizirajuće molekule lakše prodiru u unutrašnjost gram pozitivnih bakterijskih vrsta čime se ostvaruje bolji fotodinamički učinak. Također je poznato da fotosenzibilizirajuće molekule mogu biti neutralnog, kationskog ili anionskog naboja. Zahvaljujući lipopolisaharidnoj ovojnici, gram negativne bakterije na svojoj površini postaju negativno nabijene pa je jasno da anionski fotosenzibilizatori neće biti učinkoviti u njihovom suzbijanju. Iako ne mogu prodrijeti u unutrašnjost stanica Gram – negativnih bakterijskih vrsta, anionski fotosenzibilizatori pri višim dozama ipak mogu oštetiti takve bakterije posredstvom singletnog kisika. Naime, tijekom ozračivanja, atomarni kisik koji se stvara na vanjskoj površini ili u neposrednoj blizini stanice može difundirati unutar bakterije i potaknuti nepovratna oštećenja lipida i proteina u unutrašnjoj membrani. (36)

Dva su osnovna mehanizma oštećenja bakterijskih stanica tijekom fotodinamičke inaktivacije: oštećenje DNK i oštećenje citoplazmatske membrane. Oštećenjem citoplazmatske membrane, dolazi do istjecanja staničnog sadržaja ili oštećenja membranskih transportnih sustava i enzima (37). Osim toga, subletalne doze fotosenzibilirajućih molekula mogu utjecati na ekspresiju nekoliko klasa proteina, od kojih je većina uključena u metaboličke aktivnosti, odgovor na oksidativni stres, ali i u procese stanične diobe te unos glukoze (38). Pretpostavlja se da bi fotodinamička inaktivacija mogla uspješno zamijeniti dezinficijense i antibiotike budući da fotosenzibilizacijom bakterija ne nastaju rezistentni sojevi (37).

## 1.7. Primjena fotodinamičke inaktivacije u obradi otpadnih voda

Fotodinamička inaktivacija pokazala se uspješnom u kliničke svrhe, a u novije vrijeme raste interes za implementacijom ove metode i u svijetu ekologije. Upotreba ove zanimljive interakcije svjetlosti i fotosenzibilizirajućih kemikalija mogla bi biti posebno obećavajuća u području otpadnih voda koje su zbog svog kompleksnog i toksičnog sastava smatrane velikim ekološkim problemom.

Osim što učinkovito djeluju na različite mikroorganizme, reaktivni kisikovi spojevi koji nastaju kao produkt fotofizikalnih i fotokemijskih procesa sposobni su oksidirati nezasićene veze te amino i druge grupe elektron donorskih organskih komponenata. Osim toga, fotodinamička inaktivacija pokazala se uspješnom i u uklanjanju fenola iz otpadnih voda koje se ispuštaju iz tvornica boja ili papira. Oksidaciju sulfidnih soli koje se učestalo nalaze u otpadnim vodama kao međuprodukti različitih industrijskih procesa također je moguće potaknuti navedenom metodom (39). Nadalje, istraživanja su pokazala da je upotrebom fotodinamičke inaktivacije u otpadnim vodama moguće smanjiti koncentraciju lijekova poput propranolola, naproksena i trimetoprima, ali i konzerviransa kao što je paraben koji se široko koristi u kozmetičkim i farmaceutskim industrijama (40).

Kako je fotosenzibilizirajuće kemikalije moguće ukloniti imobilizacijom na čvrste podloge te potom obnoviti i ponovno upotrijebiti, može se zaključiti da je fotodinamička inaktivacija učinkovita, jeftina, jednostavna, ali i ekološki prihvatljiva tehnologija koja predstavlja budućnost pročišćavanja otpadnih voda.

## 2. Cilj istraživanja

S obzirom na zanimljiva svojstva i aktivnost u području fotodinamike, porfirini postaju predmetom proučavanja u istraživanjima sve većeg broja znanstvenika s područja biotehnologije i medicine. Njihova topivost u vodi i organskim otapalima, velik broj vrsta s različitim funkcionalnim skupinama te širok spektar mehanizama djelovanja na rezistentne bakterijske i virusne sojeve čini ih obećavajućim nasljednicima antimikrobnih lijekova i dezinfekcijskih sredstava. Uspješna interakcija zračenja i porfirina u liječenju velikog broja infektivnih bolesti potakla je razvoj ideje za njenom primjenom i u svijetu ekologije. Navedena se zamisao posebno odnosi na otpadne vode koje se, zbog svog toksičnog kemijskog sastava, ali i prisustva mikroorganizama otpornih na lijekove i postojeće dezinfekcijske metode, smatraju velikim javnozdravstvenim problemom. Slijedom navedenih činjenica, javila se potreba za ispitivanjem fotodinamičkog učinka porfirina na otporne bakterijske vrste koje se nerijetko nalaze u komunalnim otpadnim vodama, što je ujedno i cilj ovog diplomskog rada.

Plan istraživanja uključuje sljedeće korake:

1. kemijska i mikrobiološka karakterizacija uzorka komunalne otpadne vode,
2. ispitivanje preživljavanja multirezistentnog *P. aeruginosa* u uzorcima sterilne vode iz slavine, sterilne otpadne vode i sirove otpadne vode,
3. ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 za inaktivaciju otpornih bakterija u uzorcima sterilne vode iz slavine i sterilne otpadne vode,
4. fotoinaktivacijski test inhibicije multirezistentnog *P. aeruginosa* u uzorcima sterilne vode iz slavine, sterilne otpadne vode i sirove otpadne vode,
5. fotoinaktivacijski test inhibicije bakterija iz sirove otpadne vode.

### 3. Materijali i metode

Za provedbu istraživanja, od Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije dobiven je uzorak komunalne otpadne vode sa središnjeg uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Rijeke i okolice, *Delta*.

#### 3.1. Materijali i uređaji

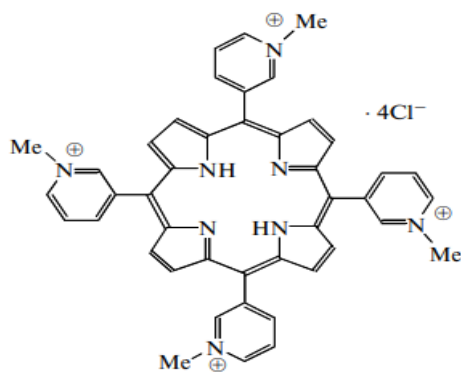
Osim uzorka sirove komunalne vode, tijekom istraživanja upotrijebljeni su sljedeći materijali i uređaji:

- autoklavirana voda iz slavine
- filtrirana i autoklavirana komunalna otpadna voda
- 0,2 % tna fiziološka otopina
- otopina porfirina TMPyP3 molarne koncentracije  $c = 200 \mu\text{M}$  (Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci)
- tresilica
- miješalica
- inkubator
- spektrofotometar
- autoklav
- ljubičasta LED lampa – 394 nm, 40 mW/cm<sup>2</sup> (Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci)
- mikropipete 0,1 - 10  $\mu\text{l}$ , 2 - 20  $\mu\text{l}$ , 20 - 100  $\mu\text{l}$ , 50 - 200  $\mu\text{l}$ , 200 - 1000  $\mu\text{l}$
- pipetor
- mikrotitarske pločice
- staklene epruvete volumena 15 ml s čepom
- plastične epruvete

- plastične ušice
- staklene birete
- kit API 20A, bioMérieux
- kolonije *P. aeruginosa* i *B. cepacia* izolirane iz biofilma unutar bolničkih ustanova
- hranjiva podloga Mueller Hinton
- Pseudomonas agar
- krvni agar i kromogeni agar

### 3.1.1. 5, 10, 15, 20 – tetrakis – (N – metil – 3 – piridil) porfirin tetraklorid

Za potrebe ispitivanja fotodinamičke inaktivacije korišten je kationski hidrofilni 5, 10, 15, 20 – tetrakis – (N – metil – 3 – piridil ) porfirin tetraklorid, poznatiji kao TMPyP3. Ovaj kristaličasti fotosenzibilizator molarne mase 820, 64 g/mol sintetiziran je na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. U istraživanju je TMPyP3 pripremljen u obliku stock otopine molarne koncentracije 200  $\mu\text{M}$  (dobiveno otapanjem 1,3 mg TMPyP3 u 7,9 ml destilirane vode) nakon čega je, profiltriran i zaštićen od svjetlosti pomoću aluminijske folije, čuvan u hladnjaku na +4 °C.



Slika 8. struktura porfirina TMPyP3 (41)



### 3.1.2. Multirezistentni sojevi *P. aeruginosa* i *B. cepacia*

U svrhu ispitivanja preživljavanja u uzorcima sterilne vode iz slavine, filtrirane i sterilizirane otpadne vode te sirove otpadne vode, testiranja minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 i provedbe fotoinaktivacijskog testa, korišten je multirezistentni soj *P. aeruginosa* izoliran iz biofilma na mrežici slavine bolničkog sustava. Rezistencija na antimikrobna sredstva ispitana je antibiogramom, a rezultati su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz rezultata antibiograma za multirezistentni *P. aeruginosa*

Antibiotik	Rezultat
<b>Pipercilin – tazobaktam</b>	rezistentan
<b>Ciprofloksacin</b>	rezistentan
<b>Imipenem</b>	rezistentan
<b>Cefepim</b>	rezistentan
<b>Ceftazidim</b>	osjetljiv
<b>Meropenem</b>	rezistentan
<b>Gentamicin</b>	rezistentan
<b>Amikacin</b>	osjetljiv

U tablici 3 prikazani su rezultati antibiograma multirezistentnog *P. aeruginosa* iz čega je vidljivo da je spomenuti soj razvio otpornost na 6 od 8 ispitanih antibiotika. Osjetljivost je uočena tek za dva antibiotska lijeka, odnosno za amikacin i ceftazidim.

Izolirani soj presađen je na *Pseudomonas* agar i inkubiran na 37° C tijekom 24 h. Za vrijeme provedbe eksperimenata, presađeni soj čuvan je u hladnjaku na +4 °C.

Osim multirezistentnog *P. aeruginosa*, prilikom ispitivanja minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 korišten je i rezistentni soj *Burkholderia cepacia* koji je također izoliran iz biofilma s

mrežice slavine unutar bolničkog sustava. U tablici 4 prikazani su rezultati antibiograma navedene bakterije.

Tablica 4. Prikaz rezultata antibiograma za rezistentnu *B. cepacia*

Antibiotik	Rezultat
<b>Pipercilin – tazobaktam</b>	rezistentan
<b>Ciprofloksacin</b>	rezistentan
<b>Imipenem</b>	rezistentan
<b>Cefepim</b>	rezistentan
<b>Ceftazidim</b>	osjetljiv
<b>Meropenem</b>	rezistentan
<b>Gentamicin</b>	rezistentan
<b>Amikacin</b>	rezistentan
<b>Sulfametoksazol/Trimetoprim</b>	osjetljiv

Iz rezultata antibiograma jasno je vidljivo da je *B. cepacia* izolirana iz biofilma unutar bolničkog sustava također višestruko rezistentna, odnosno pokazuje otpornost na čak 7 od 9 antibiotskih lijekova. Ispitani soj osjetljivost pokazuje na tek dva antibiotika, odnosno na ceftazidim i sulfametoksazol/trimetoprim.

Izolirani soj presađen je na Burkholderia agar i inkubiran na 37° C tijekom 48 sati. Za vrijeme provedbe istraživanja tako presađeni soj čuvan je u hladnjaku na +4° C.

### 3.2. Kemijska analiza komunalne otpadne vode

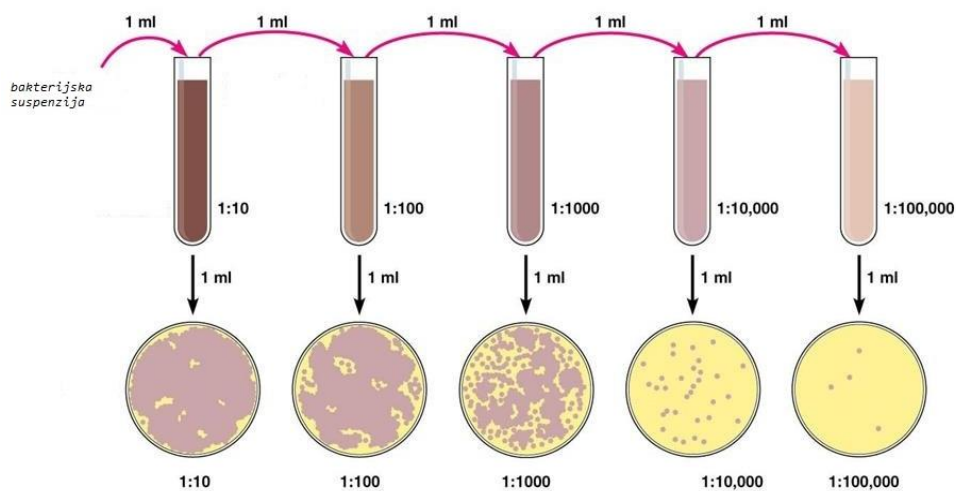
Kemijska analiza uzorka komunalne otpadne vode napravljena je na odsjeku za kontrolu otpada i otpadnih voda Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. U tablici 5. slijedi prikaz analiziranih parametara i korištenih metoda.

Tablica 5. Prikaz parametara i metoda fizikalno – kemijske analize otpadnih voda

PARAMETAR	METODA
Temperatura zraka(°C)	SM 23rd Ed. 2017:2550
Temperatura vode (°C)	SM 23rd Ed. 2017:2550 B
Protok (L/s)	-
pH	HRN EN ISO 10523:2012
Temperatura mjerenja pH (°C)	-
Elektrovodljivost (µS/cm)	HRN EN 27888:2008
Temperatura mjerenja EV(°C)	-
Vidljiva otpadna tvar	-
Miris vode	-
Otopljeni kisik (mg/L kao O <sub>2</sub> )	HRN EN 25813:2003
KPK ( mg/L kao O <sub>2</sub> )	HRN ISO 15705:2003
BPK5 ( mg/L kao O <sub>2</sub> )	SM 23rd Ed. 2017:5210 D
Ukupne krutine (mg/L)	SM 23rd Ed. 2017:2540 B
Suspendirana tvar (mg/L)	HRN EN 872:2008
Taložna tvar (mL/L)	SM 23rd Ed. 2017:2540 F
Kloridi (mg/L)	HRN ISO 9297:1998
Ukupne masti i ulja (mg/L)	SM 23rd Ed. 2017:5520 B
Fenoli (mg/L)	HRN ISO 6439:1998
Anionski detergentski (mg/L)	HRN EN 903:2002
Kationski detergentski (mg/L)	The Testing of Water 10th Ed. E.Merck
Neionski detergentski (mg/L)	Anal.Chem.,vol.57,No.3.:1985, P 5.4/125-230 (izdanje 1)
Amonij ion (mg/L kao N)	HRN ISO 5664:1998
Nitriti ( mg/L kao N )	HRN EN 26777:1998
Nitrati ( mg/L kao N )	SM 23rd Ed. 2017:4500-NO <sub>3</sub> B
Kjeldahl dušik ( mg/L kao N)	HRN EN 25663:2008
Ukupni dušik ( mg/L kao N)	P 5.4/197-230 (izdanje 1)
Fosfati ( mg/L kao P)	HRN EN ISO 6878:2008
Ukupni fosfor ( mg/L kao P)	HACH, LCK 349, P 5.4/165-230 (izdanje 2)
AOX (mg/L)	HACH, LCK 390, P 5.4/137-230 (izdanje 2)
Boja (mg/L Pt)	HRN EN ISO 7887:2012
Ukupni koliformni cfu/100 mL	SM 23rd Ed. 2017:9222 B
Fekalni koliformni cfu/100 mL	SM 23rd Ed. 2017:9222 D
Zn (mg/L)	HRN EN ISO 17294-2:2016
Cd (mg/L)	HRN EN ISO 17294-2:2016
Cr (mg/L)	HRN EN ISO 17294-2:2016
Pb (mg/L)	HRN EN ISO 17294-2:2016
Hg (mg/L)	AMA 254 Hg, P 5.4/146-270 (izdanje 3)
PAU (mg/L)	HRN EN ISO 17993:2008 (mod.)

### 3.3. Mikrobiološka analiza komunalne otpadne vode

Za potrebe mikrobiološke analize, iz dobivenog uzorka komunalne otpadne vode pripravljena je serija od 5 deseterostrukih razrjeđenja. Deseterostruka razrjeđenja napravljena su na način da je u pet epruveta dodan volumen od 1,8 ml 0,8 % tne fiziološke otopine. U prvu epruvetu zatim je automatskom mikropipetom dodano 200  $\mu$ l uzorka otpadne vode kako bi se dobilo prvo deseterostruko razrjeđenje. Pripravljene sadržaj epruvete izmiješan je pomoću miješalice nakon čega je iz njega 200  $\mu$ l preseljeno u sljedeću epruvetu s ciljem dobivanja drugog deseterostrukog razrjeđenja. Isti postupak je ponovljen i u ostalim epruvetama do konačnog razrjeđenja od  $10^{-5}$ . Volumen od 10  $\mu$ l ishodnog uzorka i pripremljenih razrjeđenja nasaden je u duplikatu na hranjivu podlogu Mueller Hinton, a volumen od 100  $\mu$ l ishodnog uzorka nasaden je na kromogeni te Pseudomonas agar. Nakon nasadivanja, hranjive podloge inkubirane su na 37 °C tijekom 24 sata. Hranjiva podloga Mueller Hinton korištena je s ciljem utvrđivanja brojnosti bakterija u uzorku, dok su kromogeni i Pseudomonas agar poslužili za identifikaciju specifičnih bakterijskih vrsta. Bakterijske vrste identificirane su biokemijskim API testom. Osim toga, antibiogramom je ispitana i njihova potencijalna otpornost na antimikrobna sredstva.



Slika 9. Shematski prikaz pripreme deseterostrukih razrjeđenja (42)

### 3.4. Preživljavanje multirezistentne bakterije *P. aeruginosa*

Tijekom ispitivanja preživljavanja otpornih bakterija u vodenom okruženju korištena je bakterijska kultura *P. aeruginosa* izoliranog iz biofilma u bolničkom okruženju. Soj je plastičnom mikrobiološkom ušicom prenesen u epruvetu s fiziološkom otopinom kako bi se dobio bakterijski inokulum od  $10^8$  CFU/ml što je ekvivalent optičke gustoće (OD) 0,1 koja se mjerila spektrofotometrijski. Tako pripremljeni inokulum razrijeđen je do drugog deseterostrukog razrjeđenja, odnosno do  $10^6$  CFU/ml što je ujedno i početna koncentracija koja je korištena za određivanje preživljavanja *P. aeruginosa*. Volumen od 50  $\mu$ l pripravljene bakterijske suspenzije zatim je dodano volumenima od 5 ml sterilne vode iz slavine, 5 ml sterilne i filtrirane otpadne vode te 5 ml sirove otpadne vode. Iz svakog uzorka na mikrotitarskoj pločici napravljeno je 5 deseterostrukih razrjeđenja. Ishodne otopine i razrjeđenja svih triju uzoraka zatim su nasađeni na Pseudomonas agar i inkubirani na 37° C tijekom 24 h s ciljem određivanja brojnosti bakterijskih stanica. Navedeni postupak ponovljen je nakon 3, 5, 8, 10, 15 dana od pripreme uzoraka kako bi se u konačnici dobila krivulja preživljavanja multirezistentnog *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi iz slavine, sterilnoj otpadnoj vodi te sirovoj otpadnoj vodi. Za vrijeme ispitivanja uzorci su čuvani u inkubatoru na 30° C.

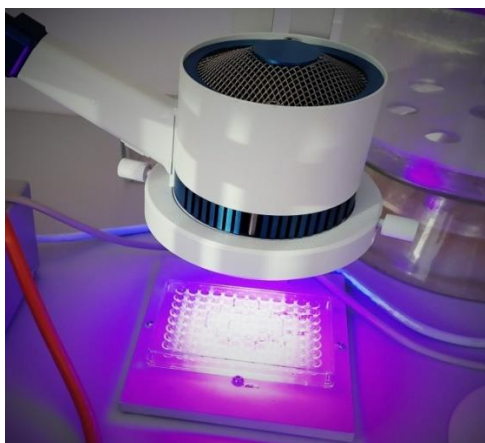


Slika 10. Bakterijske kolonije multirezistentnog *P. aeruginosa*

### 3.5. Ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3

Minimalna efektivna koncentracija (MEK), odnosno najniža koncentracija spoja pri kojoj se uočava izostanak rasta mikroorganizama. Ispitana je na bakterijskim suspenzijama multirezistentnog *P. aeruginosa* i *B. cepacia* izoliranim iz biofilma bolničkog sustava te *P. aeruginosa*, *P. putida* i *V. Parahaemolyticus* izoliranim iz sirove otpadne vode. Suspenzije navedenih bakterija pripravljene su u sterilnoj vodi iz slavine te filtriranoj i sterilnoj otpadnoj vodi pri koncentraciji od  $10^6$  CFU/ml. U mikrotitarskoj pločici napravljena je serija dvostrukih razrjeđenja porfirina TMPyP3 nakon čega je u svaku jažicu dodano po 100  $\mu$ l bakterijske suspenzije. Mikrotitarske pločice omotane aluminijskom folijom inkubirane su na tresilici tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su ozračeni ljubičastom LED lampom jakosti 40 mW/cm<sup>2</sup> tijekom 10 minuta. Osim tretiranja bakterijskih suspenzija 10-minutnim zračenjem, ispitivanje MEK izvršeno je i u intervalu zračenja od 30 minuta. Tretirani uzorci bakterijskih sojeva i porfirina zatim su prekriveni aluminijskom folijom i stavljeni na inkubaciju na 30° C tijekom 24h. Nakon 24-satne inkubacije, iz svake jažice s uzorkom uzeto je 10  $\mu$ l i nasađeno na hranjivu podlogu Mueller Hinton. Podloge su naposljetku inkubirane na 37° C kroz 24h.

Sva testiranja provedena su u duplikatu.



Slika 11. Ozračivanje uzorka ljubičastom LED lampom

### 3.6. Fotoinaktivacijski test

Za izvedbu fotoinaktivacijskog testa, hidrofilni kationski porfirin TMPyP3 početne koncentracije 200  $\mu\text{M}$  razrijeđen je sterilnom vodom iz slavine na koncentracije 6, 25  $\mu\text{M}$ , 12, 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ . Bakterijska suspenzija multirezistentnog *P. aeruginosa* pripravljena je u uzorcima sterilne vode iz slavine, filtrirane sterilne otpadne vode te sirove otpadne vode pri koncentraciji od  $10^6$  CFU/ml. U mikrotitarskoj pločici, volumenima od 100  $\mu\text{l}$  porfirina navedenih koncentracija dodano je 100  $\mu\text{l}$  pripremljene bakterijske suspenzije. U tako priređenim smjesama koncentracija porfirina bila je upola manja, odnosno 3,125  $\mu\text{M}$ , 6, 25  $\mu\text{M}$ , 12, 5  $\mu\text{M}$  i 25  $\mu\text{M}$ . Mikrotitarske pločice sa smjesom porfirina i bakterijske suspenzije zatim su pokrivena aluminijskom folijom i inkubirane na tresilici tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, mikrotitarska pločica podvrgnuta je ozračivanju ljubičastom LED lampom intenziteta 40  $\text{mW}/\text{cm}^2$  u vremenskim intervalima od 30, 60 i 90 minuta. Tijekom zračenja, nakon svakih 30 minuta uzeto je 50  $\mu\text{l}$  uzorka kako bi se napravila deseterostruka razrjeđenja i nasadila na Pseudomonas agar. Hranjive podloge zatim su stavljene na inkubaciju na 37° C tijekom 24 h.

Osim fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa*, test fotoinaktivacije proveden je i na bakterijama u sirovoj otpadnoj vodi. Testiranje je izvedeno pri koncentracijama TMPyP3 od 3, 125  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$  i 12, 5  $\mu\text{M}$ . Uvjeti ispitivanja jednaki su uvjetima opisanog postupka fotoinaktivacije *P. aeruginosa*. Međutim, uzorci su u ovom slučaju nasadjeni na hranjivu podlogu Mueller Hinton i inkubirani na 37° C u vremenskom periodu od 24 h.

Sva opisana testiranja provedena su u triplikatu.

## 4. Rezultati

### 4.1. Kemijska analiza komunalne otpadne vode

Rezultati analize fizikalno – kemijskih parametara komunalne otpadne vode prikazani su tablicom 6.

Tablica 6. Prikaz rezultata fizikalno – kemijske analize komunalne otpadne vode

				<b>GV</b>	
Temperatura zraka:		10,0 °C	Temperatura vode:	<b>30</b>	5,1 °C
<b>Pokazatelj:</b>		<b>Rezultat</b>	<b>Pokazatelj:</b>		<b>Rezultat</b>
<b>Fizikalno – kemijske i kemijske metode</b>					
	<b>GV</b>			<b>GV</b>	
Protok (L/s)		471	Zn (mg/L)	<b>2</b>	0,022
pH	<b>6,5-9,0</b>	7,38	Cd (mg/L)	<b>0,1</b>	0,00003
Temp. mjerenja pH (°C)		24,8	Cr (mg/L)	<b>0,5</b>	0,0009
Elektrovodljivost (µS/cm)		21565	Pb (mg/L)	<b>0,5</b>	0,0008
Temp. mjerenja EV(°C)		25,2	Hg (mg/L)	<b>0,01</b>	<0,00025
Vidljiva otpadna tvar		sitne plivajuće čestice	PAU (mg/L)		0,000029
Miris vode		po fekalnoj tvari	AOX (mg/l)	<b>0,5</b>	0,392
Otopljeni kisik (mg/L kao O <sub>2</sub> )		7,3	Boja (mg/L Pt)		27
KPK ( mg/L kao O <sub>2</sub> )	<b>125</b>	345	-		
BPK5 ( mg/L kao O <sub>2</sub> )	<b>25</b>	160	-		
Ukupne krutine (mg/L)		16192	-		
Suspendirana tvar (mg/L)	<b>35</b>	54,0	-		
Taložna tvar (mL/L)	<b>0,5</b>	3,5	-		
Kloridi (mg/L)		8172	-		
Ukupne masti i ulja (mg/L)	<b>20</b>	26,9	-		
Fenoli (mg/L)	<b>0,1</b>	0,010	-		
Anionski detergentski (mg/L)	<b>1</b>	1,02	-		
Kationski detergentski (mg/L)	<b>0,5</b>	0,32	-		
Neionski detergentski (mg/L)	<b>1</b>	<0,20	-		
Amonij ion (mg/L)	<b>10</b>	12,9	-		
Nitriti ( mg/L kao N )	<b>1</b>	0,201	-		
Nitrati ( mg/L kao N )	<b>2</b>	0,95	-		
Kjeldahl dušik ( mg/L kao N)		19,1	-		
Ukupni dušik ( mg/L)	<b>15</b>	20,3	-		
Fosfati ( mg/L kao P)	<b>1</b>	0,731	-		
Ukupni fosfor ( mg/L)	<b>2</b>	2,31	-		

GV- granična vrijednost



Usporedbom rezultata fizikalno – kemijske analize komunalne otpadne vode s graničnim vrijednostima (GV) analiziranih parametara, propisanih Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/20) (43), vidljivo je da 9 od 23 pokazatelja ne zadovoljava maksimalno dozvoljene vrijednosti. Neki od tih pokazatelja su ukupne masti i ulja, amonijev ion, nitriti, nitrati te ukupni dušik što i nije neočekivano s obzirom da je riječ o uzorku komunalne otpadne vode. Naime kako je riječ o otpadnoj vodi koja je ponajprije produkt odvodnje iz javnih, stambenih, industrijskih i drugih objekata namijenjenih za rad i stanovanje jasno je da je takva voda opterećena tvarima koje nastaju raspadom hranjivih tvari i fekalija, što se u ovom slučaju očituje povišenom vrijednošću masti i ulja te spojeva na bazi dušika. Nadalje, opterećenje fekalijama vodi je, osim povišene razine dušikovih spojeva, dalo karakterističan miris po fekalnoj tvari. Razina kemijske potrošnje kisika (KPK) premašuje granične vrijednosti za približno 3 puta, a razina BPK5, odnosno petodnevne biokemijske potrošnje kisika, za čak 6,5 puta. Prisustvo teških metala u komunalnoj otpadnoj vodi vjerojatno je posljedica ispiranja prometnica, no kako su svi rezultati ispod granične vrijednosti, njihov nalaz u ispitanom uzorku komunalne otpadne vode nije pretjerano zabrinjavajuć.

#### 4.2. Mikrobiološka analiza komunalne otpadne vode

Broj bakterija u analiziranom uzorku komunalne otpadne vode određen je brojanjem kolonija naraslih na hranjivoj podlozi Mueller Hinton nakon 24-satne inkubacije na 37° C. Iz broja kolonija izračunata je srednja aritmetička vrijednost koja iznosi  $4,2 \cdot 10^5$  CFU/ml (prema eng. colony forming unit).

U uzorku komunalne otpadne vode mikrobiološkom analizom pronađene su sljedeće Gram – negativne nefermentirajuće bakterije:

- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas aeruginosa*



Slika 12. *P. putida* izoliran iz uzorka otpadne vode

Prisustvo navedenih bakterijskih vrsta u komunalnoj otpadnoj vodi dokazano je biokemijskim API testom, a rezultati su vidljivi na slici 13.



Slika 13. Prikaz API testa za *P. aeruginosa* (gore), API testa za *P. putida* (sredina) i API testa za *V. parahaemolyticus* (dolje)

S ciljem ispitivanja otpornosti bakterija *P. aeruginosa* i *P. putida*, izoliranih iz dobivenog uzorka komunalne otpadne vode, načinjen je antibiogram, a rezultati su prikazani tablicama 7 i 8.

Tablica 7. Prikaz rezultata antibiograma bakterije *P. aeruginosa*

Antibiotik	Promjer zone/ mm	Rezultat
<b>Pipercilin – tazobaktam (6µg)</b>	28	intermedijerno osjetljiv
<b>Amikacin (30µg)</b>	28	osjetljiv
<b>Ceftazidim (10µg)</b>	32	intermedijerno osjetljiv
<b>Cefepim (30µg)</b>	34	intermedijerno osjetljiv
<b>Ciprofloksacin (5µg)</b>	44	intermedijerno osjetljiv
<b>Meropenem (10µg)</b>	38	osjetljiv
<b>Imipenem (10µg)</b>	30	intermedijerno osjetljiv

Tablica 8. Prikaz rezultata antibiograma bakterije *P. putida*

Antibiotik	Promjer zone / mm	Rezultat
Pipercilin – tazobaktam (6µg)	26	intermedijerno osjetljiv
Amikacin (30µg)	36	osjetljiv
Ceftazidim (10µg)	30	intermedijerno osjetljiv
Cefepim (30µg)	34	intermedijerno osjetljiv
Ciprofloksacin (5µg)	34	intermedijerno osjetljiv
Meropenem (10µg)	30	osjetljiv
Imipenem (10µg)	40	intermedijerno osjetljiv

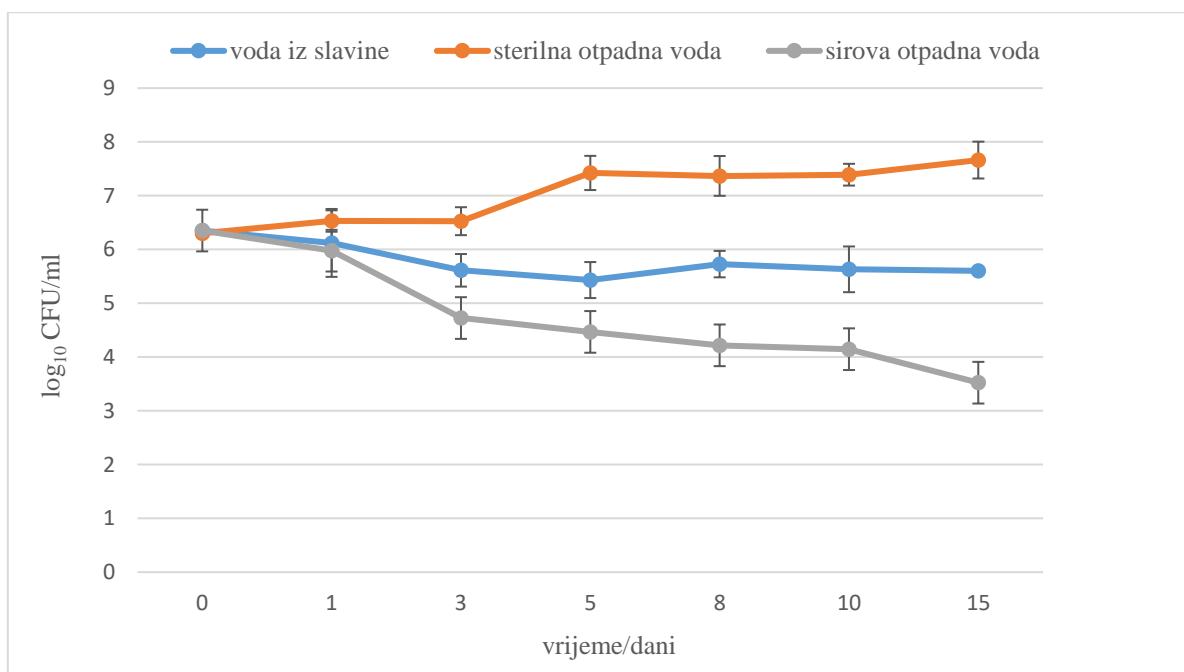
Iz tablica 7 i 8 jasno je da nefermentirajuće bakterije *P. aeruginosa* i *P. putida* izolirane iz uzorka komunalne otpadne vode nisu rezistentne na ispitane antibiotike, odnosno umjereno su osjetljive na 5 od 7 antibiotskih lijekova, a izraženiju osjetljivost pokazuju na amikacin i meropenem.



Slika 14. Prikaz antibiograma za *P. aeruginosa* (lijevo) i *P. putida* (desno)

### 4.3. Preživljavanje multirezistentne bakterije *P. aeruginosa*

Na slici 15. prikazana je krivulja preživljavanja multirezistentne bakterije *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi iz slavine, sterilnoj otpadnoj vodi te sirovoj otpadnoj vodi nakon 1, 3, 5, 8, 10 i 15 dana od pripreme uzorka. Iz broja bakterijskih kolonija naraslih na Pseudomonas agaru izračunata je aritmetička sredina koja je zatim logaritmirana. Statistička analiza podataka izvršena je računanjem standardne devijacije.



Slika 15. Preživljavanje multirezistentnog *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi iz slavine, steriliziranoj otpadnoj i sirovoj otpadnoj vodi. Pokusi su ponovljeni dvaput i prikazane su srednje vrijednosti

Iz navedene krivulje preživljavanja vidljivo je da multirezistentni *P. aeruginosa* izoliran iz bakterijskog biofilma najbolje preživljava u uzorku sterilne otpadne vode što se uočava porastom logaritma aritmetičke sredine broja bakterijskih kolonija sa 6,30 na 7,66 nakon 15 dana od pripreme uzoraka. Nakon početnog pada logaritamske vrijednosti, u uzorku vode iz slavine nakon 5 dana zamjetan je blagi porast logaritma aritmetičke sredine izbrojanih kolonija, a zatim i stagnacija. Međutim, u sirovoj otpadnoj vodi zabilježen je pad logaritma aritmetičke sredine broja bakterijskih kolonija sa 6,35 na 3,52 iz čega proizlazi zaključak da sirova otpadna voda nije idealan medij za rast i razvoj multirezistentnog *P. aeruginosa*.

#### 4.4. Ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3

Minimalna efektivna koncentracija TMPyP3 ispitana je na bakterijskim suspenzijama multirezistentnog *P. aeruginosa*, *B. cepacia* izoliranih iz biofilma unutar bolničkih ustanova te *P. aeruginosa*, *P. putida* i *V. Parahaemolyticus* izoliranih iz uzorka sirove otpadne vode. Testiranja su provedena u uzorcima sterilne vode iz slavine te filtrirane sterilne otpadne vode uz zračenje ljubičastom LED lampom. Rezultati MEK ispitivanja prikazani su tablicama 9 i 10.

Tablica 9. MEK ispitivanje u filtriranoj sterilnoj otpadnoj vodi

Bakterija	MEK / $\mu\text{M}$	MEK / $\mu\text{M}$
	ozračivanje 10 min	ozračivanje 30 min
<i>B. cepacia</i>	> 100	25
Multirezistentni	> 100	100
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>P. aeruginosa</i> (izoliran iz otpadne vode)	> 12, 5	> 12, 5
<i>P. putida</i> (izoliran iz otpadne vode)	> 12, 5	> 12, 5
<i>V. parahaemolyticus</i> (izoliran iz otpadne vode)	12, 5	3, 125

Iz tablice 9 vidljivo je da minimalna efektivna koncentracija testiranog spoja uvelike ovisi o vremenu ozračivanja jer je TMPyP3 u gotovo svim slučajevima (izuzev *P. aeruginosa* i *P. putida* izoliranih iz uzorka komunalne otpadne vode) učinkovitiji pri nižim koncentracijama što je vrijeme ozračivanja dulje. Nadalje, iako su sve ispitane bakterijske vrste gram negativne (što im daje određen stupanj otpornosti u odnosu na gram pozitivne bakterije), minimalne efektivne

koncentracije ispitivanog porfirina razlikuju se od bakterije do bakterije što je vjerojatno posljedica prisustva različitih mehanizama rezistencije.

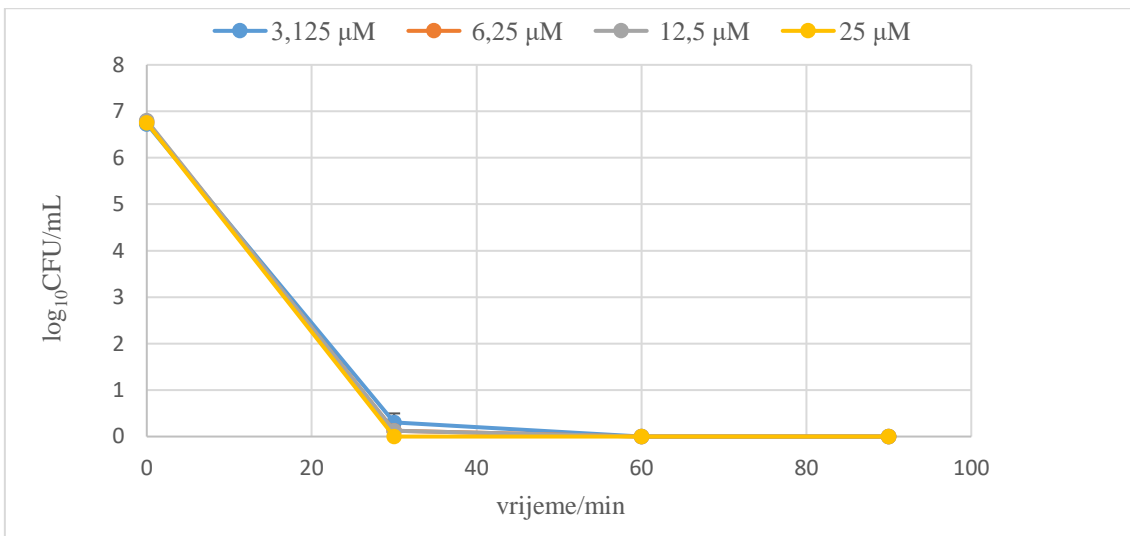
Tablica 10. MEK ispitivanje u sterilnoj vodi iz slavine

<b>Bakterija</b>	<b>MEK / <math>\mu</math>M</b> <b>Ozračivanje 10 min</b>
<i>B. cepacia</i>	12, 5
Multirezistentni <i>P. aeruginosa</i>	6, 25
<i>P. putida</i> (izoliran iz otpadne vode)	0, 098

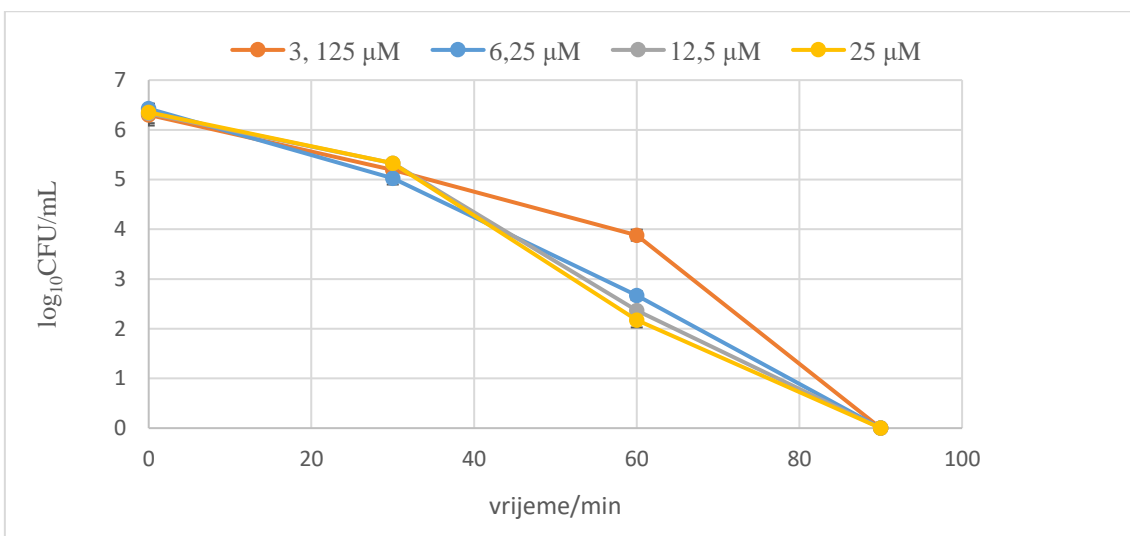
U tablici 10 prikazani su rezultati ispitivanja minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 u sterilnoj vodi iz slavine. Iako je testiranje provedeno samo na trima baterijskim sojevima u desetominutnom intervalu zračenja, vidljivo je da je učinkovitost TMPyP3, pod istim uvjetima, znatno veća u sterilnoj vodi iz slavine nego u otpadnoj vodi koja je prethodno filtrirana i sterilizirana.

#### 4.5. Fotoinaktivacijski test na multirezistentnom *P. aeruginosa*

Fotoinaktivacijski učinak TMPyP3 ispitan je na multirezistentnom *P. aeruginosa* iz biofilma u uzorcima sterilne vode iz slavine, filtrirane sterilne otpadne vode te sirove otpadne vode. Testiranje je provedeno u vremenskim intervalima od 30, 60 i 90 min pri koncentracijama porfirina od 3, 125  $\mu\text{M}$ , 6, 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  i 25  $\mu\text{M}$ , a rezultati su dani sljedećim grafičkim prikazima:

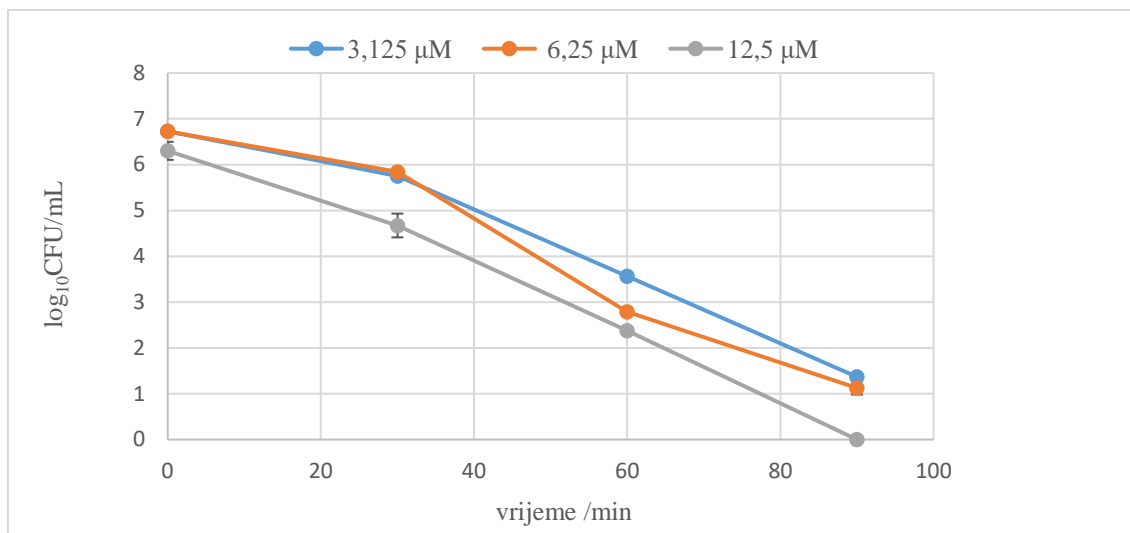


Slika 16. Fotoinaktivacija multirezistentnog *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi iz slavine



Slika 17. Fotoinaktivacija multirezistentnog *P. aeruginosa* u sterilnoj otpadnoj vodi

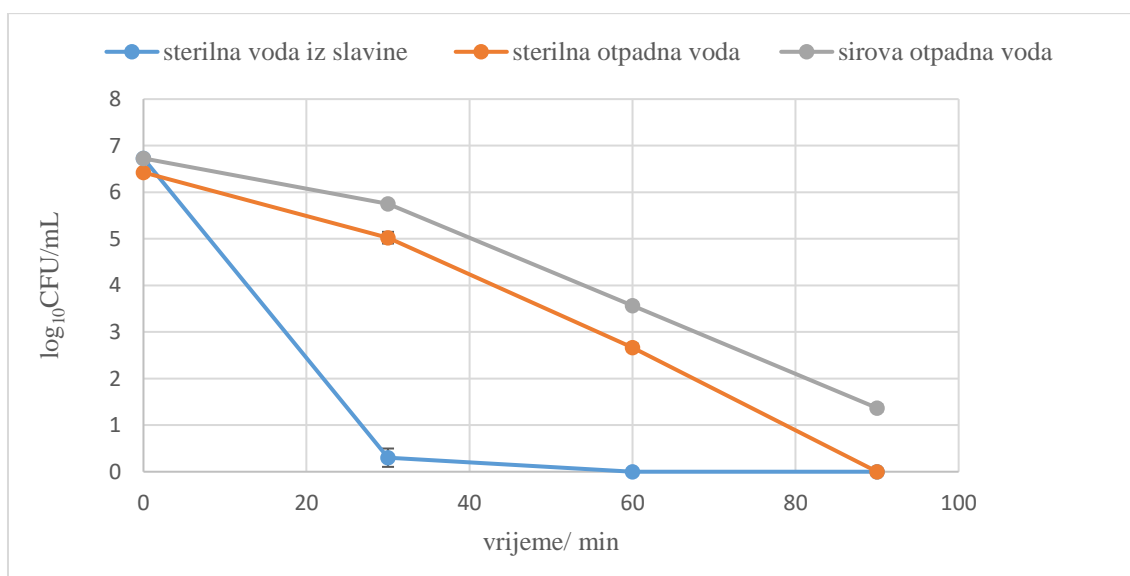




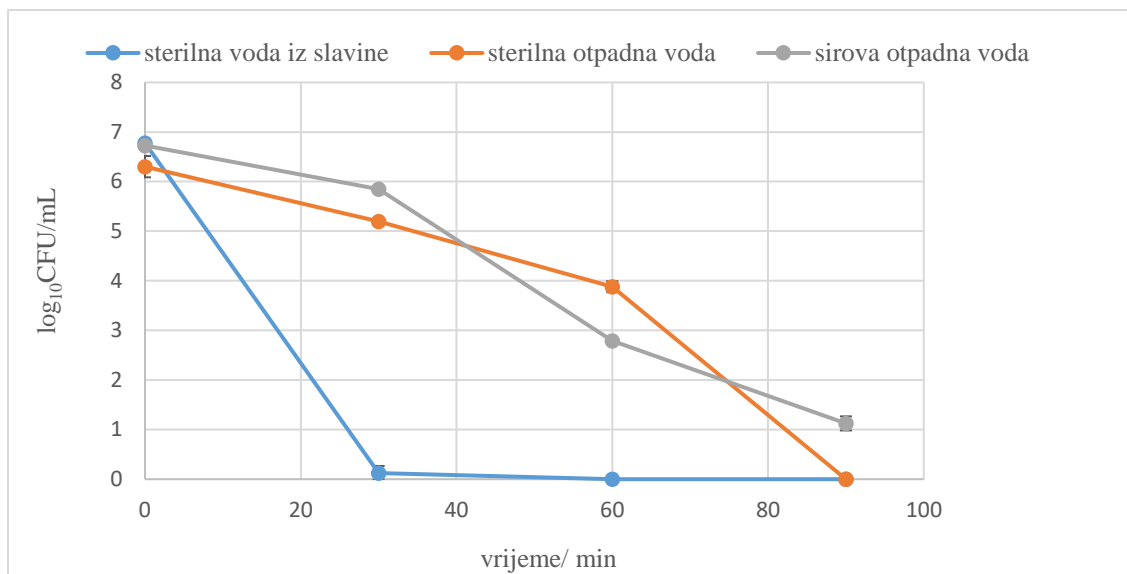
Slika 18. Fotoinaktivacija multirezistentnog *P. aeruginosa* u sirovoj otpadnoj vodi

Na slici 16, 17 i 18 vidljiva je jasna ovisnost fotodinamičkog efekta TMPyP3 o upotrijebljenoj koncentraciji. U svim slučajevima učinkovitost fotoinaktivacije raste s povećanjem koncentracije. Nakon 90 minuta ozračivanja, *P. aeruginosa* gotovo je potpuno inaktiviran neovisno o koncentraciji porfirina.

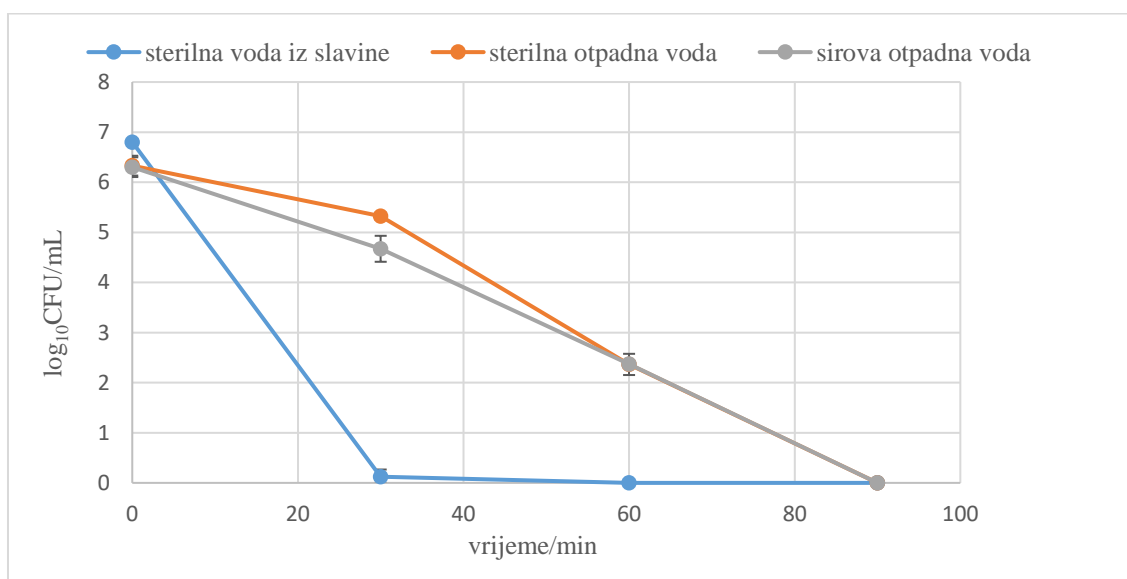
U grafičkim prikazima 19, 20 i 21 prikazane su usporedbe rezultata fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* među ispitivanim uzorcima:



Slika 19. Usporedba rezultata fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* među ispitivanim uzorcima pri koncentraciji porfirina  $c = 3,125 \mu\text{M}$



Slika 20. Usporedba rezultata fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* među ispitivanim uzorcima pri koncentraciji porfirina  $c = 6, 25 \mu\text{M}$



Slika 21. Usporedba rezultata fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* među ispitivanim uzorcima pri koncentraciji porfirina  $c = 12, 5 \mu\text{M}$

Iz slika 19, 20 i 21 vidljivo je da je fotodinamički učinak hidrofilnog porfirina TMPyP3 najveći u sterilnoj vodi iz slavine, dok su rezultati fotodinamičke inaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* u uzorcima sterilne i sirove otpadne vode gotovo podjednaki.

Iz rezultata fotoinaktivacije također je izračunat i postotak inhibicije multirezistentnog *P. aeruginosa*. Izračun postotka inhibicije prikazan je sljedećom formulom:

$$\% \text{ poraslih bakterija} = \frac{\text{srednja vrijednost broja bakterija u vremenu } t}{\text{srednja vrijednost broja bakterija u vremenu } t_0} \times 100\%$$

i zatim:

$$\% \text{ inhibicije} = 100\% - \% \text{ poraslih bakterija}$$

Postotci inhibicije multirezistentnog *P. aeruginosa* prikazani su tablicama 11-13.

Tablica 11. Prikaz postotka inhibicije *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi iz slavine

T ozračivanja/ min	% inhibicije pri c=3,125 μM	% inhibicije pri c=6,25 μM	% inhibicije pri c=12,5 μM	% inhibicije pri c=25 μM
30	100	100	100	100
60	100	100	100	100
90	100	100	100	100

Tablica 12. Prikaz postotka inhibicije *P. aeruginosa* u sterilnoj otpadnoj vodi

T ozračivanja/ min	% inhibicije pri c=3,125 μM	% inhibicije pri c=6,25 μM	% inhibicije pri c=12,5 μM	% inhibicije pri c=25 μM
30	92,20	96,03	90,13	90,56
60	99,62	99,98	99,99	99,99
90	100	100	100	100

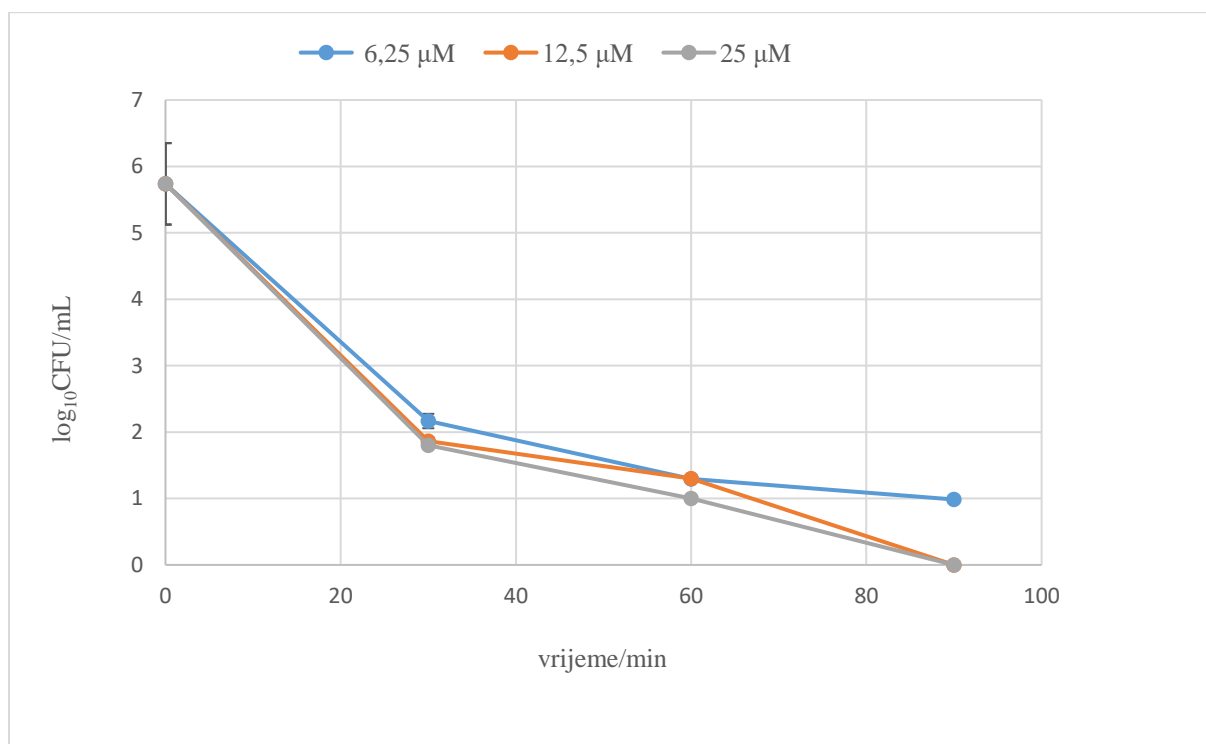
Tablica 13. Prikaz postotka inhibicije *P. aeruginosa* u sirovoj otpadnoj vodi

T ozračivanja/ min	% inhibicije pri c=3,125 μM	% inhibicije pri c=6,25 μM	% inhibicije pri c=12,5 μM
30	89,38	86,88	97,65
60	99,93	99,99	99,99
90	100	100	100

Iz tablica 11-13 vidljivo je da je inhibicija *P. aeruginosa* najbolja u sterilnoj vodi iz slavine (100% pri c=3, 125 μM nakon 30min), a najslabija u sirovoj otpadnoj vodi (89,38% pri istim uvjetima).

#### 4. 6. Fotoinaktivacijski test na bakterijama iz sirove otpadne vode

Osim ispitivanja učinka hidrofilnog kationskog porfirina TMPyP3 na multirezistentnu bakteriju *P. aeruginosa* izoliranu iz biofilma, u uzorku sirove otpadne vode testirana je i fotodinamička inaktivacija bakterija prisutnih u navedenom uzorku. Testiranje je provedeno u vremenskom intervalu od 30, 60 i 90 minuta pri koncentracijama porfirina od 6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  i 25  $\mu\text{M}$ .



Slika 22. Fotoinaktivacija bakterija u sirovoj otpadnoj vodi

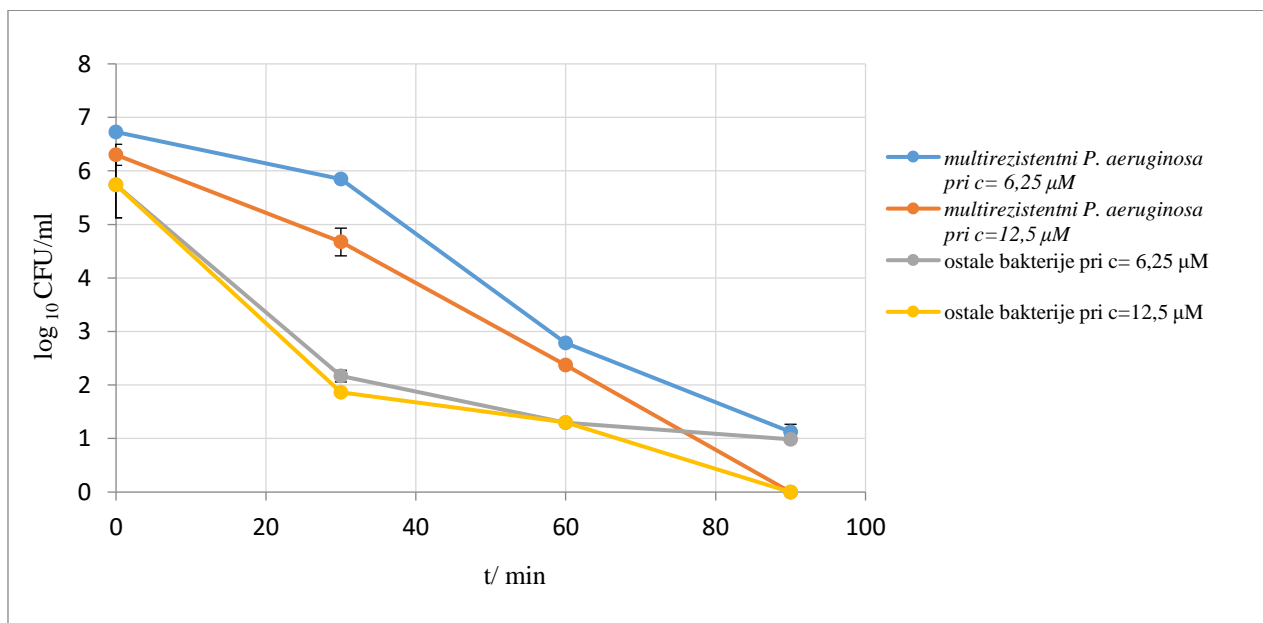
Kao i na slikama 16, 17 i 18 i u ovom slučaju uočena je ovisnost fotodinamičke inaktivacije o koncentraciji TMPyP3. Osim toga, nakon 90 minuta ozračivanja, ponovno je uočena gotovo potpuna ili potpuna inaktivacija bakterija prisutnih u uzorku sirove otpadne vode.

Postotak inhibicije također je izračunat i za bakterije u sirovoj otpadnoj vodi, a prikazan je tablicom 13.

Tablica 14. Prikaz postotka inhibicije bakterija iz sirove otpadne vode

T ozračivanja/ min	% inhibicije pri c=6,25 $\mu\text{M}$	% inhibicije pri c=12,5 $\mu\text{M}$	% inhibicije pri c=25 $\mu\text{M}$
30	99,97	99,99	99,99
60	100	100	100
90	100	100	100

Iz tablice 14. vidljivo je da je postotak inhibicije bakterija iz sirove otpadne vode gotovo stopostotan (% inhibicije = 99,97) već nakon 30 minuta ozračivanja pri najnižoj koncentraciji porfirina, c=6, 25  $\mu\text{M}$ .



Slika 23. Usporedba rezultata fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* i ostalih bakterija u uzorku sirove otpadne vode pri koncentracijama porfirina c=6,25  $\mu\text{M}$  i 12,5  $\mu\text{M}$

Na slici 23. prikazana je usporedba rezultata fotoinaktivacije multirezistentnog *P. aeruginosa* i bakterija prisutnih u uzorku sirove otpadne vode pri koncentracijama porfirina od 6,25  $\mu\text{M}$  i 12,5  $\mu\text{M}$ . Na navedenom grafičkom prikazu jasno se uočava da TMPyP3 pri istim koncentracijama znatno učinkovitije inaktivira bakterije iz uzorka sirove otpadne vode nego multirezistentni soj *P. aeruginosa*.

## 5. Rasprava

### 5.1. Preživljavanje multirezistentne bakterije *P. aeruginosa*

Na slici 15 dan je prikaz krivulja preživljavanja multirezistentnog *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi iz slavine, filtriranoj sterilnoj otpadnoj vodi te sirovoj otpadnoj vodi iz kojih se jasno uočavaju određene razlike. Naime, krivulja rasta u sterilnoj otpadnoj vodi ukazuje na činjenicu da *P. aeruginosa* najbolje preživljava upravo u tom mediju (vidljivo iz skoka dekadskog logaritma aritmetičke sredine vrijednosti CFU/ml sa 6,30 na 7,66 nakon 15 dana). Za razliku od uzorka sterilne otpadne vode, krivulje rasta *P. aeruginosa* u preostala dva uzorka prate drukčiji trend, odnosno stagnaciju u uzorku vode iz slavine i jasan pad u uzorku sirove otpadne vode (pad  $\log_{10}$  CFU/ml sa 6,30 na 3,52 nakon 15 dana).

Jasno je da su navedeni rezultati posljedica različitosti u prirodi ispitivanih medija. Naime, uzorak sirove otpadne vode pokazao se neodgovarajućim medijem za preživljavanje *P. aeruginosa* vjerojatno zbog prisustva toksičnih tvari, ali i drugih mikroorganizama koji se s ispitivanom bakterijom natječu za hranu i na taj način joj ograničavaju rast (44). S druge strane, na uzorku sterilne otpadne vode vidljivi su suprotni rezultati upravo zbog prethodne filtracije i sterilizacije. Navedenim postupcima uklonjeni su svi prisutni mikroorganizmi, ali i dio toksičnih tvari čime je multirezistentnom *P. aeruginosa* na raspolaganje dano obilje hranjive materije, a što je u konačnici rezultiralo njegovim rapidnim rastom i razvojem.

Za razliku od ovih dvaju uzoraka, u sterilnoj vodi iz slavine zamijećena je stagnacija razmnožavanja *P. aeruginosa*. S obzirom da je riječ o mediju s vrlo ograničenim izvorom hranjivih tvari, pretpostavka je da je *P. aeruginosa*, kako bi se prilagodio nepovoljnim uvjetima u kojima se nalazi, ušao u tzv. fazu dormancije (mirovanja), odnosno u stadij koji se očituje procesima poput smanjenja i preusmjeravanja metaboličkih puteva, promjene propusnosti i sastava membrane, smanjenja veličine stanice te kondenzacije DNA (45). *P. aeruginosa* inače

pripada grupi OPPP (prema eng. Opportunistic premise plumbing pathogens) stoga na čudi činjenica da je prilagođen uvjetima života u vodi gdje raste u obliku biofilma (46).

## 5.2. Ispitivanje minimalne efektivne koncentracije TMPyP3

Tablice 9 i 10 prikazuju rezultate ispitivanja minimalne efektivne koncentracije porfirina TMPyP3 na različite bakterijske vrste u uzorcima filtrirane sterilne otpadne vode te sterilne vode iz slavine. Usporedbom navedenih tablica vidljive su značajne razlike u vrijednosti minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 ovisno o ispitivanoj bakterijskoj vrsti, duljini trajanja ozračivanja te mediju u kojem je testiranje izvršeno.

Premda je nekim istraživanjima utvrđeno da je fotodinamička inaktivacija jednako učinkovita, kako u inhibiciji osjetljivih tako i rezistentnih sojeva (47; 48), ovim radom pokazano je drukčije. Iako su sve testirane bakterije Gram – negativne, a samim time i prirodno otpornije na vanjske stresore, utvrđeno je da minimalne efektivne koncentracije hidrofilnog porfirina TMPyP3 ipak variraju među bakterijskim vrstama: MEK za otpornu *B. cepacia* i multirezistentni *P. aeruginosa* viši je od 100  $\mu\text{M}$  za razliku od osjetljivih bakterija izoliranih iz sirove otpadne vode gdje je MEK viši ili jednak 12  $\mu\text{M}$ . Mada utjecaj mehanizama rezistencije na uspješnost fotodinamičke inaktivacije nije detaljno istražen, pretpostavka je da otpornost bakterija ipak igra malu ulogu njihovoj zaštiti od ovakvog tretmana. Naime, neke prethodne studije ispitivale su razlike u fotoinaktivaciji otpornih sojeva bakterija naspram njihovih osjetljivih analoga čime su pokazale da su rezistentne bakterije, u usporedbi s prirodno osjetljivim bakterijama, značajno otpornije na fotodinamičku inaktivaciju (49; 50). S obzirom na nejasnu korelaciju bakterijske rezistencije i uspješnosti fotoinaktivacije, trebalo bi provesti daljnja istraživanja na tu temu. Govoreći o tome, potrebno je istaknuti interesantnu studiju u kojoj je ispitan, a i potvrđen snažniji fotodinamički učinak antimikrobne inaktivacije otpornih bakterija uz dodatak inhibitora efluks pumpi – poznatih čimbenika rezistencije (51).

Osim što je pokazano da minimalna efektivna koncentracija hidrofilnog porfirina TMPyP3 ovisi o mikroorganizmu na koji djeluje, ovim ispitivanjem također je utvrđeno da vrijeme ozračivanja znatno utječe na efikasnost fotodinamičke inaktivacije. Testiranje minimalne efektivne koncentracije spomenutog fotosenzibilizatora u uzorku sterilne otpadne vode, provedeno je u periodu ozračivanja od 10 i 30 minuta. Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da je TMPyP3 tijekom 30-minutnog tretmana ljubičastom UV lampom učinkovitiji pri znatno nižim koncentracijama naspram 10-minutnog zračenja. Primjerice, MEK za *B. cepacia* nakon 10 minuta ozračivanja je viši od 100  $\mu\text{M}$  dok je nakon 30 minuta ozračivanja minimalno 4 puta niži, odnosno iznosi 25  $\mu\text{M}$ . Iako je u prethodnoj studiji opisano da vrijeme ozračivanja ima zanemariv utjecaj na fotoefekt (52), navedeni rezultat može se objasniti činjenicom da je tijekom dužeg perioda ozračivanja puno duža i interakcija svjetlosti i fotosenzibilizatora zbog čega se posljedično stvara više kisikovih radikala koji uništavaju bakterijsku stanicu (53).

Na uspješnost fotodinamičke inaktivacije mikroorganizama također utječe i priroda medija u kojem se ona odvija. Usporedbom MEK vrijednosti ispitivanog porfirina između uzoraka sterilne vode iz slavine i sterilne otpadne vode, jasno je da je TMPyP3 znatno efikasniji u vodi iz slavine (npr. MEK za *P. putida* u sterilnoj otpadnoj vodi tijekom 10-minutnog ozračivanja viši je od 12,5  $\mu\text{M}$ , dok u sterilnoj vodi iz slavine pri istim uvjetima iznosi 0,098  $\mu\text{M}$ ). Slični rezultati prikazani su i prethodnim studijama. Tako je u istraživanju iz 2011. primjerice dokazano da je fotoinaktivacija bakterija u okolišnim vodama manje učinkovita od inaktivacije bakterijskih stanica u fosfatnom puferu (54). Osim toga, autori rada iz 2002. godine, prilikom ispitivanja fotoinaktivacije helminata u otpadnim voda, zaključuju da je prisustvo suspendiranih tvari jedan od najvažnijih faktora koji utječu na efikasnost navedene metode (55). Naime, poznato je da je fotodinamička inaktivacija mikroorganizama u okolišnim vodama s visokom koncentracijom suspendiranih i otopljenih tvari manje učinkovita od čistih vodenih suspenzija. Iako je u ovom istraživanju otpadna voda prije sterilizacije podvrgnuta filtraciji (čime je



uklonjen dobar dio krutih tvari), suspendirane i otopljene čestice ostale su netaknute čime su vjerojatno omele interakciju zračenja s fotosenzibilizatorom i u konačnici umanjile fotodinamički efekt (1).

### 5.3. Fotoinaktivacijski test

Fotoinaktivacijski učinak TMPyP3 ispitan je na multirezistentnom *P. aeruginosa* u uzorcima vode iz slavine, filtrirane sterilne otpadne vode te sirove otpadne vode u vremenskim intervalima ozračivanja od 30, 60 i 90 minuta i koncentracijama TMPyP3 od 3, 125  $\mu\text{M}$ , 6, 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  i 25  $\mu\text{M}$ . Na slikama 16, 17 i 18 uočljivo je da efektivnost ispitivanog porfirina raste s povećanjem koncentracije što je i logično budući da se pri većoj koncentraciji fotosenzibilizatora stvara i veća količina kisikovih radikala koji su onda sposobni uništiti veći broj bakterijskih stanica.

Osim koncentracije, u navedenim grafičkim prikazima vidljivo je također da nakon 90 minuta ozračivanja dolazi do potpune ili gotovo potpune inaktivacije *P. aeruginosa* neovisno o koncentraciji, što potvrđuje činjenicu povezanosti vremena ozračivanja i uspješnosti fotoinaktivacije opisane u prethodno objašnjenim rezultatima MEK ispitivanja. Takvo saznanje iznimno je obećavajuće budući da bi u tretiranju velikih količina otpadnih voda, produljenje vremena ozračivanja znatno smanjilo ekonomske, ali i ekološke štete koje bi potencijalno nastale kao posljedica upotrebe prekomjernih količina fotosenzibilizatora.

Ispitivanjem minimalne efektivne koncentracije, već je uočeno da efikasnost TMPyP3 ovisi o prirodi medija u kojem se proces odvija. Navedena činjenica uočena je tako i na ispitivanju fotoinaktivacije, a prikazana je slikama 19, 20 i 21. I u ovom slučaju, fotodinamička inhibicija multirezistentnog *P. aeruginosa* najučinkovitija je u čistoj, sterilnoj vodi iz slavine zbog odsustva suspendiranih i otopljenih čestica (postotak inhibicije je 100%) (1). S druge strane, sterilna otpadna i sirova otpadna voda obiluju suspendiranim i otopljenim tvarima zbog čega je

prodor svjetlosti u medij ograničen, a samim time i fotoefekt slabiji (postotak inhibicije multirezistentnog *P. aeruginosa* nakon 30 minuta ozračivanja u sterilnoj je otpadnoj vodi  $\approx$  92%, a u sirovoj otpadnoj vodi  $\approx$  85%), što je također objašnjeno prethodno navedenim studijama. Osim suspendiranih tvari, u sirovoj otpadnoj vodi fotoinaktivacija multirezistentnog *P. aeruginosa* dodatno je limitirana prisustvom drugih bakterija jer će se na njihovu inaktivaciju „potrošiti“ dio nastalih radikala dovodeći tako do nepotpune inaktivacije spomenute bakterije.

Premda povezanost između mehanizama rezistencije i uspješnosti fotodinamičke inaktivacije nije detaljno ispitana, iz slike 23 jasno je da postoje značajne razlike u inhibiciji rezistentnog soja *P. aeruginosa* i bakterija koje se nalaze u komunalnoj otpadnoj vodi što je također potvrđeno i rezultatima ispitivanja minimalne efektivne koncentracije TMPyP3 na inaktivaciju različitih bakterijskih vrsta. Daljnja istraživanja u tom smjeru mogla bi dovesti do intrigantnih saznanja, a samim time i do afirmacije fotodinamičke inaktivacije u svijetu ekologije. Osim spomenutih mehanizama otpornosti, odgovor na manji postotak inhibicije multirezistentnog *P. aeruginosa* ( $\approx$ 89% nakon 30 minuta ozračivanja) u odnosu na ostale bakterije iz sirove otpadne vode ( $\approx$ 99% nakon 30 min ozračivanja) mogao bi ležati u prisustvu Gram – pozitivnih bakterija. Istraživanjem iz 2009. godine utvrđeno je da su, pri istim uvjetima, Gram – pozitivne bakterije puno osjetljivije na fotoinaktivacijske procese od Gram – negativnih bakterija (56). Razlog tome je u već spomenutoj vanjskoj ovojnici bakterijske stanice koja je kod Gram – pozitivnih bakterija puno osjetljivija na vanjske stresore. Osim različitosti u građi vanjske ovojnice, uspješnost fotoinaktivacije ovisi i o prirodi odabranog porfirina. Prethodnim istraživanjem ispitan je utjecaj naboja fotosenzibilizatora na fotoinaktivaciju bakterija te je zaključeno da su tetrakationski porfirini podjednako efikasni i u inaktivaciji Gram – pozitivnih i Gram – negativnih vrsta (3). Navedena činjenica mogla bi, stoga, otvoriti vrata tetrakationskom porfirinu TMPyP3 u široj primjeni tijekom fotodinamičke inaktivacije različitih bakterijskih

vrsta uključujući i one rezistentne koje postaju sve otpornije na konvencionalne metode dezinfekcije.

## 6. Zaključci

Ispitivanjem fotoinaktivacijske učinkovitosti hidrofilnog kationskog porfirina TMPyP3 dobiveni su rezultati na temelju kojih su doneseni sljedeći zaključci:

1. učinkovitost kationskog porfirina TMPyP3 raste s povećanjem vremena ozračivanja,
2. uspješnost fotoinaktivacije kationskim porfirinom TMPyP3 ovisi o mehanizmima rezistencije i karakteristikama tretiranog bakterijskog soja,
3. uspješnost fotoinaktivacije kationskim porfirinom ovisi o prirodi medija u kojem se odvija,
4. suspendirane i otopljene tvari iz otpadne vode ometaju interakciju zračenja i kationskog porfirina TMPyP3,
5. učinkovitost kationskog porfirina TMPyP3 manja je u sirovoj otpadnoj vodi nego u sterilnoj otpadnoj vodi zbog prisustva drugih mikroorganizama,
6. niske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 u sirovoj otpadnoj vodi inhibiraju više od 80 % bakterijskih stanica multirezistentnog *P. aeruginosa*,
7. uvođenje fotodinamike u svijet ekologije, posebice u području otpadnih voda, moglo bi riješiti problem prisustva rezistentnih bakterijskih sojeva.

## 7. Literatura

1. **Bartolomeu M, Reis S, Fontes M i sur.** *Photodynamic Action against Wastewater Microorganisms and Chemical Pollutants: An Effective Approach with Low Environmental Impact.* Water, 2017, Vol. 9.
2. **Ergaieg K, Seux R. i sur.** *A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue.* Desalination, 2009, Vol. 246 (1-3), pp. 353-362.
3. **Alves, E., Costa, L., Carvalho, C.M. i sur.** *Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins.* BMC Microbiology, 2009, Vol. 9(70)
4. **Carvalho C. M. B, Gomes A, Fernandes S i sur.** *Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial  $\beta$ -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process.* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2007, Vol. 88 (2-3), pp. 112-118.
5. *Zakon o vodama (NN 66/2019).*
6. **M, Perišić.** Modeliranje pokazatelja onečišćenja komunalne otpadne vode grada Splita. *Doktorski rad.* Split : Sveučilište u Splitu, Kemijsko - tehnološki fakultet, 2012.
7. **H., Murphy.** Persistence of Pathogens in Sewage and Other Water Types. [book auth.] Jiménez-Cisneros B Rose J.B. *Global Water Pathogen Project.* s.l. : Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
8. **A, Crepulja.** Optimizacija parametara fizikalno - kemijskih procesa u obradi realnih otpadnih voda. *Završni rad.* Rijeka : Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, 2018.
9. **B., Tušar.** *Pročišćavanje otpadnih voda.* Zagreb : Kigen i Geotehnički fakultet, 2009.
10. Waterleau. *Municipal wastewater treatment.* Dostupno na: <https://www.waterleau.com/en/references/municipal-wastewater-treatment-fez>. Pristupljeno: travanj 2020.
11. **M. Abram, I. Škrobonja, D. Ambrožić i sur.** *ESKAPE – bakterije koje su uzburile svijet.* Medicina Fluminensis, 2018, Vol. 54 (3), pp. 242-253.
12. **Aeschlimann, Jeffrey R.** *The Role of Multidrug Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of Pseudomonas Aeruginosa and Other Gram-Negative Bacteria. Insights From the Society of Infectious Diseases Pharmacists.* Pharmacotherapy, 2003, Vol. 23 (7), pp. 916-924.
13. **K., Poole** *Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance.* Journal of Applied Microbiology, 2002, Vol. 92(1), pp. 55-64.
14. **Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M.** *Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms.* International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, Vol. 35(4), pp. 322-332.
15. Photodynamic Inactivation, Solution to Reduce Bacterial Biofilm. *Unair news.* Dostupno na: <http://news.unair.ac.id/en/2019/07/19/photodynamic-inactivation-solution-to-reduce-bacterial-biofilm/>. Pristupljeno : travanj 2020.
16. **Volkman H, Schwartz T, Bischoff P i sur.** *Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (Taqman).* Journal of Microbiological Methods, 2004, Vol. 56, pp. 277-286.

17. **Rosenberg Goldstein R. E, Micallef S. A, Gibbs S. G i sur.** *Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse.* Science of The Total Environment, 2014, Vols. 466-467, pp. 404-411.
18. **Franz E, Veenman C, van Hoek A et al.** *Pathogenic Escherichia coli producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases isolated from surface water and wastewater.* s.l. : Scientific Reports, 2015. 14372 (2015).
19. **Igbinosa I, Okoh A.** *Antibiotic Susceptibility Profile of Aeromonas Species Isolated from Wastewater Treatment Plant.* The Scientific World Journal, 2012, Vol. 2012.
20. **Hrenović J, Ivanković T, Iveković D i sur.** *The fate of carbapenem-resistant bacteria in a wastewater treatment.* Water Research, 2017, Vol. 126, pp. 232-239.
21. **Drenjančević D, Vraneš J.** *Pseudomonas, acinetobakter i srodne bakterije.* [ed.] Kalenić S. *Medicinska mikrobiologija.* Zagreb : Medicinska naklada, 2013, pp. 214-226.
22. **Taek Oh W, Kim J. H, Jun J.W i sur** *Genetic Characterization and Pathological Analysis of a Novel Bacterial Pathogen, Pseudomonas tructae, in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)* Microorganisms, 2019, Vol. 7 (432).
23. **Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S.** *Pseudomonas aeruginosa.* [ed.] Andrew Sails. *Molecular Medical Microbiology.* Massachusetts, SAD : Academic Press, 2014.
24. Chromagar. Dostupno na: <http://www.chromagar.com/food-water-chromagar-pseudomonas-ps820-ps822-focus-on-pseudomonas-36.html#.Xs02j0QzbIV>. Pristupljeno: travanj 2020.
25. **Gužvinec M, Butić I, Jelić M i sur.** *Rezistencija na antibiotike u bakterije.* Croatian Journal of Infection, 2012, Vol. 32(2), pp. 71-80.
26. **Driscoll J. A, Brody S. L, Kollef M. H.** *The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections.* Drugs, 2007, Vol. 67(3), pp. 351-368.
27. Primeur weekly! magazine. Dostupno na: <http://primeurmagazine.com/weekly/AE-PR-01-18-37.html>. Pristupljeno: travanj 2020.
28. **Hamblin M, R.** *Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes.* Current Opinion in Microbiology, 2016, Vol. 33, pp. 67-73.
29. **Plaetzer K i sur.** *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects.* Lasers in Medical Science, 2009, Vol. 24, pp. 259-268.
30. **de Freitas L, Hamblin M. R.** *Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes.* [ed.] Grumezescu A. M. *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy.* Amsterdam : Elsevier, 2016.
31. **Ghorbani J i sur.** *Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview.* Laser Therapy, 2018, Vol. 27(4), pp. 293-302.
32. **Abrahamse H, Hamblin M. R** *New photosensitizers for photodynamic therapy.* Biochemical Journal, 2016, Vol. 473, pp. 347-364.
33. **Alvesa E, Faustino M, Neves M i sur.** *Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope.* Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry, 2015, Vol. 22, pp. 34-57.
34. Wikipedia. Dostupno na: <https://hr.m.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Porphyrin.svg>. Pristupljeno: svibanj 2020.

35. **Amos-Tautua B, Songca S, Oluwafemi O.** *Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy.* *Molecules*, 2019, Vol. 24(13)
36. **Demidova T, Hamblin M. R.** *Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation.* *Antimicrobial Agents Chemotherapy Journal*, 2005, Vol. 49(6), pp. 2329–2335.
37. **Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K i sur.** *The application of antimicrobial photodynamic therapy on S. aureus and E. coli using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin.* *Microbiological Research*, 2014, Vol. 169 (2-3), pp. 163-170.
38. **Dosselli R, Million R, Puricelli L i sur.** *Molecular Targets of Antimicrobial Photodynamic Therapy Identified by a Proteomic Approach.* *Journal of Proteomics*, 2012, Vol. 77, pp. 329-343.
39. **A., Kuznetsova N.** Sensitization of Singlet Oxygen Formation in Aqueous Media. [ed.] Ahsen V Nyokong T. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security.* Berlin, Njemačka : Springer, 2012.
40. **Bartolomeu M, Neves M.G, Faustino M, Almeida A.** *Wastewater chemical contaminants: remediation by Advanced oxidation processes.* *Photochemical and Photobiological Sciences* , 2018, Vol. 17(11), pp. 1573-1598.
41. **Dutikova Yu. V, Borisova O, Kaluzhny D.** *5,10,15,20-Tetra-(N-methyl-3-pyridyl)porphyrin destabilizes the antiparallel telomeric quadruplex d(TTAGGG)<sub>4</sub>.* *Molecular Biology*, 2010, Vol. 44, pp. 929-937.
42. Microbe online. Dostupno na: <https://microbeonline.com/pour-plate-method-principle-procedure-uses-dis-advantages/>. Pristupljeno: svibanj 2020.
43. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/20).
44. **Vital M, Stucki D, Egli T, Hammes F.** *Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, Vol. 76 (19), pp. 6477-6484.
45. **Lewenza S i sur.** *Pseudomonas aeruginosa displays a dormancy phenotype during long-term survival in water.* *PLOS ONE* , 2018, Vol. 13(9).
46. **J., Falkinham.** *Common Features of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens.* *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, Vol. 12 (5), pp. 4533–4545.
47. **Soncin M i sur.** *Approaches to selectivity in the Zn (II) - phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant Staphylococcus aureus .* *Photochemistry and Photobiology*, 2002, Vol. 10, pp. 815-819.
48. **Tang H. M, Hamblin M. R, Yow C. M.** *A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens.* *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2007, Vol. 13, pp. 87-91.
49. **Grinholc M i sur.** *Multiresistant Strains Are as Susceptible to Photodynamic Inactivation as Their Naïve Counterparts: Protoporphyrin IX-Mediated Photoinactivation Reveals Differences Between Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus Strains.* *Photomedicine and Laser Surgery*, 2014, Vol. 3(32) pp. 121-129.
50. **Caires C i sur.** *Photoinactivation of mcr-1 positive Escherichia coli.* *Laser Physics Letter*, 2017, Vol. 15(1).

51. **Tegos G i. sur.** *Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, Vol. 52 (9), pp. 3202-3209.
52. **Hessling M, Spellerberg B, Hoenes K** *Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths – a review on existing data,* FEMS Microbiology Letters, 2017, Vol. 364(2).
53. **Prates R i sur.** *The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells .* The International Society for Optical Engineering, 2008, Vol. 6846.
54. **Arrojado C. i. sur.** *Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems.* Photochemistry and Photobiology, 2011, Vol. 10, pp. 1691-1700.
55. **Jemli M. i sur.** *Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers.* Journal of Environmental Sciences, 2012, Vol. 4(4), pp. 511-516.
56. **Maclean M. i sur.** *Inactivation of Bacterial Pathogens following Exposure to Light from a 405-Nanometer Light-Emitting Diode Array.* Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75(7), pp. 1932-1937.



## Životopis

Rođena sam 09. 01. 1997. u Puli gdje sam završila osnovnu školu, a potom i Opću gimnaziju. Nakon srednjoškolskog obrazovanja s uspjehom sam položila državnu maturu i 2015. godine upisala Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

U rujnu 2018. godine obranila sam završni rad pod nazivom „Optimizacija parametara fizikalno – kemijskih procesa u obradi realnih otpadnih voda" pod mentorstvom doc. dr. sc. Mirne Petković Didović i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Marinom Tota te stekla akademski naziv „Sveučilišna prvostupnica sanitarnog inženjerstva".

Iste godine, kao najbolja studentica Preddiplomskog studija Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci upisala sam i Diplomski studij Sanitarnog inženjerstva. Tijekom spomenutog dvogodišnjeg diplomskog studija, sudjelovala sam na 2. Studentskom kongresu zaštite zdravlja – Sanitas 2019. poster prezentacijom prethodno navedene teme završnog rada. Osim toga, bila sam aktivna i na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju gdje sam kao demonstrator na kolegijima „Napredna primjena računala u ekosustavima" i „Fizikalna kemija" prenosila stečena znanja i vještine mlađim kolegama.