

Utjecaj ozona na legionele

Dobrić, Dorotea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:184:400297>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dorothea Dobrić
UTJECAJ OZONA NA LEGIONELE
Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dorothea Dobrić
UTJECAJ OZONA NA LEGIONELE
Završni rad

Rijeka, 2022.

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

Završni rad obranjen je dana DD/09.2022., na Sveučilištu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

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

Rad ima 34 stranice, 11 slika, 9 grafova i 22 literaturna navoda.

SAŽETAK

Legionella pneumophila ubikvitarna je molekula kojoj vodovodna mreža, bazeni, sustavi za grijanje, kondicioniranje i ventilaciju zraka predstavljaju povoljna staništa za rast i razvoj te su ključna izvorišta infekcije. Širi se aerosolom te uzrokujući legionarsku bolesti i pontijačku groznicu predstavlja znatan javnozdravstveni problem. Njezina tvorba biofilma i mogućnost reprodukcije unutar protozoa pružaju joj zaštitu i otpornost na dezinfekcijska sredstva. Svrha provedenog istraživanja je prikazati utjecaj ozona na *L. pneumophila*. Korištene su tri različite vrste materijala na kojima se kultivirao biofilm uključujući polistiren, inox metal i keramičke pločice. Dodatno, utjecaj ozona na formaciju biofilma na polistirenu promatran je uz prisutnost bujona koji je obogaćen L-cisteinom i željezo (III) nitratom. Posljednje, utjecaj ozona ispitan se na slobodnim bakterijama *L. pneumophila* u vodi.

Kultivacija biofilma za svaki pojedini materijal odrađena je tijekom 24h i 5 dana. Način tretman za oba vremenska perioda je jednak. Materijali su isprani sa primjerenom otopinom i stavljeni na sušenje u periodu od 5 minuta. Zatim su izloženi ozonu kojeg je ozonizator upuhivao 38s tijekom sat vremena. Potom su tretirani u ultrazvučnoj kupelji 1 minutu te je zatim rađena serija deseterostrukih razrjeđenja. Nakon nasađivanja na BCYE agar i kultivacije na $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ tijekom 4 dana brojanjem kolonija određen je CFU/mL. Jedino su slobodne bakterije u vodi odmah pri pripremi suspenzije tretirane ozonom bez prethodne 24-satne ili petodnevne kultivacije biofilma. Za svaki tretirani materijal i slobodne planktonske bakterije usporedno je pripremljen kontrolni uzorak koji je podlegnut jednakom tretmanu, izuzev ozonizacije.

Inhibitorno djelovanje ozona dokazano je na polistirenu, inoks metalu i keramičkim pločicama. Nakon tretmana i inkubacije agara nije uočen porast bakterija te zaključujemo da je djelovanje ozona bilo sa 100%-tnom učinkovitosti. Na slobodne planktonske bakterije *L. pneumophila* ozon nije imao očekivani učinak te je njegovo djelovanje bilo zanemarivo. Ozon također nije spriječio formaciju biofilma u bujonu obogaćenog L-cisteinom i željezo (III) nitratom.

Ključne riječi: *Legionella pneumophila*, biofilm, ozon

SUMMARY

Legionella pneumophila is an ubiquitous molecule to which the water supply network, swimming pools, heating, air conditioning and ventilation systems represent favorable conditions for growth and development and are key sources of infection. It is spread by aerosol and, causing Legionnaires' disease and Pontiac fever, represents a significant public health problem. Its biofilm formation and the ability to reproduce within protozoa provide protection and resistance to disinfectants. The purpose of the conducted research is to show the impact of ozone on *L. pneumophila*. Three different types of biofilm cultivation materials were used including polystyrene, stainless steel and ceramic tiles. Additionally, the effect of ozone on the formation of biofilm on polystyrene was observed in the presence of broth enriched with L-cysteine and iron (III) nitrate. Finally, the impact of ozone was tested on free bacteria *L. pneumophila* in water.

Biofilm cultivation for each individual material was carried out over 24 hours and 5 days. The method of treatment for both time periods is the same. The materials were washed with an appropriate solution and left to dry for 5 minutes. Then they are exposed to ozone, which was blown by the ozonizer for 38 seconds for an hour. They were then treated in an ultrasonic bath for 1 minute and then a series of tenfold dilutions was made. After inoculation on BCYE agar and cultivation at $(35\pm 1)^{\circ}\text{C}$ for 4 days, CFU/mL was determined by colony counting. Only free planktonic bacteria were treated with ozone immediately before preparation of the suspension without prior 24-hour or five-day biofilm cultivation. For each treated material and free planktonic bacteria, a control sample subjected to the same treatment, with the exception of ozonation, was comparatively prepared.

The inhibitory effect of ozone has been proven on polystyrene, stainless steel and ceramic tiles. After the treatment and incubation of the agar, no growth of bacteria was observed, and we conclude that the effect of ozone was 100% effective. Ozone did not have the expected effect on the free planktonic bacteria *L. pneumophila* and its effect was negligible. Ozone also did not prevent biofilm formation in broth enriched with L-cysteine and iron (III) nitrate.

Key words: *Legionella pneumophila*, biofilm, ozone

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Legionela spp.....	1
1.1.1 Patogeneza	2
1.1.2 Klinička slika	3
1.1.3. Epidemiologija.....	4
1.1.4. Prevencija.....	5
1.2 Biofilm.....	5
1.1.1 Formacija biofilma.....	6
1.2.2 Detekcija kvoruma	7
1.2.3 Legionella i biofilm.....	8
1.2 Ozon.....	9
2 CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	12
3 MATERIJALI I POSTUPCI	13
3.1 Materijali	13
3.1.1 Laboratorijski pribor i posuđe	13
3.1.2. Laboratorijski uređaji.....	13
3.1.3. Kemikalije i mikroorganizmi	13
3.2 Postupci	14
3.1 Priprema planktonskih legionela u vodovodnoj vodi	14
3.2 Priprema biofilma u bujonu	15
3.3 Priprema biofilma na polistirenu	17
3.4 Priprema biofilma na nehrđajućem čeliku (inox)	18
3.5 Priprema biofilma na keramičkim pločicama.....	19
4 REZULTATI.....	20
4.1 Utjecaj ozona na planktonske legionele u vodovodnoj vodi	20
4.2 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele u bujonu i na polistirenu	21
4.3 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele na polistirenu	22
4.4 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele na nehrđajućem čeliku (inox)	24
4.5 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele na keramičkim pločicama.....	25
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK	30
7. LITERATURA.....	31
8. ŽIVOTOPIS	33

1. UVOD

1.1 Legionela spp.

Porodica *Legionellaceae*, točnije rod *Legionella* obuhvaća ubikvitarne bakterije koje optimalno obitavaju u vodenim sustavima ili vlažnoj zemlji. Kretanje joj omogućava posjedovanje jedne do dvije flagele, a tijelo obloženo pilima pruža bakterijama čvrstu adherenciju na površine. Ove aerobne, gram–negativne bakterije na razini cijele porodice karakterizira potreba za L-cisteinom i željeznim solima čije su im nutritivne vrijednosti od životne važnosti. Bakterije su nesporogene te su zaštitu od nepovoljnih uvjeta osigurale sposobnošću naseljavanja i razmnožavanja unutar protozoa i biofilma. U okolišu lako preživljavaju i razmnožavaju se, ali zbog navedenih nutritivnih potreba kultivacija u kontroliranim uvjetima poput laboratorija je zahtjevnija nego kod ostalih bakterija. Koristi se BCYE agar (eng. Buffered charcoal yeast extract agar) s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom. Agar sadrži L-cistein, a kao izvori energije također su prisutni serin i treonin. Aktivni ugljen bitan je za detoksikaciju tvari nastalih razgradnjom masnih kiselina i radikala kisika, a ujedno sprječava oksidaciju cisteina. Kvašćev ekstrakt sadržavajući purinske i pirimidinske derivate osigurava glavninu nutrijenata. Bakterije rastu u malim, okruglim, glatkim i bijelim kolonijama koje su na agaru vidljive nakon 4-5 dana. Uzgajaju se u inkubatorima na optimalnoj temperaturi rasta od 37°C iako je raspon temperature u okolišnim uvjetima veći te obuhvaća temperature od 25-45°C. Iako je preživljavanje izvan navedenih temperaturnih granica moguće, bakterije se neće razmnožavati. Oportunistički su patogeni vodoopskrbnih sustava što predstavlja zdravstveni rizik za čovjeka. (1)



Slika 1. Kultivacija *L. pneumophila* na BCYE agaru

Legionella je izvan znanstvenog konteksta najpoznatija po svojoj patogenezi, stanjima poput legionarske bolesti i pontijačke groznice. Od dosad otkrivenih pedeset vrsta njih dvadeset potencijalno uzrokuje infekcije kod čovjeka. Za 90% humanih infekcija odgovorna je *L. pneumophila*, a prema učestalosti slijede *L. micdadei* i *L. bozemanii*. (1)

Izvor infekcije najčešće su klima uređaji, rashladni tornjevi, tuševi, ovlaživači zraka i drugi sustavi za distribuciju vode. Prijenos se odvija putem kontaminiranog aerosola to jest udisanjem istog ili aspiracijom kontaminirane vode. Direktna konzumacija kontaminirane vode ili kontakt sa oboljelom osobom ne predstavljaju izvore infekcije. Zdravstveno stanje zaražene osobe i infektivna doza uvelike određuju oblik i razvoj same bolesti.

Osim navedenih vodenih izvora kontaminacije, jedan od izvora je i vlažna zemlja u kojoj obitava *L. longbeache*, iako uzrokuje 1% sveukupnih infekcija, najčešći je uzrok na području Australije i Novog Zelanda sa prevalencijom od 60%. (2)

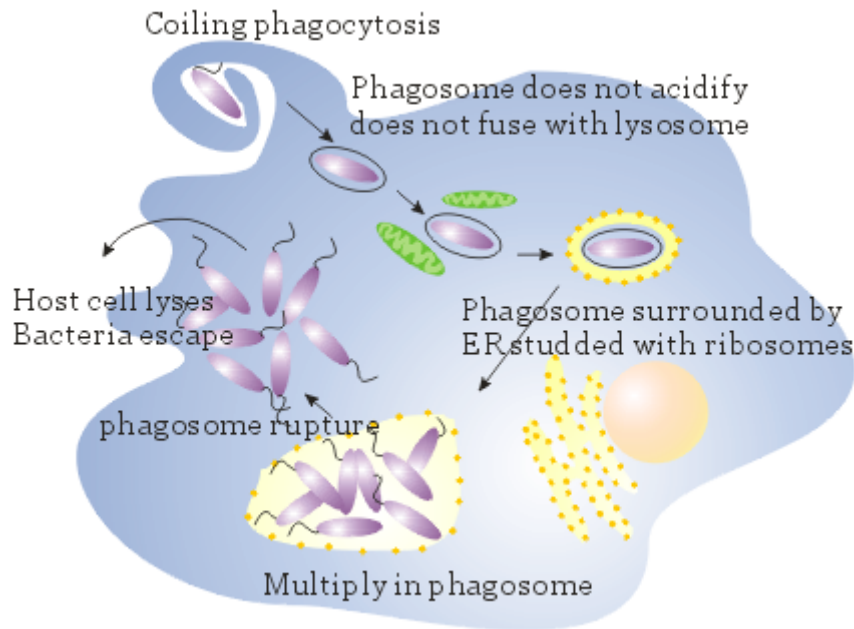
1.1.1 Patogeneza

Uz već spomenuta vodena područja *L. pneumophila* obitava i u antropogenim vodenim sustavima koja predstavljaju kritičnu točku za pojavu oportunističkih infekcija. U takvim područjima dolazi do formacije biofilma, zajednice mikroorganizama, među kojima su i patogene vrste roda *Legionella*. Upravo je prevencija formacije biofilma kritična mjera jer je takvu zajednicu mikroorganizama teško eliminirati. Faktori koji povećavaju rizik formacije biofilma su nutrijenti iz vode, stagnacija vode u cijevima ili slabiji protok vode. Ovakvi uvjeti najčešće nastaju u hotelima koji rade sezonski čiji vodeni sustavi osiguravaju pogodno stanište za formaciju biofilma. (3)

Izvor većine infekcija pronalazi se u sustavima čija je temperatura veća od temperature okoliša. Rashladni tornjevi, vruće masažne kade, bazeni i klima uređaji glavni su izvor bakterija koje zatim šireći se aerosolom, zrakom, ulaze u respiratorni sustav čovjeka i uzrokuju infekciju.

Put bakterije nakon ulaska u čovjeka uspoređen je s njihovim načinom razmnožavanja u amebama. Naime, bakterije koloniziraju stanične, alveolarne, makrofage te se oko bakterije formira fagosom, vezikula koja se stvara oko čestice unesene fagocitozom. Formirani fagosom prekriven je glatkom ovojnicom koja potječe s endoplazmatskog retikuluma stanice domaćina. Na taj način bakterije se štite od imunološkog sustava stanice domaćina i razmnožavaju se kako

bi nakon puknuća stanice, uslijed povećanog broja razmnoženih bakterija, oslobođene bakterijske stanice inficirale preostale stanice domaćina. (3)



Slika 2. Put ulaska bakterije u stanicu, razmnožavanje i put izlaska iz stanice

Preuzeto sa: [Legionella - microbewiki \(kenyon.edu\)](http://Legionella-microbewiki.kenyon.edu)

1.1.2 Klinička slika

Legioneloza je naziv koji obuhvaća sve infekcije uzrokovane Legionellama, a potječe od epidemije koja je zadesila američke legionare 1976. godine u Philadelphiji te kod preko 200 prisutnih uzrokovala pneumoniju. Biopsijom plućnog tkiva preminulih legionara izolirana je gram-negativna bakterija koja je prema spomenutoj epidemiji nazvana *Legionella*, a bolest koju uzrokuje infekcija bakterijom legionarska bolest. Proučavajući bakteriju i njene simptome uspostavilo se da je do epidemija već dolazilo u prošlosti, točnije obuhvatila je psihijatrijsku bolnicu u Washingtonu i zdravstvenu ustanovu u Pontiac-u deset godina prije. (4) Zanimljivo, ljudi zaraženi u Pontiac-u nisu pokazivali znakove pneumonije već samo povišene tjelesne temperature te su takvi simptomi obilježeni kao lakši oblik infekcije još zvan pontijačka groznica.

Dva navedena oblika infekcija predstavljaju dvije različite kliničke slike do kojih dolazi nakon infekcije Legionellom. Glavna razlika je u težini simptoma, tako legionarska bolest uz prisustvo pneumonije i dužeg inkubacijskog perioda predstavlja teži oblik bolesti dok pontijačku groznicu izostankom pneumonije i kraćim inkubacijskim razdobljem svrstavamo pod lakše kliničke oblike bolesti.

Period inkubacije pontijačke groznice je jedan do dva dana, a bolest karakterizira povišena temperatura, bolovi u mišićima, glavobolja, a kod pojedinaca se mogu javiti i probavne tegobe. Upala pluća se ne razvija kod ovog oblika infekcije. Prema simptomima, pontijačka groznica, uvelike nalikuje gripi te se upravo zato često tretira kao gripa i prolazi neidentificirano. (5)

Legionarska bolest podrazumijeva atipičnu pneumoniju koja može varirati od srednje upale sve do teške pneumonije koja zahtijeva hospitalizaciju. Simptomi se počnu javljati nakon dva do četrnaest dana inkubacije. Simptomi su brojniji te obuhvaćaju; pneumoniju, povišenu temperaturu, kašalj, zimicu, neurološke simptome, bolove u prsima, mučninu i povraćanje. Oporavak je dugotrajan te brojni pacijenti nakon ozdravljenja i dalje pokazuju znakove iscrpljenosti, neuroloških i neuromuskulturnih smetnji. (5)

1.1.3. Epidemiologija

Legionella infekcije pokazuju sezonsku pojavnost, veću incidenciju ljeti i u ranu jesen te također kasno proljeće na području Australije i Novog Zelanda što se povezuje sa specifičnom pojavom *L. longbeache*. U ljetnom vremenskom periodu povišene su temperature zraka i relativna vlažnost zraka što predstavlja idealne uvjete za rast i razmnožavanje bakterija. (6)

Bolest se prikazala iznimno rijetkom kod djece, a raspodjela s obzirom na spol kod odrasli je podjednaka. Rizične skupine predstavljaju pušači, imunokompromitirani te dijabetičari.(6) Najveća incidencija prisutna je kod putnika s naglaskom na kruzere koji predstavljaju neposrednu opasnost za veliku koncentraciju ljudi na malom području. (7)

U Hrvatskoj se, u pravilu, legioneloze pojavljuju sporadično, rijetko u obliku epidemija zahvaljujući pouzdanim protuepidemijskim mjerama koje se provode, a u nadležnosti su epidemioloških odjela Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i županijskih zavoda za javno zdravstvo. Prijavljeni slučajevi na godišnjoj razini ne prelaze 50 oboljelih. (8)

1.1.4. Prevencija

Bolesti uzrokovane rodom *Legionella* smatraju se generalno preventivnim uz pravilnu i pravovremenu primjenu mjera za kontrolu i suzbijanje. Propisivanjem mjera i naputaka u borbi protiv infekcija bavi se Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Dva kritična faktora koji predstavljaju pogodne uvjete za razvoj i razmnožavanje bakterija su prigodna, odgovarajuća temperatura i stagnacija vode.

Glavni način prevencije jest onemogućavanje razvitka spomenutih pogodnih uvjeta. Zato su ustanovljena pravila za održavanje vode odgovarajuće temperature to jest da temperatura tople vode ne smije biti niža od 50°C te jednako tome temperatura hladne vode ne smije biti viša od 20°C. Osiguravanje redovitog protoka vode kroz cijevi i redovito čišćenje mrežica na slavinama i rozeta na tuševima osnovne su mjere koje onemogućavaju formaciju biofilma. Također, redovito higijensko održavanje sustava baziranih na vodi, posebice klima uređaja, smanjuje rizik od infekcije.

Veliki kompleksi poput hotela koji rade sezonski predstavljaju svojevrsnu opasnost od izbijanja infekcije radi duže stagnacije vode u cijevima. Skladno tome prije otvorenja takvih kompleksa provodi se pasterizacija pri temperaturi od 70-90°C ili hiperklorinacija vode. (9)

1.2 Biofilm

Bakterije se u prirodi mogu kretati slobodno kao pojedinačne stanice putujući kroz tekući medij. Tada su one klasificirane kao planktonski organizmi, ali također mogu biti organizirane u sesilne zajednice – biofilm. Biofilm je jednostavno rečeno zajednica bakterija, algi, protozoa i drugih mikroorganizama međusobno vezanih izvanstaničnim matriksom na površini materijala. Biofilm se može javiti na svakoj granici vode i zraka adhezijom mikroorganizama na materijal. (1)

Formacija biofilma sastoji se od 4 specifična stadija:

1. Inicijalno pričvršćivanje mikroorganizama na površinu
2. Formacija mikrokolonija
3. Sazrijevanje biofilma
4. Širenje zrelih stanica biofilma

Formiranje biofilma zahtjeva od bakterija produkciju adhezina i izvanstaničnog matriksa koji ih međusobno povezuju unutar biofilma, omogućavaju komunikaciju između stanica i služe kao zaštita. (10)

Dostupnost hranjivih tvari, temperatura, pH i brojni drugi čimbenici diktiraju hoće li se i koje vrste bakterija vezati za površinu. Na primjer, *L. pneumophila* će biofilm formirati u većini uvjeta, dok će *E. coli* formaciju biofilma vršiti u trenutku nedostatka hranjivih tvari kako bi osigurala svoj opstanak. Osim nedostatka nutrijenata bakterije mogu formirati biofilm radi povećanja svoje mikrobne otpornosti. (11,12)

1.1.1 Formacija biofilma

Prianjanje bakterija na površinu može se podijeliti u dvije faze; reverzibilnu i ireverzibilnu. Hoće li bakterija inicijalno prionuti uz površinu ovisi o već navedenim nutrijentima to jest nedostatku istih, temperaturi, pH. Bakterije izlučuju adhezine kako bi se vezale za površinu i međusobno za druge bakterije. Ovakva vrsta veze između bakterije i površine je reverzibilna no vezanje za druge bakterije pomoću adhezivnih organela poput flagela i pila naziva se ireverzibilno vezanje jer iz takve zajednice bakterija više ne može izaći. (12)

Nakon kontakta bakterijskih stanica dolazi do promjene u genskoj ekspresiji i proizvodnje izvanstaničnog matriksa koji imobilizira i povezuje stanice unutar biofilma. Matriks sadrži polisaharide, proteine, nukleinske kiseline i lipide koji su ključni za održavanje strukture i normalne funkcije biofilma. Strukturni proteini stabiliziraju strukturu biofilma dok enzimi razgrađujući polisaharide oslobađaju potrebnu energiju. (12)

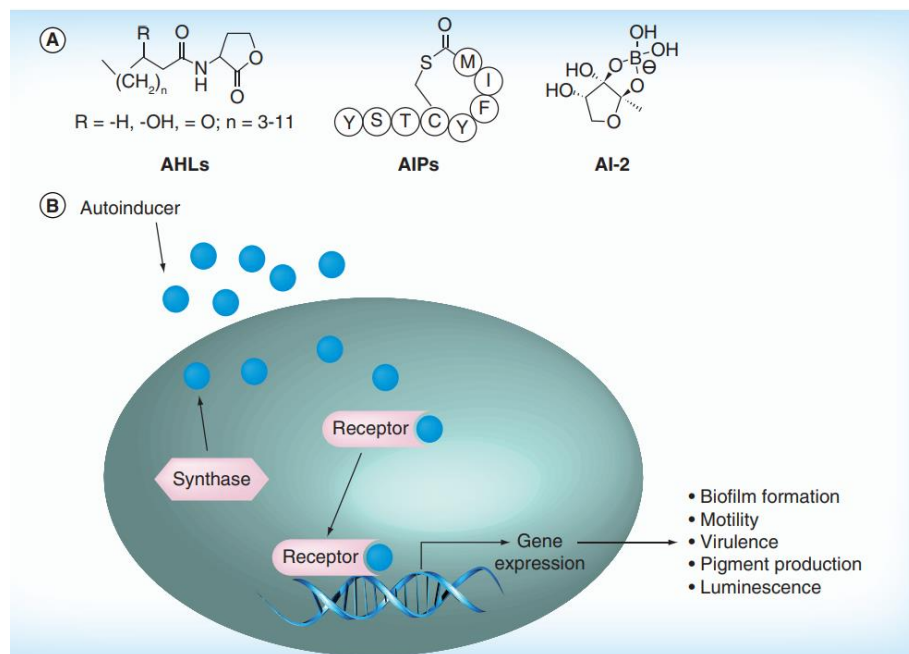
Tijekom sazrijevanja biofilma dolazi do konstantne promjene u njegovoj strukturi, a samim time u ekspresiji gena bakterija koje su podložene stalnoj redistribuciji.

Bakterije se planktonskom načinu života vraćaju radi ponovne uspostave povoljnih uvjeta. Da bi stanice bile u mogućnosti napustiti biofilma izvanstanični matriks se mora razgraditi što se postiže lučenjem enzima.

1.2.2 Detekcija kvoruma

Detekcija kvoruma (eng. quorum sensing) oblik je komunikacije između stanica i omogućava im održavanje višestanične zajednice koju tvore unutar biofilma.(1) Komunikacija se odvija otpuštanjem malih signalnih molekula koje su specifične za gram-negativne i gram-pozitivne bakterije. Medijatori komunikacije gram-negativnih bakterija su signalne molekule N-acil-homoserinski laktoni (AHL) dok kod gram-pozitivnih istu funkciju obavljaju mali ili modificirani peptidi. Pojedinačne signalne molekule služe kao komunikatori i gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija.(12)

Otpuštene signalne molekule vežu se na receptor te na taj način induciraju ili represiraju ekspresiju ciljanog gena bakterije. Komunikacija bakterija unutar biofilma omogućava regulaciju ekspresije gena, izlučivanje virulentnih faktora, formaciju biofilma, antimikrobnu rezistenciju i brojne druge funkcije bez kojih opstanak biofilma kao zajednice ne bi bio moguć. (12)



Slika 3. Detekcija kvoruma. Vezanje signalnih molekula na receptor i genska ekspresija unutar biofilma. Preuzeto sa: [\(Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents - PubMed \(nih.gov\)\)](#)

1.2.3 Legionella i biofilm

Tijekom uzorkovanja vodenih sustava na prisutnost bakterija roda *Legionella* veća je vjerojatnost pronalaska bakterija unutar biofilma nego njihova prisutnost kao slobodnih planktonskih bakterija. Kao dio biofilma bakterije se odupiru protoku vode te si na taj način omogućavaju kolonizaciju, a ujedno i hranjive tvari potrebne za razmnožavanje. (6)

Mogućnost vezanja *L. pneumophila* i njezina formacija biofilma ovisi o nekoliko faktora. Prvi ključni faktor je površina materijala. Različiti materijali inhibiraju vezanje bakterija na njihovu površinu, poput bakra, dok neke vrste plastike koje se koriste za izradu vodovodnih cijevi pozitivno djeluju na adherenciju. Prisutnost minerala, posebice kalcija i magnezija, također pozitivno djeluje na vezanje bakterija za površinu. Povećanje razine cinka i mangana pozitivno se povezuje s razvojem biofilma, a cink povećava sposobnost vezanja bakterija na stanice domaćina poput ljudski epitelnih stanica te jednako tome i vezanje za materijale. (13) Željezo, esencijalni nutrijent potreban za rast i replikaciju, u visokim koncentracijama djeluje inhibitorno na formaciju biofilma no za korištenje u antropogenim vodenim sustavima njegove se koncentracije trebaju strogo kontrolirati radi opasnosti od produkcije reaktivnih oblika kisika.(14)

Temperatura također predstavlja bitan faktor, njezina razina iznad 55°C onemogućava razmnožavanje bakterija, a nakon 64°C dolazi do potpune eliminacije. Osim na količinu i stupanj prijanjanja, temperatura utječe i na oblik biofilma. Pri temperaturi od 25°C bakterije formiraju biofilm sa vodenim kanalima koji oblikom oponaša gljive. Na temperaturi od 37°C biofilm je deblji i vodeni kanali nisu prisutni. Uz navedeno, statičan protok vode ili potpuni izostanak istog osiguravaju idealne uvjete za kolonizaciju bakterija. (13)

Također, vitalan utjecaj predstavlja i suživot s drugim mikroorganizmima unutar biofilma. U *in vitro* uvjetima bakterije produciraju biofilm koji se sastoji samo od jedne vrste dok u okolišu tvore biofilm sa više vrsta mikroorganizama. Od prisutnih mikroorganizama ključnu ulogu predstavljaju protozoe unutar čijih je stanica moguća replikacija. *L. pneumophila* može parazitirati unutar dvadeset vrsta ameba i jedne vrste sluzave plijesni. Replikacija unutar ameba omogućava bakterijama povećanu proizvodnju polisaharida, a samim time i mogućnost formiranja biofilma. Jedna od ameba koja je prisutna u biofilmu te omogućava razvoj *Legionella* jest *Acanthamoeba castellanii*. Biofilm produciran uz prisutnost termostabilnih ameba omogućuje bakterijama rezistenciju na tretmane toplinom kao što je postupak

pasterizacije. Sukladno tome, prisutnost protozoa u antropogenim izvorima vode predstavlja zaštitnu nišu za bakterije i povećani rizik za izbijanje epidemije.(13)

Prisutnost drugih bakterijskih vrsta unutar biofilma različito djeluje na razmnožavanje, tako da ga inhibira ili promovira. *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* spp. i *Pseudomonas fluorescens* potiču rast *L. pneumophila* unutar istog biofilma sintetizirajući tvari koje potiču bolju adheziju bakterija za biofilm i proizvodeći molekule koje stimuliraju njezin rast. Suprotno, *Pseudomonas aeruginosa* i *Burkholderia cepacia* djeluju antagonistički na njihov razvoj kada se međusobno nađu unutar biofilma. Ako uz *P. aeruginosa* unutar biofilma kolonizira i *K. pneumoniae* inhibitorni učinak *P. aeruginosa* se umanjuje. Naime, *K. pneumoniae* osigurava čimbenike rasta za *L. pneumophila* koji ujedno prigušuju inhibitorne učinke *P. aeruginosa*. Već spomenuta, *A. castellanii*, također inhibitorno djeluje na *P. aeruginosa* time što je ulazak *L. pneumophila* u njihove stanice povećan u trenutku prisutnosti *P. aeruginosa* unutar biofilma. Na rast bakterija unutar biofilma ne utječe samo vrsta i broj ostalih prisutnih mikroorganizama već i njihova međusobna interakcija. (14)

Osim istaknutih fizikalno-kemijskih parametara koji utječu na formaciju biofilma molekularni čimbenici vezani u *L. pneumophila* također izravno utječu na proces. Protein bakterije sličan kolagenu (Lcl – Legionella collagen-like protein) služi kao posrednik stvaranja biofilma pomažući adheziju na površinu materijala kao i na druge organizme. Pomoću pila koji se nalaze na površini bakterije ona prijanja na površinu materijala i na stanice protozoa. Eksperimentiranje na genskoj razini, brisanje određenih gena bakterije, rezultiralo je značajnim smanjenjem stvaranja biofilma. (13)

1.2 Ozon

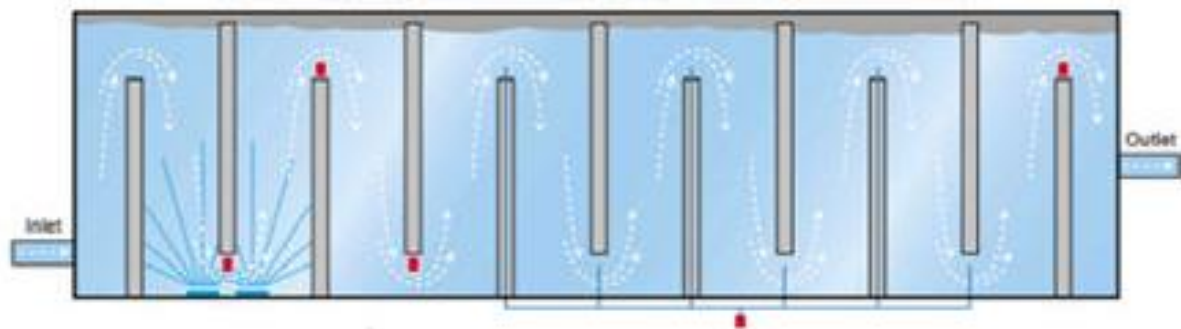
Ozon (O₃) predstavlja alotropsku modifikaciju kisika, a njegova molekula sastoji se od tri atoma kisika. Ovaj plin plave boje i jakog neugodnog mirisa u prirodi se konstantno stvara u sloju stratosfere te Zemlju svojom ulogom ozonskog omotača štiti od štetnog djelovanja ultraljubičastog zračenja. Unatoč tome da život na Zemlji ne bi bio moguć bez stratosferskog ozona kao sastavni dio troposfere vrlo je nepoželjan. Već u malim količina djeluje nadražujuće, a pri velikim koncentracija izrazito je otrovan. Nakon fluora to je najjače oksidacijsko sredstvo koje je u vodi izrazito nestabilna molekula i upravo to je razlog njegove velike reaktivnosti. Pošto je jaki oksidans ozon se koristi za dezinfekciju pitke vode, oksidaciju prisutne organske

tvari u vodi i za modifikaciju organoleptičkih svojstava vode, uklanjanje neugodnih mirisa i okusa. Uz navedeno, u prisutnosti ozona oksidiraju i mangan i željezo koji se mogu nalaziti u nekondicioniranoj vodi za piće. (15)

Osim bakterija, sanirajući učinak pokazuje prema virusima, algama i protozoama. Djelovanje ozona kao dezinfekcijskog sredstva temelji se na dva mehanizma. Prvi je odgovoran za oksidaciju aminokiselina različitih staničnih komponenti poput enzima i peptida te razgradnju DNA. Drugi mehanizam podrazumijeva oksidiranje višestruko nezasićenih masnih kiselina u kisele perokside što dovodi do degradacije stanične ovojnice. Djelujući simultano ovi mehanizmi ometaju rad stanice, točnije bakterija i virusa. (16)

Ozon u vodenom okolišu može tvoriti hidroksilne ione koji su jaki oksidansi. Vrijeme poluraspada, kada prisutan u vodi, kreće se od nekoliko sekundi do nekoliko minuta i ovisno je o koncentraciji organskih i anorganskih tvari u vodi, temperaturi vode i pH vrijednosti. (16) Unatoč tome što se pri nižim temperaturama topljivost ozona povećala, njegova efikasnost pokazala se boljom pri višim temperaturama. Utjecaj pH na djelovanje ozona relativno je mali, pri konstantnoj koncentraciji ozona i različitim pH vrijednostima sposobnost inaktivacije mikroorganizama ostala je približno jednaka. Brojnost i vrsta suspendiranih čestica u vodi također utječe na djelotvornost ozona. Organske tvari prisutne u vodi troše ozon s kojim reagiraju te na taj način smanjuju koncentraciju ozona koji aktivno može djelovati na mikroorganizme. Osim svojstva vode, koncentracija ozona koja se primjenjuje isto je ključan čimbenik pri dezinfekciji. Inicijalna koncentracija ozona važnija je od kontaktnog vremena pošto se redukcija primijenjene koncentracije ne može nadoknaditi dužim periodom izloženosti. (17,18)

Ozon se stvara u strukturiranim komorama koje sadrže odvojene elektrode uslijed čijeg se naizmjeničnog električnog pražnjenja, suhi i filtrirani kisik prisutan unutar komore transformira u troatomnu molekulu ozona. Nakon postignutih uvjeta u komore se propušta voda za piće. U vodi tijekom prolaska kroz komoru dolazi do inaktivacije virusa, razgradnje i oksidacije organskih čestica, uklanjanja mangana, željeza i fenola. Također, uklanja se boja, miris i okus vode. Nema tvorbe dezinfekcijskih nusprodukata poput bromiranih trihalometana koji se mogu javiti u slučaju dezinfekcije klorom. (18)



Slika 4. Izgled komore za dezinfekciju vode ozonom. Prikaz elektroda čije električno pražnjenje uz prisutnost plina kisika dovodi do stvaranja ozona. Nastali ozon djeluje na vodu koja se propušta kroz komoru. Preuzeto sa: [Case Study: Newport News Uses Emerson Ozone Instrumentation For Safe, Effective Disinfection \(wateronline.com\)](#)

Uz navedene blagodati dezinfekcije ozonom, problem predstavlja nedostatak rezidualnog djelovanja. Radi toga, može doći do naknadne kontaminacije vode tijekom prolaska kroz vodovodnu mrežu te dezinfekcija koristeći ozon kao isključivo sredstvo ne može garantirati stopostotnu sigurnost vode kada stigne do potrošača. Dezinfekciju ozonom zato mora pratiti primjena klora radi njegovog rezidualnog djelovanja. Također, korištenje uređaja koji producira ozon predstavlja veliki financijski trošak. (18)

2 CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj ozona na rast *L. pneumophila*, a posljedično i njegov učinak kao dezinfekcijskog sredstva.

Utjecaj se promatrao na samim bakterijama u vodi, zatim na biofilmu koji se formirao 24h i 5 dana na trima različitim materijalima; polistiren, nehrđajući čelik (inox) i keramičke pločice.

Svi promatrani materijali bili su izloženi jednakoj količini ozona koji se upuhivao 38s, a materijali su bili izloženi sat vremena.

Hipoteza ovog istraživanja je da ozon na prisutne bakterije djeluje inhibitorno sprječavajući njihov rast, kako u čistoj vodi bez prisutnosti biofilma tako i na navedenim materijalima uz formirani biofilm.

3 MATERIJALI I POSTUPCI

3.1 Materijali

3.1.1 Laboratorijski pribor i posuđe

- Plastične i staklene Petrijeve zdjelice
- Plastični L štapić
- Plastična mikrobiološka eza
- Epruvete
- Automatske pipete (10-1000 μ L, 20-200 μ L, 2-20 μ L)
- Multikanalna pipeta
- Nastavci za pipete
- Mikrotitarska ploča s jažicama
- 12-titarska pločica za rast (12 well)
- Staklena laboratorijska čaša
- Plastična šprica (10mL)
- Parafilm
- Bunsenov plamenik
- Pinceta
- Inox metalne pločice
- Keramičke pločice
- BCYE agar

3.1.2. Laboratorijski uređaji

- Spektrofotometar
- Inkubator
- Ultrazvučna kupelj
- Ozonizator
- Tresilica

3.1.3. Kemikalije i mikroorganizmi

- Fiziološka otopina
- Sterilna voda iz špine
- *Legionella pneumophila* soj 130b

3.2 Postupci

Korištena su tri različita materijala; polistiren, inoks metal i keramičke pločice. Također, ozon se ispitivao i na slobodnim bakterijama u vodi i pripremljenom obogaćenom bujonu. Za sve navedene postupke i materijale korištena je bakterijska suspenzija 10^6 CFU/mL.

3.1 Priprema planktonskih legionela u vodovodnoj vodi

Epruveta koja sadrži bakterijsku suspenziju, pripremljenu u sterilnoj vodi iz špine, vorteksirana je te je iz iste izdvajano po $200\mu\text{L}$ i prebačeno u jažice mikrotitarske pločice. Pločica je zatim postavljena u ozonizator koji upuhuje ozon 38s u periodu od sat vremena.



Slika 5. Ozonizator unutar kojeg su mikrotitarske pločice sa pripremljenim bakterijskim suspenzijama

Nakon ozonizacije izrađena je serija deseterostrukih razrjeđenja pomoću nove mikrotitarske pločice. Uzeto je $200\mu\text{L}$ ozonizirane bakterijske suspenzije te je stavljeno u prvu jažicu mikrotitarske pločice. Preostale jažice napunjene su sa $180\mu\text{L}$ sterilne vode iz špine te je iz prve jažice, koja sadrži osnovni uzorak bakterijske suspenzije, prebačeno $20\mu\text{L}$ u jažicu pored, koja

sadrži 180 μ L sterilne vode iz špine, i tako redom u iznosu od sveukupno 4 razrjeđenja. Zatim, po 10 μ L uzeto je iz svake jažice i nasadeno na BCYE agar. Posljednje, agar je stavljen u inkubator na temperaturu od (35 \pm 1) $^{\circ}$ C tijekom četiri dana.

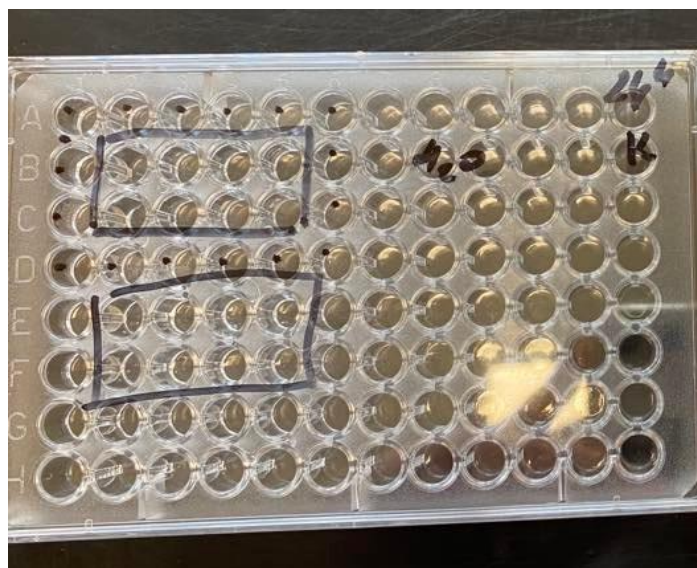
Uz spomenuto, pripravljena je i kontrolna mikrotitarska pločica sa istom bakterijskom suspenzijom. Bitna razlika je da kontrolna pločica nije bila izložena ozonu već je odmah provedena serija deseterostrukih razrjeđenja, na jednaki način, a potom su bakterije nasadene na agar koji se kultivirao u jednakim, prethodno opisanim, uvjetima.



Slika 6. Porast kolonija *L. pneumophila* soj 130b različitih razrjeđenja

3.2 Priprema biofilma u bujonu

Bakterijska suspenzija pripravljena je u obogaćenom bujonu koji sadrži L-cistein i željezo (III) nitrat, nutritivne faktore ključne za rast. Dvije zasebne mikrotitarske pločice predstavljaju kontrolu i tretman, a u svaku je prebačeno po 200 μ L bakterijske suspenzije u četiri zasebne jažice.



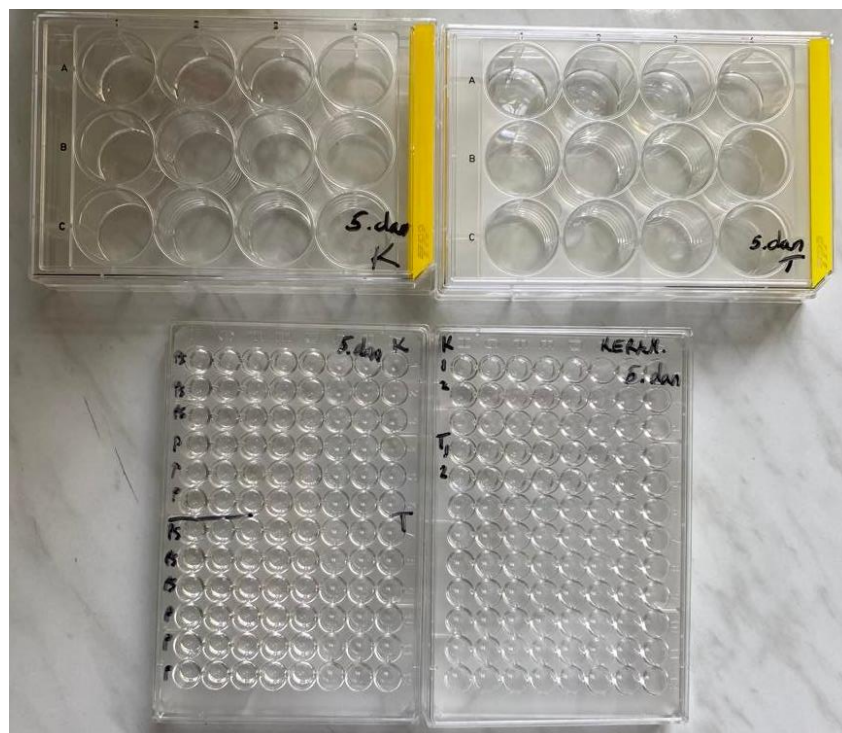
Slika 7. Mikrotitarska pločica unutar čijih se, markerom označenih jažica ,nalazi pripremljena bakterijska suspenzija.

Pločice su potom stavljene u inkubator tijekom 24h. Nakon 24h pločice su izvađene iz inkubatora te je zaostala bakterijska suspenzija uklonjena iz jažica. Jažice su dva puta isprane sa 200 μ L fiziološke otopine koja je u posljednjem krugu ispiranja uklonjena tako da jažice ostanu prazne. Potom su pločice stavljanje na sušenje u digestor u trajanju od 5 minuta. Pločica koja predstavlja tretman postavljena je u ozonizator tijekom 1h. Preostala, kontrolna, pločica nije izložena ozonu. Nakon završenog tretmana jažice su ponovno isprane sa 200 μ L fiziološke otopine, zatim je u svaku jažicu tretirane pločice dodano 200 μ L fiziološke otopine. Tretirana pločica, jednako kao i kontrolna, ostavljene su unutar ultrazvučne kupelji 1 minutu. Služeći se pipetom sadržaj jažica dobro je promiješan. Potom je rađena serija deseterostrukih razrjeđenja. Uzeto je 200 μ L bakterijske suspenzije i prebačeno u prvu jažicu nove mikrotitarske pločice. U preostale jažice dodano je 180 μ L obogaćenog bujona te je iz prve jažice, koja sadrži bakterijsku suspenziju, prebačeno 20 μ L i tako redom do četvrtog razrjeđenja.

Osim 24h, pripremljene su i mikrotitarske pločice sa bakterijskom suspenzijom koje su ostavljene u inkubatoru tijekom 5 dana kako bi se ispitaio utjecaj vremena na brojnost i formaciju biofilma, a posljedično i utjecaj ozona na razvijeni biofilm. Nakon inkubacije provedeni su identični postupci tretmana, prethodno opisani, kao i za pločice koje su se inkubirale 24h.

3.3 Priprema biofilma na polistirenu

Dvije zasebne 12-titarske pločice predstavljaju kontrolu i tretman. U svaku je prebačeno po 3mL bakterijske suspenzije, svaki mililitar u zasebnu jažicu. Pločice su zatim spremljene u inkubator na temperaturi od $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ tijekom 24h i 5 dana kako bi se formirao biofilm. Nakon zadanih vremena pločice su izvađene iz inkubatora i svaka jažica je dva puta isprana sa 500 μL sterilne vode iz špine na način da nakon posljednjeg ispiranja u jažici ne zaostane vode. Zatim su pločice sušene u digestoru 5 minuta. Potom su pločice, one označene kao tretman, postavljene u ozonizator u vremenskom periodu od 1h. Kontrolna pločica nije izložena ozonu. Pločice koje su bile izložene ozonu su nakon isteklih sat vremena isprane sa 500 μL sterilne vode iz špine. Nakon ispiranja u svaku zasebnu jažicu dodano je 500 μL sterilne vode iz špine te su pločice, tretirana i kontrolna, ostavljene u ultrazvučnoj kupelji 1 minutu. Zatim je sadržaj jažice dobro promiješan pomoću pipete i također je rađeno deseterostruko razrjeđenje. Serija razrjeđenja rađena je po jednakom principu kao kod već objašnjenih postupaka. Nakon razrjeđenja sadržaj jažica nasaden je na BCYE agar u količini od 10 μL i obliku kapljica.



Slika 8. 12-titarske pločice korištene za obradu bakterijskih suspenzija i mikrotitarske pločice korištene za seriju deseterostrukih razrjeđenja

3.4 Priprema biofilma na nehrđajućem čeliku (inox)

Pripremljena bakterijska suspenzija prebačena je u 12-titarsku pločicu po principu 1mL suspenzije u pojedinačnu jažicu. Zatim su u jažice dodane inoks pločice na način da su 3 inoks pločice postavljene u zasebne jažice u koje je prethodno dodana bakterijska suspenzija.



Slika 9. Metalne pločice uronjene u 1mL bakterijske suspenzije unutar jažica 12-titarske pločice

Pločica je zatim stavljena u inkubator tijekom 24h. Jednaki postupak ponovljen je za inkubaciju u trajanju od 5 dana. Nakon inkubacije svaka metalna pločica je iznad Petrijeve zdjelice isprana sa 500 μ L sterilne vode iz špine. Metalne pločice su potom vraćane u suhe jažice i sušene u digestoru 5 minuta nakon čega su stavljene u ozonizator na 1h. Nakon tretmana metalne pločice su isprane sa 500 μ L sterilne vode iz špine i stavljene u novu jažicu sa 500 μ L sterilne vode iz špine. Unutar takvih jažica metalne su pločice ostavljene u ultrazvučnoj kupelji 1 minutu. Potom su metalne pločice zajedno sa 500 μ L sterilne vode iz špine u koju su bile uronjene prebačene u male epruvete i vorteksirane. Iz epruveta u kojima se nalazila sterilna voda iz špine zajedno sa metalnim pločicama uzeto je 200 μ L i prebačeno u prvu jažicu mikrotitarske pločice kako bi se izvršila serija deseterostrukih razrjeđenja. Napravljena razrjeđenja potom su nasadena na BCYE agar prema već opisanom postupku. Jednaki proces izvršen je sa kontrolnim metalnim pločicama, izuzev izlaganja ozonu tijekom 1h.

3.5 Priprema biofilma na keramičkim pločicama

Po dvije keramičke pločice stavljene su u staklene Petrijeve zdjelice i dodan je agar na način da ne prekriva gornju stranu pločica. Keramičke pločice potom su prelivene pripremljenom bakterijskom suspenzijom i stavljene u inkubator uz miješanje tijekom 24h i 5 dana.



Slika 10. Korištene keramičke pločice (lijevo). Inkubacija keramičkih pločica uz miješanje (desno).

Nakon inkubacije pločice su izvađene iz agara steriliziranom pincetom i isprane sa 10mL sterilne vode iz špine te prebačene u čiste Petrijeve zdjelice. Pločice su potom sušene 5 minuta te izložene ozonu tijekom 1h. Nakon ozonizacije keramičke pločice prebačene su u epruvete u kojima se nalazi 10mL sterilne vode iz špine te ostavljene u ultrazvučnoj kupelji 1 minutu. Epruvete su potom vorteksirane te je 200 μ L prebačeno u jažicu mikrotitarske pločice kako bi se prema istom principu izvela serija deseterostrukih razrjeđenja. Izvedena razrjeđenja potom su nasađena na BCYE agar i inkubirana 4 dana na temperaturi od $(35\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

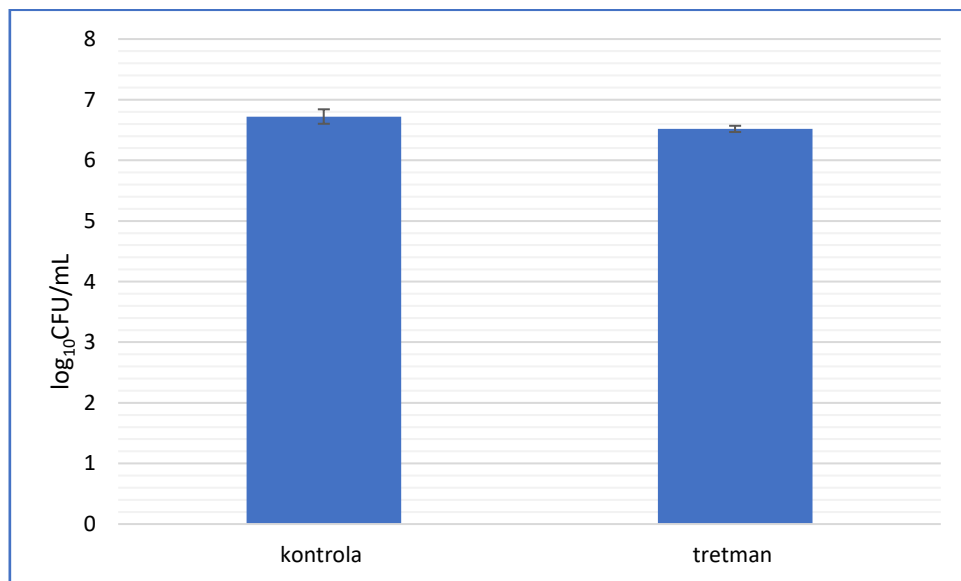
Isti postupak izveden je za kontrolne keramičke pločice, izuzev ozonizacije.

4 REZULTATI

4.1 Utjecaj ozona na planktonske legionele u vodovodnoj vodi

Nakon četverodnevne inkubacije prebrojane su izrasle kolonije. Broj bakterija određen je neizravnom tehnikom koristeći se pripravom serijskih razrjeđenja osnovne bakterijske suspenzije. Kolonije u nižim razrjeđenjima koje nisu bile brojive označene su kao nebrojive dok su preostale zapisane u obliku CFU/mL.

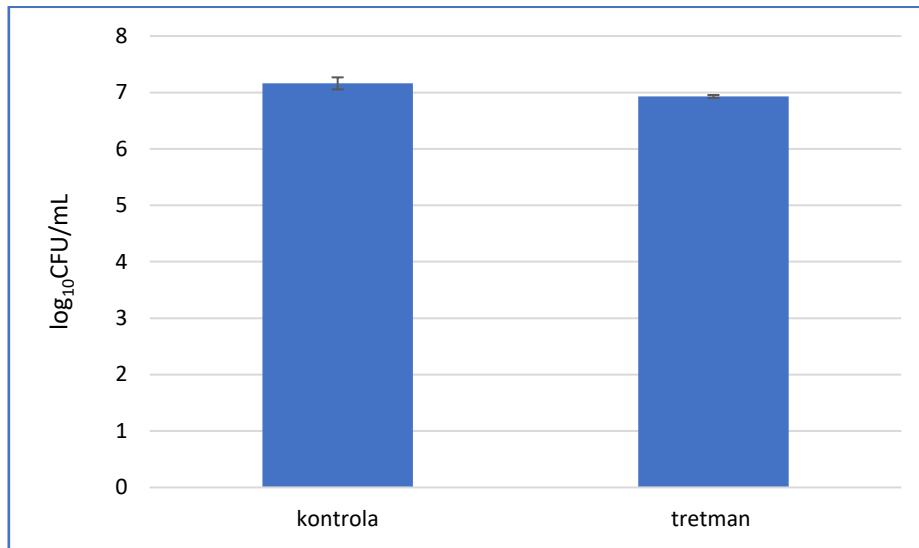
Prema podacima na Grafu 1. možemo uočiti da djelovanje ozona nema očekivani učinak na rast bakterija *L. pneumophila* pošto se broj poraslih bakterija koje su bile izložene ozonu tijekom 1h nije značajno smanjio. Stupac koji označava porast tretiranih bakterija nezamjetljivo je niži od onog koji prikazuje broj poraslih netretiranih bakterija. Nemogućnost prodiranja ozona kroz vodu u kojoj su se nalazile bakterije tijekom ozonizacije objašnjava ovakve rezultate.



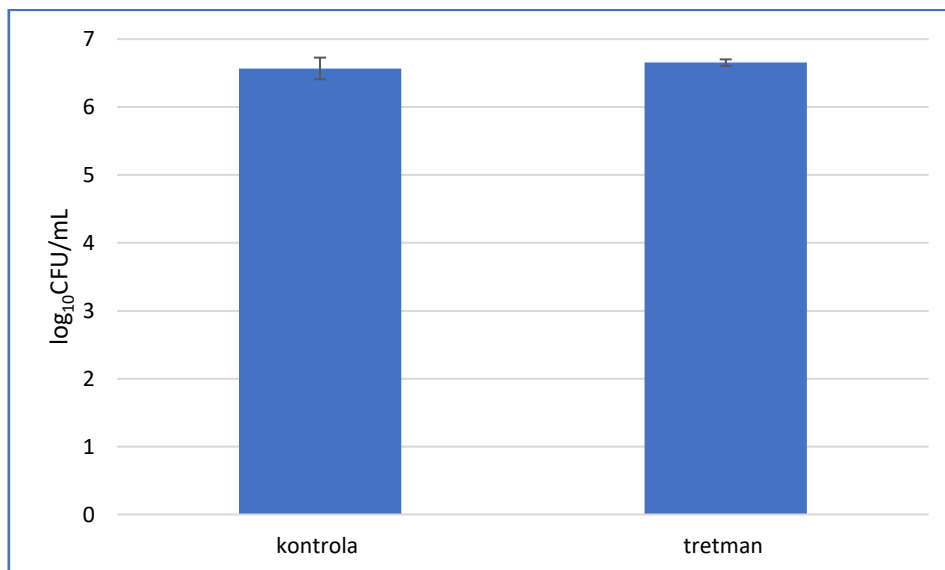
Graf 1. Broj bakterija nakon tretmana ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija.

4.2 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele u bujonu i na polistirenu

U prvoj 12-titarskoj pločici biofilm je formiran 24h, a u drugoj 5 dana kako bi se uz utjecaj ozona na slobodne bakterije ujedno opisao njegov utjecaj i odnos na biofilm s obzirom na vremensku formaciju biofilma. Prikazano na Grafu 2.-3. vidljivo je da ozon nema očekivani inhibični učinak na bakterije pošto se broj bakterija nakon tretmana ozonom smanjio za mali postotak.



Graf 2. Broj bakterija nakon tretmana ranog biofilma (24-satni) ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u bujonu (eng. buffered yeast extract (BYE) broth)



Graf 3. Broj bakterija nakon tretmana kasnog biofilma (petodnevni) ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u bujonu (eng. buffered yeast extract (BYE) broth)

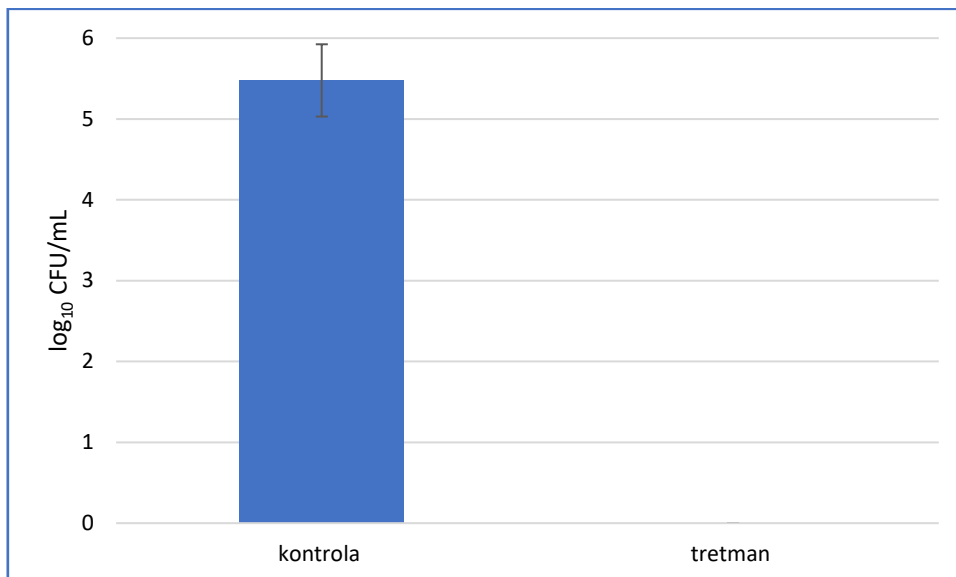
Formacija biofilma u trajanju od 24h i potom tretiranje formiranog biofilma ozonom dovela je do smanjena broja bakterija u odnosu na kontrolnu pločicu koja nije bila tretirana ozonom. Iako se bakterije u ovom pokusu nisu nalazile u vodi u slobodnom plivajućem obliku već unutar biofilma, hranjive tvari unutar bujona omogućile su preživljavanje bakterija *L. pneumophila* osiguravajući im potrebnu energiju za rast. Slični rezultati uočeni su na biofilmu čija je formacija trajala 5 dana no u ovom slučaju možemo zamijetiti veći broj poraslih bakterija u tretiranoj nego u kontrolnoj pločici što također možemo objasniti prisustvom L-cisteina i željezo (III) nitrata u bujonu.

4.3 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele na polistirenu

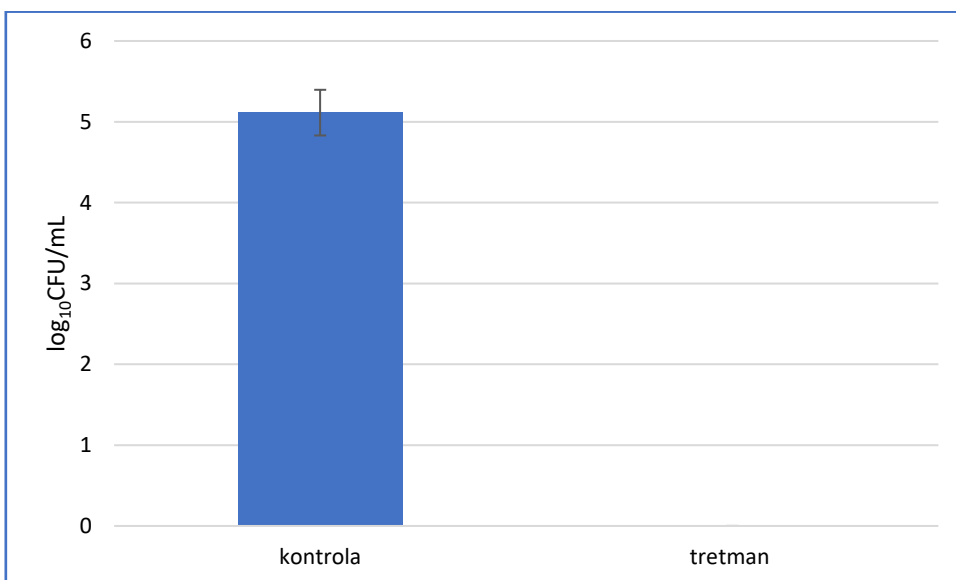
Nakon četverodnevne inkubacije primijećen je potpuni izostanak porasta tretiranih bakterija. Biofilm koji se na polistirenu, stijenkama jažica unutar 12-titarskih pločica, formirao tijekom 24h i 5 dana potpuno je uništen nakon jednosatne izloženosti ozonu. Ovakvi rezultati mogu se objasniti direktnom izloženosti biofilma ozonu, nije bilo prisutnosti vode, jažice su bile suhe pri ulasku u ozonizator, niti su bakterijske suspenzije bile pripravljanje u hranjivom bujonu koji je sadržavao ključni L-cistein i željezo već unutar sterilne vode iz špine. Potpuni izostanak porasta bakterija ukazuje na odličnu, točnije 100%-tnu, učinkovitost ozona kao sredstva u borbi protiv formiranja biofilma u antropogenim vodovodnim sustavima koji u svom sastavu sadrže materijale izrađene od plastike.



Slika 11. Prikaz porasta kontrolnih kolonija (gore) i potpunog izostanka porasta bakterija tretiranih ozonom (dolje).



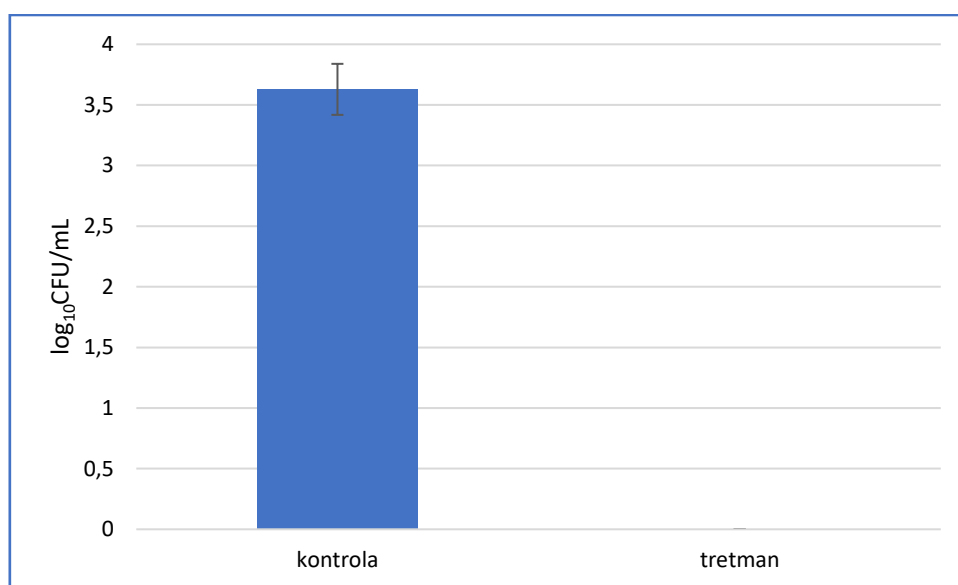
Graf 4. Broj bakterija nakon tretmana ranog biofilma (24-satni) na polistirenu ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u sterilnoj vodi iz špine.



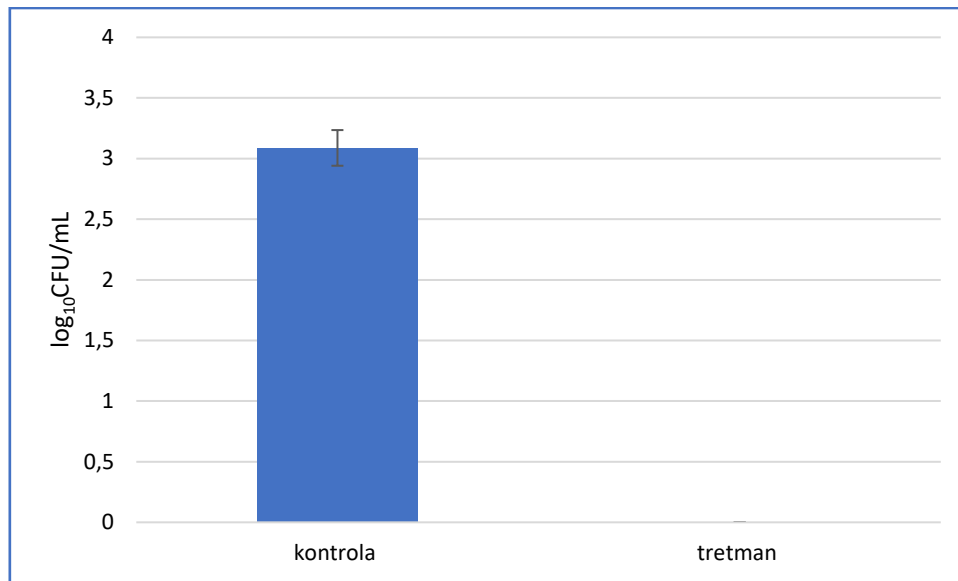
Graf 5. Broj bakterija nakon tretmana kasnog biofilma (petodnevni) na polistirenu ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u sterilnoj vodi iz špine.

4.4 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele na nehrđajućem čeliku (inox)

Na materijalu inoks metalnim pločicama također je uočen potpuni izostanak porasta kolonija nakon tretmana ozonom tijekom 1h. Ovakvi rezultati također se mogu objasniti izostankom hranjivih tvari koje su bile prisutne u obogaćenom bujonu i direktnom izloženosti formiranog biofilma ozonu. Kontrolne inoks pločice pružaju nam uvid da je biofilm bio formiran pošto je njihovom obradom zabilježen porast bakterija. Jednaki rezultati uočeni su kod 24-satne i petodnevne formacije biofilma.



Graf 6. Broj bakterija nakon tretmana ranog biofilma (24-satni) na nehrđajućem čeliku (inox) ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u sterilnoj vodi iz špine.

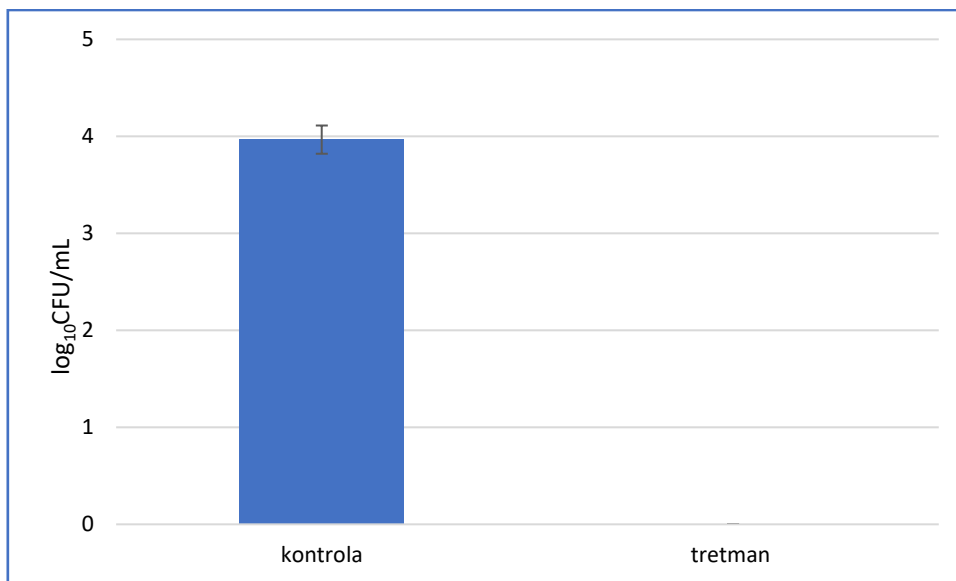


Graf 7. Broj bakterija nakon tretmana kasnog biofilma (petodnevni) na nehrđajućem čeliku (inox) ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Biofilm je formiran u sterilnoj vodi iz špine.

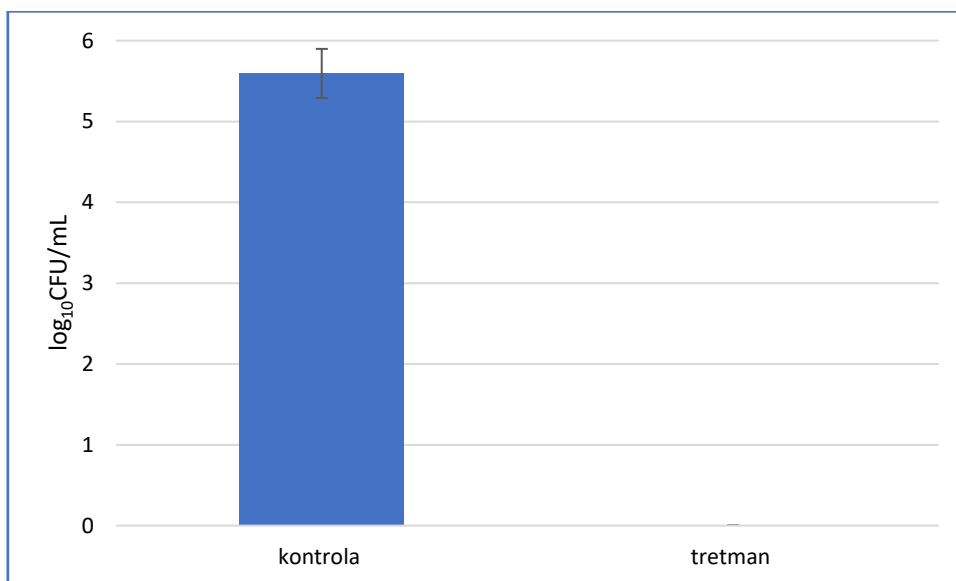
Prema grafičkim prikazima uočavamo 100%-tnu učinkovitost ozona kao inhibitornog sredstva u borbi protiv biofilma *L. pneumophila* formiranog na inoks metalu.

4.5 Utjecaj ozona na rani i kasni biofilm legionele na keramičkim pločicama

Keramičke pločice na kojima se tijekom 24h i 5 dana formirao biofilm također su materijal na kojem kolonije *L. pneumophila* ne mogu opstati nakon jednosatne izloženosti ozonu. Nasađivanjem na BCYE agar i inkubacijom u optimalnim uvjetima porast bakterija koje su bile tretirane ozonom potpuno je izostao. Kontrolne kolonije koje su podložene istom procesu, izuzev ozonizacije, u jednakim uvjetima inkubacije pokazale su vidljivi porast. I ovdje bilježimo 100%-tnu učinkovitost ozona u borbi protiv formacije biofilma na materijalima izrađenim od keramike.



Graf 8. Broj bakterija nakon tretmana ranog biofilma (24-satni) na keramičkim pločicama ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u sterilnoj vodi iz špine.



Graf 9. Broj bakterija nakon tretmana kasnog biofilma (petodnevni) na keramičkim pločicama ozonom. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Biofilm je formiran u sterilnoj vodi iz špine.

5. RASPRAVA

Najveći broj infekcija čija su žarišta antropogeni vodeni sustavi uzrokovani su bakterijom *L. pneumophila*. Rezultat ovih infekcija je neprikladno tretiranje vode i nehigijensko održavanje vodenih sustava te predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Njezina preferencija formacije biofilma na stijenkama cijevi dodatno otežava njezino uklanjanje. Na temelju prethodno prikazanih rezultata možemo vidjeti da biofilm formira na raznovrsnim materijalima, od polistirena, inoks metala do keramike.

Istraživanje provedeno 2006. godine uspoređivalo je utjecaj temperature na sposobnost *L. pneumophila* da formira biofilm na materijalima kao što su polistiren i staklo. Zaključeno je da na temperaturi od 37°C bakterija ima značajno veću sposobnost formiranja biofilma na navedenim materijalima nego na niže ispitivanoj temperaturi od 25°C. Navedeni podatak ukazuje nam na još jedan faktor koji olakšava preživljavanje bakterije u vodenim sustavima pošto se voda u antropogenim sustavima nerijetko nalazi na temperaturi bliskoj 37°C. (19) Žarišta infekcija mogu biti posredovana i ljudskim faktorom to jest nehigijenskim održavanjem rozeta tuševa i mrežica na slavinama. Također, dugotrajna stagnacija vode u cijevima osigurava pogodno stanište.

Uvođenjem definiranih sustava regulirana je zdravstvena ispravnost vode i eradikacija *Legionella*. Propisane su učinkovite preventivne mjere koje se odnose na održavanje ispravne temperature hladne i tople vode i čistoću sustava koji se koriste vodom. Trenutačne mjere na snazi uključuju tretiranje vode visokim temperaturama to jest pasterizaciju i kloriranje vode. Pošto bakterije roda *Legionella* mogu preživjeti na temperaturama 0-63°C pasterizacija koja se izvršava na temperaturama višim od 65°C učinkovito inhibira njihov rast. Kloriranje vode danas je najraširenija metoda dezinfekcije jer rezidualni klor u količini 0,5 mg/L osigurava dugotrajnu ispravnost vode. (8)

Iako učinkovita metoda, dezinfekcija vode klorom dovodi do nastanka nusprodukata u vodi koji predstavljaju potencijalnu opasnost za zdravlje čovjeka. Kao alternativna metoda dezinfekcije može se primijeniti ozonizacija. Prednosti ove metode su da ozon djelujući kao jako oksidativno sredstvo uklanja prisutne organske molekule, formirani biofilm na stijenkama vodovodnih cijevi te osigurava vodu bez okusa, boje i mirisa. Ključan nedostatak korištenja ozona kao dezinfekcijskog sredstva je izostanak njegovog rezidualnog djelovanja. Samim time

dezinfekcija vode temeljena isključivo na ozonizaciji ne može sa sigurnošću dopremiti vodu do potrošača jer postoji opasnost od naknadne kontaminacije tijekom prolaska kroz vodoopskrbni sustav.

Dobiveni rezultati prikazuju apsolutnu učinkovitost ozona u uklanjanju biofilma formiranog na polistirenu, inoks metalu i keramici. Jedino gdje se ozon nije pokazao učinkovitim jest kod primjene na slobodne bakterije prisutne u vodi i na biofilm koji se formirao u obogaćenom bujonu. Bujon je sadržavao hranjive tvari L-cistein i željezo (III) nitrat koje su ključne za preživljavanje što je posljedično dovelo do neučinkovitosti ozona. Unatoč ovim rezultatima jednaki ishod ne možemo očekivati kod primjene ozona u vodi za piće.

Znamo da je u okolišnim uvjetima biofilm građen od više različitih bakterijskih vrsta, a u vodi su prisutne i ostale vrste čestica koje tijekom izvedbe ovog istraživanja nisu bile uključene u provedene pokuse. Okolišni čimbenici predstavljaju važan faktor kod određivanja učinkovitosti nekog dezinfekcijskog sredstva. Istraživanje provedeno na području američke sveučilišne bolnice „Lausanne“ kao varijabilne faktore obuhvaćalo je i okolišne uvjete u kojima se formira biofilm. Proučavana je učinkovitost ozona u eradikaciji bakterijskog biofilma *L. pneumophila* u vodovodnim cijevima bolnice. Za dezinfekciju vode u određenom dijelu sustava koristio se ozon određene koncentracije, a kontaktno vrijeme ozona s vodom bilo je 18 minuta. Voda se uzorkovala 4-6 puta godišnje. U uzorcima koji su uzeti neposredno nakon tretmana nije zabilježena prisutnost *L. pneumophila* no u drugim slučajevima, kada bi se voda uzorkovala određeni vremenski period nakon primjene ozona detektirana je prisutnost bakterija. Razlog tome je nedostatak rezidualnog djelovanja ozona. Na temelju istraživanja, zaključeno je da sama primjena ozona nije dovoljna za kontrolu *L. pneumophila* u vodenim sustavima, iako njegov učinak zabilježen u laboratorijski provedenim istraživanjima pokazuje suprotno. (19)

Izuzev dokazane učinkovitosti na *L. pneumophila* ozon djeluje i na druge vrste gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija te spore. Izolirana prostorija podvrgnuta ozonu u koncentraciji od 25 ppm i vremenskom periodu od 20 minuta pokazuje odlično bakteriocidno djelovanje ozona. (20) Djelovanje je primijećeno kako na glatkim, staklenim i plastičnim, površinama tako i na tkaninama namještaja te ostalim hrapavim površinama. Iako toksičan, brzo se razlaže na elementarni kisik. Koncentracija ozona pada na 4% originalne koncentracije nakon samo 100 cm upravo radi jakog oksidativnog učinka. (21) Prostorije se tijekom trajanja dezinfekcije izoliraju, a ova primjena bila bi pogodna za sobe u sklopu bolnica. Kao dezinfekcijsko sredstvo u plinovitom agregatnom stanju ozon ima mogućnost prodiranja do teško dostupnih mjesta u usporedbi sa uobičajenim tekućim kemijskim sredstvima.

Istražena je i učinkovitost ozona specifično na biofilm bakterije *K. pneumoniae* koji je također formiran na keramičkim pločicama tijekom 24-sata. Pločice su potom izložene ozonu koncentracije 25 ppm tijekom 1h. Rezultati nisu pokazali 100%-tnu učinkovitost ozona na testirani biofilm. No, tretirane pločice pokazale su značajno smanjenje broja poraslih bakterija u usporedbi sa kontrolnim pločicama. Manje efektivno djelovanje na *K. pneumoniae* u odnosu na *L. pneumophila*, na čiji biofilm ima apsolutno bakteriocidno djelovanje, može imati posljedice na učinkovitost ozona kao dezinfekcijskog sredstva. Naime, kako je već istaknuto biofilm u prirodi formira više vrsta bakterija te nejednako djelovanje ozona prema različitim vrstama onemogućava njegovu jedinstvenu primjenu i garanciju čiste i pitke vode. (22)

Na temelju svega zaključujemo da ozon djeluje inhibitorno na rast bakterija *L.pneumophila* u laboratorijski kontroliranim uvjetima. Biofilm se formirao na trima različitim materijalima, polistiren, inoks metal i biofilm, te je nakon tretmana ozonom i obradom uzorka porast bakterija izostao u sva tri slučaja. Unatoč eksperimentalno dobivenim podacima, koji ukazuju na potpunu inhibiciju bakterija nakon ozonizacije, njegovo inhibicijsko djelovanje nije dovoljno da bi se mogao primjenjivati za dezinfekciju vode za piće jer nema rezidualno djelovanje te zato njegova primjena danas uključuje i korištenje klora kao sredstva sa rezidualnim djelovanjem ili istovremenu primjenu visokih temperatura koje onemogućavaju rast i razvoj bakterijskih vrsta.

6. ZAKLJUČAK

Temeljeni na provedenom istraživanju te obrađenim i prikazanim rezultati, doneseni su sljedeći zaključci:

1. Ozon ne sprječava rast slobodnih planktonski bakterija u vodi
2. Ozon ne sprječava formaciju biofilma bakterija *L. pneumophila* kada se biofilm formira u bujonu obogaćenom L-cisteinom i željezo (III) nitratom
3. Ozon djeluje inhibitorno na formaciju biofilma na polistirenu, inoks metalu i keramičkim pločicama
4. Učinkovitost ozona kao dezinfekcijskog sredstva na trima navedenim materijalima, polistiren, inoks metal i keramika, u provedenom istraživanju pokazala se kao 100%-tna
5. Djelotvornost ozona ostaje 100%-tna kako pri 24-satnoj formaciji biofilma tako i pri petodnevnoj
6. Hipoteza istraživanja djelomično je dokazana, izuzev dezinfekcijskog djelovanja ozona na slobodne planktonske bakterije *L. pneumophila* i biofilma formiranog u obogaćenom bujonu.

7. LITERATURA

- 1) Kalenić S. i sur., Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 243-247
- 2) Mondino S, Schmidt S, Rolando M, Escoll P, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of Legionella. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:439-466. Dostupno na: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742>
- 3) Xu L, Luo ZQ. Cell biology of infection by Legionella pneumophila. *Microbes Infect.* 2013;15(2):157-167 Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.11.001>
- 4) Cordes LG, Fraser DW. Legionellosis: Legionnaires' disease; Pontiac fever. *Med Clin North Am.* 1980;64(3):395-416. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)31600-5](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)31600-5)
- 5) Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. *Lancet.* 2016;387(10016):376-385. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60078-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60078-2)
- 6) Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):506-526. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- 7) Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(10):1011-1021. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70713-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70713-3)
- 8) Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zarazne bolesti u Hrvatskoj 2017. godine. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/11/ZBVHR_2017_Final.pdf;
- 9) Herwaldt LA, Marra AR. Legionella: a reemerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis.* 2018 Aug;31(4):325-333. Doi: [10.1097/QCO.0000000000000468](https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000468)
- 10) Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2). Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>
- 11) O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79. Dostupno na: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- 12) Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493-512. Dostupno na: <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>

- 13) Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11). Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms141121660>
- 14) Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:38. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
- 15) Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., & Zanardi, I. (2009). The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*, 29(4), 646–682. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/med.20150>
- 16) Carlson, K. M., Boczek, L. A., Chae, S., & Ryu, H. (2020). Legionellosis and Recent Advances in Technologies for *Legionella* Control in Premise Plumbing Systems: A Review. *Water*, 12(3). Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/w12030676>
- 17) Blanc, D. S., Carrara, P., Zanetti, G., & Francioli, P. (2005). Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. *Journal of Hospital Infection*, 60(1), 69–72. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.10.016>
- 18) Li, J., Li, K., Zhou, Y., Li, X., & Tao, T. (2017). Kinetic analysis of *Legionella* inactivation using ozone in wastewater. *Chemosphere*, 168, 630–637. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.014>
- 19) Piao, Z., Sze, C. C., Barysheva, O., Iida, K. -i., & Yoshida, S. -i. (2006). Temperature-Regulated Formation of Mycelial Mat-Like Biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1613–1622. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1613-1622.2006>
- 20) Sharma, M., & Hudson, J. B. (2008). Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *American Journal of Infection Control*, 36(8), 559–563. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2007.10.021>
- 21) Li, C.-S., & Wang, Y.-C. (2003). Surface Germicidal Effects of Ozone for Microorganisms. *AIHA Journal*, 64(4), 533–537. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/15428110308984851>
- 22) Piletić K, Kovač B, Perčić M, Žigon J, Broznić D, Karleuša L, Lučić Blagojević S, Oder M, Gobin I. Disinfecting Action of Gaseous Ozone on OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Biofilm In Vitro. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022; 19(10):6177. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph19106177>

8. ŽIVOTOPIS

Dorotea Dobrić rođena je 08.06.2000. u Rijeci gdje je završila osnovnu školu Zamet i srednjoškolsko obrazovanje nastavila u Prvoj riječkoj hrvatskoj gimnaziji. Godine 2019. upisala je Medicinski fakultet u Rijeci, smjer sanitarno inženjerstvo. Zamjenica je predstavnika godine te je aktivni student mentor nižim generacijama istog smjera. Tijekom fakulteta aktivno je volontirala u Kliničkom bolničkom centru Rijeka te izvršavala obaveze na studentskim poslovima.