

# Fotodinamički učinak kationskog porfirina na višestruko rezistentne bakterije u komunalnoj otpadnoj vodi

---

**Planinić, Matej**

**Master's thesis / Diplomski 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:184:630809>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Matej Planinić

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

Diplomski rad

Rijeka, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Matej Planinić

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

Diplomski rad

Rijeka, rujan 2022.

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

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti, dipl. ing. kem.

Diplomski rad obranjen je 30. 9. 2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Željko Linšak, dipl. sanit. ing,
2. doc. dr. sc. Marin Glad, dipl. sanit. ing,
3. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti, dipl. ing. kem,
4. izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 69 stranica, 16 slika, 19 tablica, 49 literaturnih navoda.

Zahvala

Želio bih se zahvaliti svojim roditeljima, braći, curi, prijateljima, kolegama, te svima onima koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom studiranja i prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti s Odjela za biotehnologiju na Sveučilištu u Rijeci na stručnoj pomoći i na sintezi kemijskog spoja kojeg sam koristio u svom istraživanju.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marinu Gladu s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije na ustupljenom uzorku komunalne otpadne vode i na obavljenoj kemijskoj analizi iste.

Želio bih se zahvaliti Zavodu za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju na Sveučilištu u Rijeci, te svim djelatnicima Zavoda, a posebno laboranticama Danici i Gabrijeli, koje su mi uvijek davale prijeko potrebne savjete i skraćivale laboratorijske dane.

Također, zahvaljujem se Zdravstvena Fakulteta Univerza v Ljubljani i izv. prof. dr. sc. Roku Finku na stručnoj pomoći i savjetima.

Na kraju, veliko hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin bez čije pomoći ne bih uspio napisati ovaj diplomski rad i steći mnogobrojna iskustva, hvala na svim životnim savjetima koje ste mi udijelili.

## SAŽETAK

Višestruko rezistentne bakterije predstavljaju veliki javnozdravstveni problem, a veliki izazov predstavlja kontrola njihovog širenja. Jedna od potencijalnih metoda njihovog suzbijanja bi mogla biti primjena fotodinamičke inaktivacije. Cilj ovog rada bio je ispitati fotodinamički učinak kationskog porfirina TMPyP3 u različitim medijima u kombinaciji s izvorom ljubičaste svjetlosti u vremenskom intervalu od 10 minuta (LED lampa, valne duljine od 395 nm, intenziteta svjetlosti od 20 mW/cm<sup>2</sup> i ukupne doze svjetlosti od 12 J/cm<sup>2</sup>). U istraživanju korištene su bakterije *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* OXA NTCT 13442, *Staphylococcus aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* ATCC 43360 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850. Eksperimenti su obavljani u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine. Fotodinamički učinak testiran je određivanjem minimalne efektivne koncentracije (MEK), minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3, te provedbom fotoinaktivacijskog testa. Usporedbom rezultata dobivenih eksperimentom ustanovljeno je da dužim ozračivanjem (30 minuta) minimalne efektivne koncentracije kod pojedinih bakterija (*Klebsiella pneumoniae* OXA NTCT 13442 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850) smanjuju se za dvostruke vrijednosti.

**Ključne riječi:** višestruko rezistentne bakterije, fotodinamička inaktivacija, minimalna efektivna koncentracija (MEK), fotosenzibilizatori, komunalna otpadna voda

## SUMMARY

Multi-resistant bacteria represent a major public health problem, and controlling their spread is a big challenge. One of the potential methods of their suppression could be the application of photodynamic inactivation. This work aimed to examine the photodynamic effect of the cationic porphyrin TMPyP3 in different media in combination with a source of violet light in a time interval of 10 minutes (LED lamp, wavelength of 395 nm, light intensity of 20 mW/cm<sup>2</sup> and total light dose of 12 J/cm<sup>2</sup>). The bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* OXA NTCT 13442, *Staphylococcus aureus* ATCC 24213, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43360 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850 were used in the research. Experiments were performed in sterile municipal waste water and sterile tap water. The photodynamic effect was tested by determining the minimum effective concentration (MEC), the minimum anti-adhesion concentration of the cationic porphyrin TMPyP3, and by performing a photoinactivation test. By comparing the results obtained in the experiment, it was established that with longer irradiation (30 minutes), the minimum effective concentrations of certain bacteria (*Klebsiella pneumoniae* OXA NTCT 13442 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850) are reduced by double values.

**Keywords:** multi-resistant bacteria, photodynamic inactivation (PDI), minimum effective concentration (MEC), photosensitizers (PS), municipal wastewater

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1 Komunalna otpadna voda .....	2
1.1.1 Pročišćavanje otpadnih voda .....	2
1.2 Bakterijska rezistencija .....	3
1.3 <i>Staphylococcus</i> spp. ....	4
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.3.2 Meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....	5
1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	7
1.5 Karbapenemaza producirajuća <i>K. pneumoniae</i> .....	9
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
1.7 Fotodinamička inaktivacija .....	10
1.7.1 Reakcija tipa I. ....	12
1.7.2 Reakcija tipa II. ....	13
1.8 Porfirini .....	14
1.9 Utjecaj fotodinamičke inaktivacije na mikroorganizme .....	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1 Materijali i uređaji .....	19
3.1.1 Filtrirana i autoklavirana komunalna otpadna voda .....	20
3.1.2 Autoklavirana voda iz slavine .....	20
3.1.3 Bakterijski sojevi .....	20
3.1.4 5,10,15,20 tetrakis – ( <i>N</i> – metilpiridin-3-ij)porfirin tetraklorid .....	20
3.2 Metode .....	21
3.2.1 Kemijska analiza komunalne otpadne vode .....	21
3.2.2 Preživljavanje višestruko rezistentnih bakterija u različitim vodenim medijima ...	22
3.2.3 Određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) spoja TMPyP3 u različitim medijima .....	23
3.2.4 Fotoinaktivacijski test u različitim medijima .....	28
3.2.5 Statistička obrada podataka .....	28
4. REZULTATI .....	30



4.1	Kemijska analiza komunalne otpadne vode.....	30
4.2	Preživljavanje višestruko rezistentnih bakterija u vodenim medijima .....	31
4.3	Određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) spoja TMPyP3 u različitim medijima .....	34
4.4	Fotoinaktivacijski test u različitim medijima.....	36
4.4.1	Fotoinaktivacijski test u sterilnoj otpadnoj vodi .....	37
4.4.2	Fotoinaktivacijski test u sterilnoj vodi iz slavine .....	45
4.5	Određivanje minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 u različitim medijima .....	53
5.	RASPRAVA.....	56
6.	ZAKLJUČAK.....	59
7.	LITERATURA .....	62
8.	ŽIVOTOPIS .....	66

## 1. UVOD

Otpadne vode nakon procesa pročišćavanja ispuštaju se u morska ili riječna područja. Otpadna voda općenito sadrži visoke koncentracije mikroorganizama, međutim, zbog razrjeđenja s morskom ili riječnom vodom koncentracija mikroorganizama se smanji i takva voda je prihvatljiva u smislu pokazatelja kvalitete. Pojavom različitih mikroorganizama u otpadnoj vodi koji su otporni na različite lijekove donijela je sa sobom pitanje tretira li se otpadna voda na pravilan način, osobito otpadna voda koja potječe iz bolničke sredine. Postoje slučajevi u kojima se bolnička otpadna voda ispušta u javni sustav odvodnje bez provedenog pročišćavanja, što dovodi do toga da se prirodne vode kontaminiraju bolnički rezistentnim bakterijama koje pripadaju rodovima *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* i drugi (1). Osim toga, komunalne otpadne vode mogu sadržavati čitav niz kemijskih zagađivača, kao što su preparati za osobnu njegu, farmaceutski proizvodi, dezinficijensi, antibiotici, antiseptici i drugi. Postoji mogućnost da se gore navedeni zagađivači ne eliminiraju u potpunosti te završe u otpadnim vodama. Kao primjer se mogu uzeti antibiotici, koji kada završe u otpadnim vodama, mogu djelovati dvojako. Ako dospiju u otpadne vode u visokim koncentracijama oni mogu djelovati toksično za patogene i nepatogene mikroorganizme, međutim, ako u otpadne vode dospiju u niskim koncentracijama, antibiotici će mikroorganizmima služiti kao kalup za sintezu gena rezistencije na određeni antibiotik, što je svakim danom sve veći javnozdravstveni problem (2). Današnje metode pročišćavanja komunalne otpadne vode nisu pokazale veliku efikasnost u pogledu pročišćavanja antibiotika, farmaceutika te preparata za osobnu njegu. Mnoga istraživanja dokazuju da se isti zagađivači nalaze u pročišćenim otpadnim vodama, te uz pomoć prirodnih procesa dolaze do pitkih voda (3). Zbog toga javlja se potreba za novim načinima pročišćavanja otpadnih voda koji će pokazati bolju efikasnost, a među njih spada i fotodinamička inaktivacija.

Fotodinamička inaktivacija ili antimikrobna fotodinamička terapija princip svog djelovanja temelji na kombiniranju netoksične komponente kisika, fotosenzibilizatora i svjetlosti koje nakon fotoaktivacije fotosenzibilizatora uzrokuju oksidativni stres i imaju toksično djelovanje na određene stanice (4). Fotodinamička inaktivacija kao takva svoju uporabu je već pronašla

kod liječenja različitih kliničkih oboljenja, a također postoje indikacije u korištenju kod dezinfekcije vode, kod proizvodnje antimikrobnih površina ili kod konzerviranja hrane (5, 6).

## 1.1 Komunalna otpadna voda

Prema „Pravilniku o graničnim vrijednostima opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama“ (NN 94/2008) komunalne otpadne vode pripadaju sanitarnim otpadnim vodama ili su mješavina sanitarnih otpadnih voda s tehnološkim otpadnim vodama i/ili oborinskim vodama određene aglomeracije. To znači da u komunalne otpadne vode spadaju sve vode koje nastaju kao produkt otjecanja oborina, voda koja se koristila u različitim industrijskim pogonima, te voda koja se koristi kod odvodnje fekalija s različitih prostora u kojima ljudi žive ili rade (7).

### 1.1.1 Pročišćavanje otpadnih voda

Pročišćavanje otpadnih voda dijeli se u četiri dijela:

- a) Prethodna obrada
- b) Primarno ili mehaničko pročišćavanje,
- c) Sekundarno ili biološko pročišćavanje,
- d) Tercijarno ili fizikalno – kemijsko pročišćavanje.

Prethodna obrada bazira se na različitim fizikalnim zakonitostima, a cilj prethodne obrade je ukloniti sve tvari koje bi u krajnjem slučaju mogle oštetiti uređaje za primarnu, sekundarnu ili tercijarnu obradu. Kod prethodne obrade najčešće se koriste rešetke i sita za odstranjivanje krupnog otpada (šljunak, mulj, pijesak, komadi drveća i slično), sjekače za usitnjavanje otpada i spremnici za izjednačavanje otpadnih voda (8).

Prema „Pravilniku o graničnim vrijednostima opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama“, (NN 94/2008), primarno pročišćavanje komunalnih otpadnih voda obavlja se uz pomoć fizičkih i/ili kemijskih procesa od kojih se najčešće koristi taloženje suspendiranih tvari, ali i drugi procesi u kojima se BPK<sup>5</sup> (petodnevna biokemijska potrošnja kisika) otpadnih voda smanjuje za 20 %, a ukupne suspendirane tvari najmanje za 50 % (7). Primarna obrada služi za izdvajanje čestica veće (pahuljaste i zrnate) i manje gustoće koje na površinu isplivaju prirodnim ili umjetnim

putem. Veće čestice talože se uz pomoć procesa flokulacije, a manje čestice uz pomoć flotacije, također, u otpadnu vodu mogu se dodavati različita sredstva za koagulaciju kako bi se poboljšalo taloženje, a najčešće se koriste aluminijev (III) sulfat i željezo (II) sulfat (7, 8).

Sekundarno pročišćavanje, ili pod drugim nazivom „biološka obrada“ nastoji uz pomoć različitih mikroorganizama umanjiti vrijednosti suspendiranih tvari i BPK<sup>5</sup> za 70 do 90 %, a vrijednosti KPK (kemijska potrošnja kisika) za 75 % (7). Osnovni mehanizmi biološke obrade vode su aerobna tvorba i razgradnja stanica, anaerobna kisela fermentacija i metansko vrenje, te bakteriološka oksidacija i redukcija (8).

Tercijarno pročišćavanje koristi se u okolnostima kada kvaliteta otpadne vode poslije biološke obrade nije prihvatljiva, ali i u slučajevima kada se otpadna voda ispušta u prirodne recipijente. Svrha tercijarne obrade je poboljšanje svojstava kao što su mutnoća, boja i miris, uklanjanje ili smanjivanje količine soli dušika i fosfora, omogućavanje omekšavanja vode, te dezinfekcija iste. Valja napomenuti da je dezinfekcija posljednji korak kod tercijarne obrade otpadne vode, ali je i jedini obavezni korak. Dezinfekcija se provodi kako bi se smanjio broj mikroorganizama koji bi mogli izazvati bolest kod čovjeka, a s ovim korakom osigurava se zdravstvena ispravnost otpadne vode. Za dezinfekciju se najčešće koriste kombinirane metode, a tu spadaju fizikalne metode (toplina), kemijske metode (upotreba klora, broma ili ozona), metode zračenja (radioaktivni izotopi i UV zračenje), te membranska tehnologija. Kada se kombiniraju gore spomenute metode proces dezinfekcije je jako uspješan, međutim, svakim danom pojavljuje se sve više bakterijskih sojeva koji su rezistentni na određene procese dezinfekcije, što je sve veći javnozdravstveni problem (8, 9).

## 1.2 Bakterijska rezistencija

Pojam „bakterijska rezistencija“ označava otpornost bakterija na određene antibiotike. Prvi prirodni antibiotik otkrio je Alexander Fleming 1929. godine kada su spore plijesni slučajno kontaminirale njegovu ploču za kultiviranje bakterija, a već 1945. godine Fleming je otkrio da pojedine bakterije iz roda *Staphylococcus* stvaraju otpornost na penicilin. Drugo veliko otkriće bilo je 1935. godine kada je Gerhard Domagk sintetizirao prvi sulfonamid (prontosil). Najplodnije razdoblje u proizvodnji antibiotika bilo je od 1949.-1980. godine, a već od 1970.

godine proizvedena su samo 3 antibiotika za sustavnu primjenu protiv gram-pozitivnih bakterija (10). Ova činjenica postaje sve zabrinjavajuća, zbog toga što se svakim danom prijavljuje sve više bakterija koje su rezistentne na antibiotike, a sve veći broj je izvanbolničkog podrijetla. Postoji više čimbenika koji su utjecali na pojavu bakterijske rezistencije, a to su neracionalna upotreba antibiotika, neopravdana primjena antibiotika u liječenju bolesti koje su uzrokovane virusima, te primjena u veterinarskoj praksi i prehrambenoj industriji.

Postoji više mehanizama koje bakterije koriste kako bi stvorile rezistenciju na antibiotik, a neki od njih su: enzimi koji razaraju ili modificiraju antibiotik (enzimi poput *N*-acetil transferaze, *O*-fosforotransferaze i *O*-adeniltransferaze), nepropusnost membrane, efluks (pumpa koja izbacuje toksične tvari iz bakterijske stanice), promjena ciljnog mjesta na ribosomu, promjena ciljnih molekula stanične stjenke (11, 12).

### 1.3 *Staphylococcus* spp.

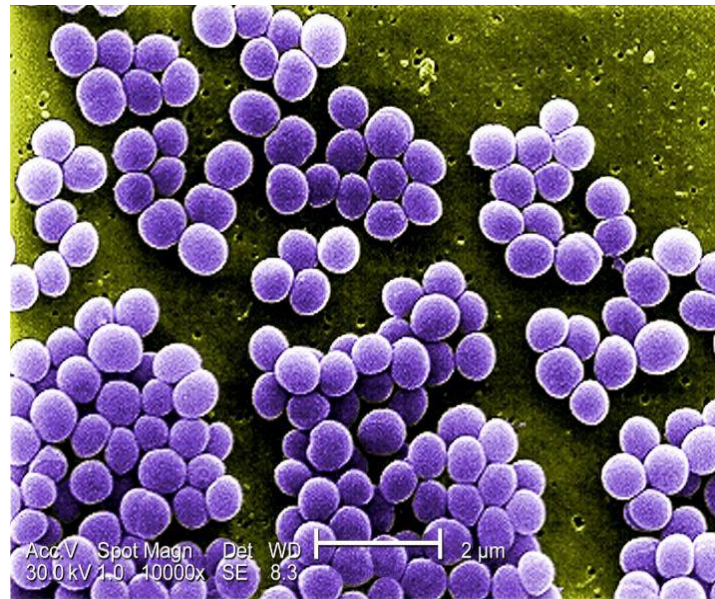
Stafilokoke možemo pronaći gotovo svugdje u prirodi, a češće se mogu pronaći na koži i sluznicama kod čovjeka i životinja, u dišnom, probavnom i mokraćno – spolnom sustavu, a također, mogu se pronaći u vodi i tlu. Prvi ih je otkrio Robert Koch davne 1878. godine (13). Prema posjedovanju enzima koagulaze dijelimo ih na koagulaza negativne stafilokoke, te koagulaza pozitivni stafilokok, *Staphylococcus aureus*.

#### 1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Smatra se jednim od najvažnijih patogena kod ljudi, a najčešće naseljava kožu i sluznice.

*S. aureus* je kuglasta gram-pozitivna bakterija koja nema mogućnost stvaranja spora i kapsula (Slika 1.). Može se pronaći pojedinačno ili u nakupinama u obliku grozda. Uzgaja se na različitim hranjivim podlogama pri optimalnom temperaturnom rasponu od 30 do 37 °C. Kolonije su pravilne, sjajne i glatke, a mogu poprimiti različitu boju od bijele boje do karakteristične – zlatnožute. *S. aureus* može preživjeti u širokom temperaturnom rasponu od 10 do 42 °C. Fakultativni je anaerob, a dobar rast pokazuje i u aerobnim uvjetima. Ima jako složenu

antigensku strukturu, zbog posjedovanja mnoštva polisaharidnih i proteinskih antigena u kapuli, a i zbog toga što izlučuje mnogo egzotoksina i enzima.

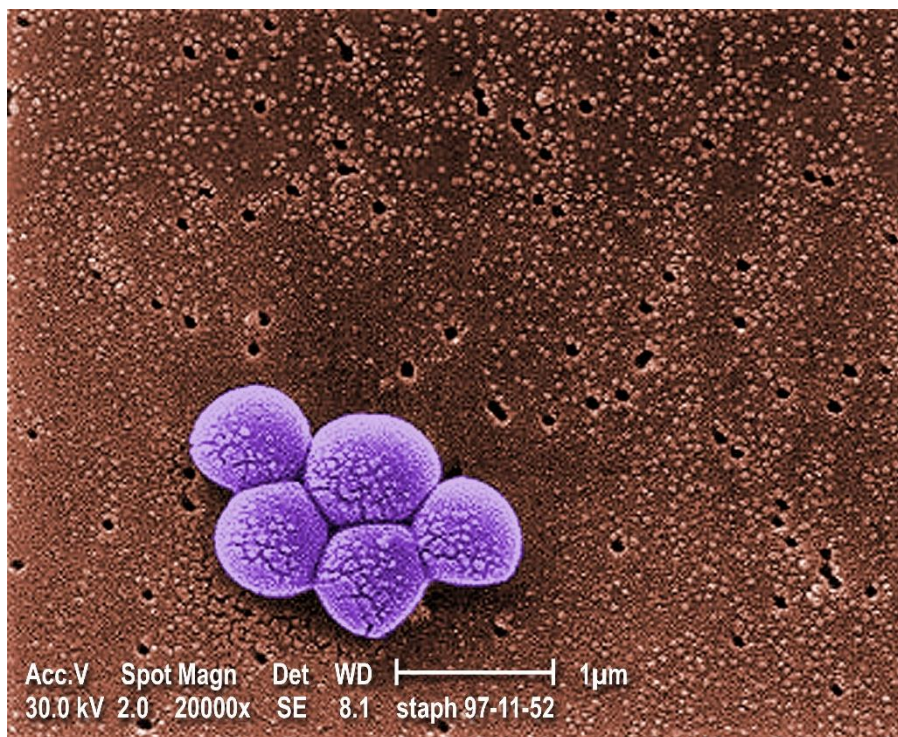


**Slika 1.** Bakterija *S. aureus* pod pretražnim elektronskim mikroskopom, uvećano 10000x (15)

Enterotoksini koje proizvodi *S. aureus* kod ljudi uzrokuju alimentarne intoksikacije, a očituju se akutnim enteritisom s povraćanjem i proljevom. Hrana se kontaminira prilikom obrade u nehygijskim uvjetima rada. Zanimljivo je da ova bakterija pokazuje svojstvo termorezistencije i preživljava temperature do 60 °C kroz 30 minuta. Iako ne stvara spore jako je otporan na vanjske čimbenike u okolišu. Na površinama s organskim onečišćenjem (gnoj) ostaje živ i nakon 2 do 3 mjeseca. Prilikom apliciranja antibiotika jako brzo stvaraju rezistenciju, što rezultira stvaranjem rezistentnih sojeva. Stvaranje brze otpornosti moguće je zbog proizvodnje  $\beta$ -laktamaze, tolerancije (manjak autolizina) i posjedovanja plazmida. *S. aureus* uzrokuje mnoštvo bolesti od trovanja hranom, lokalnih infekcija kože, pa sve do infekcije kirurških rana. Ako liječnik smatra da je bolesnik zaražen izvan-bolničkim stafilocokom, bolesnik se liječi kloksacilinom, ali ako se sumnja na bolničku infekciju stafilocokom najčešći uzročnik je meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (13, 14).

### 1.3.2 Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Zbog svoje sposobnosti da stvori brzu otpornost prema antibioticima već sredinom dvadesetog stoljeća oko 70 % stafilokoka bilo je otporno na penicilin. Stafilokoki proizvode enzim  $\beta$ -laktamazu, što im omogućava ovakav tip rezistencije. Taj enzim uništava penicilin i ostale antibiotike koji se dobivaju iz penicilina. Nakon razvoja rezistencije na penicilin, 1960-ih godina u kliničku uporabu uveo se antibiotik meticilin. Naime, nedugo nakon uvođenja meticilina u široku primjenu stvorila se rezistencija na isti, pa su sojevi otporni na meticilin dobili ime „meticilin rezistentni *S. aureus*“ ili MRSA (Slika 2). Mikroskopski izgled kao i virulencija ove bakterije se ne razlikuje u odnosu na osjetljive sojeve. Ova bakterija svoju rezistenciju može zahvaliti genu *mecA* koji se nalazi na kromosomskoj kazeti SCC*mec* (engl. *Staphylococcal chromosomal cassette mec*). Nakon razvitka rezistencije MRSA se velikom brzinom proširila u bolnicama širom svijeta. 1980-tih prijavljena je rezistencija na makrolide i aminoglikozide, tako da danas možemo govoriti i o „multirezistentnom *S. aureus*“. Do sada jedini djelotvoran lijek protiv MRSA-e ostao je vankomicin, te je on prvi izbor prilikom liječenja ovog uzročnika.



**Slika 2.** Bakterija meticilin rezistentni *S. aureus* pod pretražnim elektronskim mikroskopom, uvećano 20000x (17)

Osoba se može zaraziti meticilin rezistentnim *S. aureus* putem zraka, hrane, različitim predmetima, pa čak i dodiranjem, a izvor zaraze mogu biti pacijent, kliconoše (zdrave osobe koje su inficirane stafilokokom, a tu najčešće ubrajamo zdravstvene radnike i odgajatelje), ali i radnici koji rade na mjestu gdje se vrlo lako infekcija stafilokokom može proširiti (kuhari, sobarice, te srodni poslovi). Postoji mnoštvo primjera koji dokazuju da su kućne životinje, a osobito psi i mačke mogući izvori zaraze za čovjeka (13, 14). MRSA najčešće uzrokuje infekcije rana i tkiva nakon kirurških zahvata, infekcije krvotoka primjenom centralnog venskog katetera, te upale pluća povezanih s intubacijom (16).

#### 1.4 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* pripada porodici enterobakterija, a opisana je kao gram-negativna, inkapsulirana i nepokretna bakterija (Slika 3.). Dio je ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) grupe bakterija koje uzrokuju oko 2/3 svih infekcija, uključujući bolničke infekcije. Fakultativni je anaerob, što znači da može rasti u prisustvu kisika, ali i bez njega. Stanovnik je normalne mikrobiote usta, kože i crijeva. Zaraza s *K. pneumoniae* najčešće se pojavljuje kao bolnička infekcija, odnosno kao posljedica boravka u zdravstvenim ustanovama gdje može uzrokovati čitav niz infekcija od kojih se ističu upala pluća, infekcije urinarnog trakta, dijareja i meningitis. Urinarni kateteri navode se kao uređaji koji povećavaju rizik od infekcije tim putem. Najrizičnija skupina ljudi su imunokompromitirani pacijenti. Glavni izvor zaraze s ovom bakterijom u bolničkim sredinama su gastrointestinalni traktovi pacijenata i zaposlenika, te ruke zaposlenika. Stoga se kao glavna mjera prevencije zaraze s *K. pneumoniae* ističe pranje ruku.

Kao jedna od metoda razaranja biofilma *K. pneumoniae* sve više se istražuje dezinfekcija plinovitim ozonom. Dokazano je da ozon sa svojim antimikrobnim i dezinfekcijskim svojstvima može smanjiti broj prisutnih bakterija u biofilmu za do 99,76 %. Međutim, za potpuno uništavanje biofilma, sam tretman ozonom kroz 1 ili 2 sata nije dovoljan. Preporuka je kombinirati tretman ozonom s nekom od tradicionalnih metoda dezinfekcije (18).



Patogenosti klebsijele doprinose O i K antigeni. O antigen je sastavni dio lipopolisaharida, a K antigen je kapsularni polisaharid (19).

Virulentnost bakterije posljedica je različitih čimbenika koji omogućuju bakteriji da izazove infekciju i rezistentnost na lijekove. *K. pneumoniae* proizvodi  $\beta$ -laktamazu koja razara  $\beta$ -laktamski prsten kod antibiotika. 1983. godine u Europi se pojavila  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra ili ESBL koja uništava oksimino – cefalosporine i tako stvara rezistenciju na cefalosporine treće generacije. Kao prvi lijek izbora smatraju se karbapenemi, ali već je prijavljeno mnoštvo slučajeva gdje se prikazuje rezistentnost ESBL na karbapeneme. Upala pluća uzrokovana bakterijom *K. pneumoniae* dijeli se na izvanbolničke i bolničke, međutim, valja napomenuti kako je izvanbolnička upala pluća uzrokovana ovom bakterijom jako rijetka (između 3 do 5%). Međutim, *K. pneumoniae* čini oko 12% svih bolničkih upala pluća, a stopa mortaliteta kod alkoholičara i osoba sa septicemijom je u rasponu od 50 do 100 % (20).



**Slika 3.** Bakterija *K. pneumoniae* pod pretražnim elektronskim mikroskopom, uvećano 10000x (21)

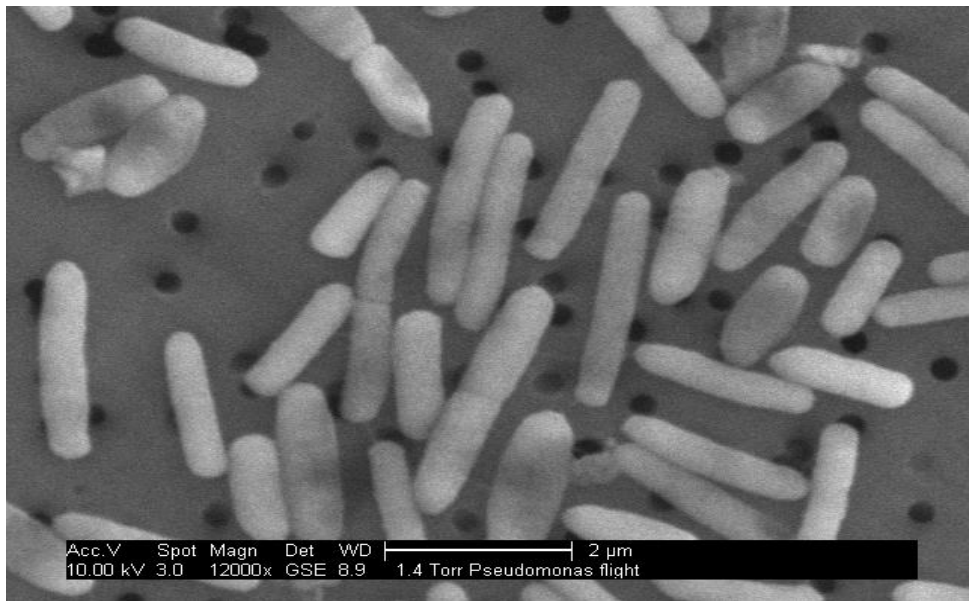
### 1.5 Karbapenemaza producirajuća *K. pneumoniae*

Karbapenemaze molekularnog razreda D spadaju u klasične oksacilinaze koje označavamo s kraticom OXA, a tu spadaju (OXA-1, OXA-2, OXA-10), ali neke oksacilinaze pokazuju hidrolitičku aktivnost prema karbapenemima, a to je OXA-48. Otpornost prema karbapenemima nastaje kombinacijom različitih obrambenih mehanizama, a to su: pojačan efluks (mehanizam koji izbacuje lijek iz stanice), smanjena propusnost stanične stijenke produkcijom ESBL enzima, proizvodnja karbapenemaza i dr. OXA-48 karbapenemaze su najčešće karbapenemaze kod gram-negativnih enterobakterija. OXA-48 enzimi mogu se pronaći u bakterijama *Escherichia coli* i *K. pneumoniae*, a geografski najveća pojavnost zabilježena je na području Europe, Sjeverne Afrike te Bliskog Istoka. Taj razred rezistentan je, osim na karbapeneme, na peniciline, cefalosporine i aztreonam (22, 23). Rizikni faktori koji potpomažu kolonizaciju i infekciju ovom bakterijom su endoskopija, terapija antibioticima, boravak u jedinici intenzivnog liječenja, invazivni zahvati prilikom hospitalizacije te mehanička ventilacija. Tretman karbapenemaza producirajućih klebsijela predstavlja veliki izazov. Režimi dvostruke i trostruke terapije koji sadrže različite kombinacije antibiotika, od aminoglikozida, karbapenema pa sve do kolistina i fosfomicina, pokazali su umjeren uspjeh s manjom stopom mortaliteta u odnosu na jednostruku terapiju (24).

### 1.6 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* spada u skupinu gram-negativnih, heterotrofnih i pokretnih organizama. Dužine od 1 do 5  $\mu\text{m}$ , a širine od 0,5 do 1  $\mu\text{m}$  (Slika 4.). Pokazuje izrazito dobar rast na 37 °C, a preživljava i u širokom temperaturnom rasponu od 4-42 °C. *P. aeruginosa* kada se nađe u tlu, može biti jako koristan zbog svoje sposobnosti da razgradi policikličke aromatske spojeve (PAH), a također ga se može pronaći u otpadnim vodama, kanalizaciji i sudoperima koji se nalaze u kućanstvima i bolnicama. Smatra se da je ova bakterija jedna od najučestalijih uzročnika bolničkih infekcija s visokom stopom mortaliteta, a zbog svog metabolizma može preživljavati u nepovoljnim uvjetima, a stvara i biofilm. *P. aeruginosa* otporna je na različite vrste antibiotika, a često je nazivaju oportunističkim patogenom jer gotovo uvijek inficira ljude s oslabljenim imunitetom. Najveći rizik za razvijanje infekcije su pacijenti s cističnom

fibrozom, neutropenijom, te pacijenti s opeklinama i ranama koje ne zacjeljuju, a smatra se jednim od glavnih uzročnika upale pluća povezane s mehaničkom ventilacijom. Stopa smrtnosti od zaraze bakterijom *P. aeruginosa* je između 10 i 60 %. Ova bakterija razvila je mnoge mehanizme koji joj pomažu u obrani od antibiotika, a neki od njih su promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika, smanjenje koncentracije antibiotika u stanici (efluks), te inaktivaciju antibiotika bakterijskim enzimima. Zbog svoje rezistencije na antibiotike izbor antibiotika je reduciran, a najčešće se koriste cefalosporini III. i IV. generacije, antipseudomonasni penicilini i fluorokinoloni (25, 26).



**Slika 4.** Bakterija *P. aeruginosa* pod pretražnim elektronskim mikroskopom, uvećano 12000x (27)

### 1.7 Fotodinamička inaktivacija

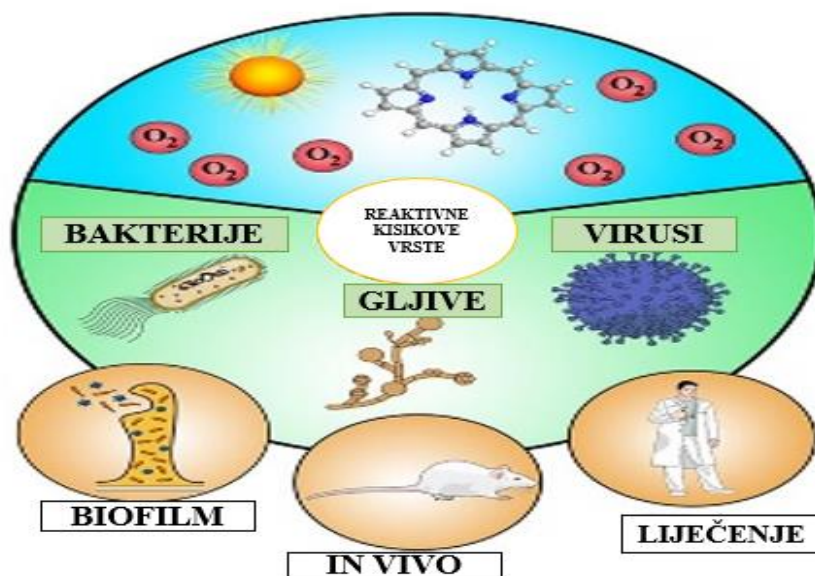
O fotodinamičkom učinku prvi put pisao je Oscar Raaba početkom dvadesetog stoljeća, naime, on je otkrio kako osvjtljavanje mikrobnih kultura u prisutnosti akridinskih spojeva uzrokuje smrt mikroorganizama. Do ovog otkrića došlo se i prije nego je Alexander Fleming otkrio penicilin. S početkom Drugog svjetskog rata vidjelo se da su antibiotici neophodni za liječenje raznih infekcija, pa je proučavanje fotodinamičkog učinka palo u drugi plan, sve do 1960-ih godina kada su Richard Lipson i Samuel Schwartz otkrili da se derivati

hematoporfirina nakupljaju u tumorima, te se mogu koristiti kao fotosenzibilizatori za uništavanje tumorskog tkiva, a danas se zna da se fotodinamička terapija koristi kod liječenja različitih tumora (28).

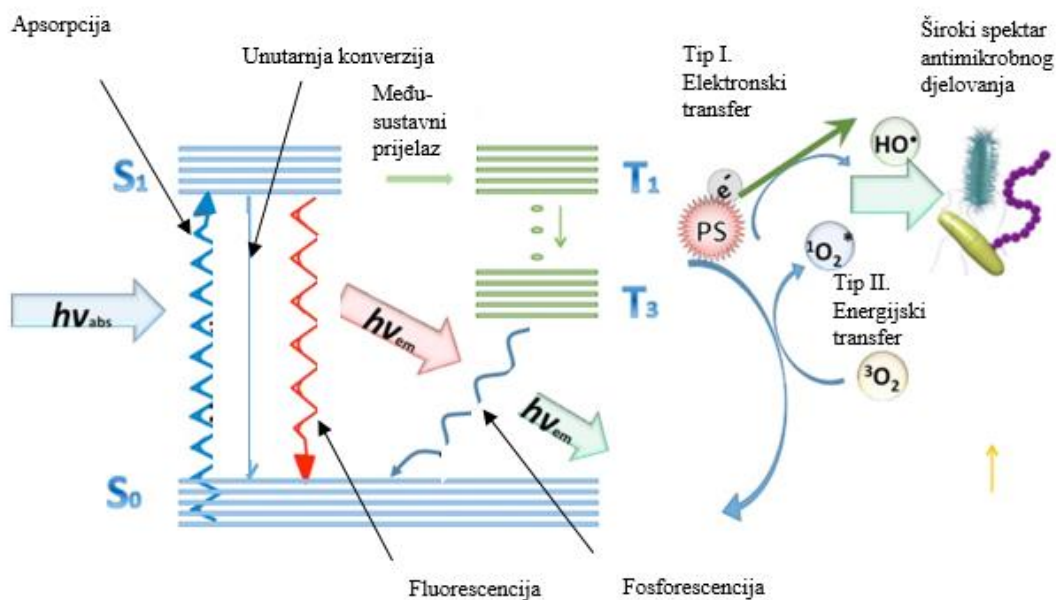
Danas je poznato da je za fotodinamički učinak potrebno tri elementa:

- a) Fotosenzibilizator – koji apsorbira svjetlost,
- b) Izvor svjetlosti – koji emitira svjetlost valne duljine koju apsorbira fotosenzibilizator,
- c) Molekularni kisik.

Ova tri elementa zajedno stvaraju reaktivne kisikove vrste (engl. Reactive oxygen species) (ROS)) (Slika 6.), a većim dijelom stvara se singletni kisik (29). Osnovno tripletno stanje molekularnog kisika podvrgava se međusustavnom prijelazu u pobuđeno singletno stanje, a kisik u tom stanju je izuzetno reaktivan i citotoksičan. Kisik u pobuđenom singletnom stanju je nestabilan i život mu je manji od 1  $\mu$ s. Može se vratiti u osnovno stanje emisijom fotona putem fosforescencije (Slika 7.) (30).



Slika 5. Primjena fotodinamičke inaktivacije (30)



Slika 6. Jablonski dijagram

Fotosenzibilizator u osnovnom stanju apsorbira svjetlost kako bi formirao pobuđeno singletno stanje koje prolazi međusustavni prijelaz kako bi nastalo pobuđeno tripletno stanje. Tripletno stanje može biti podvrgnuto fotokemijskoj reakciji tipa I. (gdje se stvaraju superoksid i/ili hidroksilni radikal) ili fotokemijskoj reakciji tipa II. gdje dolazi do prijenosa energije i tako nastaje singletni kisik (Slika 7.). Kroz ova dva tipa fotokemijskih reakcija reaktivne kisikove vrste mogu uništiti sve vrste mikroorganizama (31)

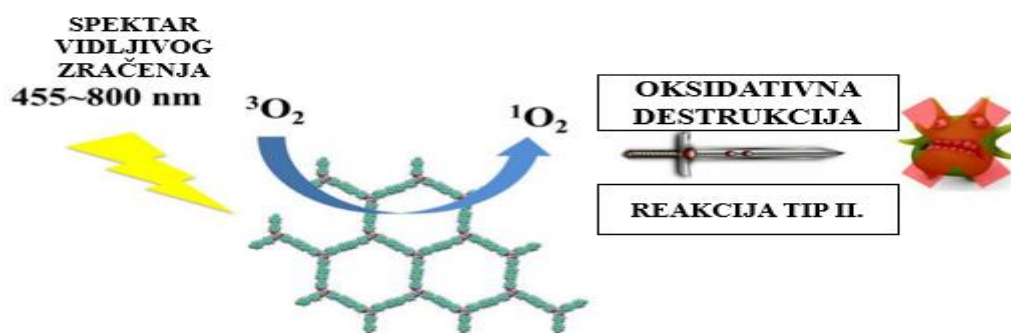
### 1.7.1 Reakcija tipa I.

Reakciju tipa I. karakterizira ovisnost o ciljnoj koncentraciji supstrata. Tripletno stanje fotosenzibilizatora ima mogućnost prenošenja svoje energije u obliku elektrona ili protona na supstrat unutar stanice (npr. u citoplazmi) kako bi proizveo radikalne ione, a ti radikalni ioni dalje reagiraju s kisikom i zajedno tvore reaktivne kisikove vrste (ROS), a neki od njih su superoksidni radikal anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksil radikal ( $OH^\bullet$ ). Prethodno

navedeni radikali imaju mogućnost brzog prolaska kroz stanične membrane, te se ne mogu izbaciti iz stanice, ali mogu i reagirati s različitim organskim supstratima kao što su lipidi, masne kiseline itd. u nizu lančanih reakcija da bi proizveli još citotoksičnih radikala (32). Postoje istraživanja koja tvrde da bakterija može lučiti superoksid dismutaze, katalaze i peroksidaze. Lučenjem ovih enzima bakterija može katalizirati reakciju  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i  $OH\cdot$  u  $H_2O$  i molekularni kisik, te tako stvoriti obrambeni mehanizam protiv aktivnih tvari koje nastaju u fotokemijskoj reakciji tipa I. (33).

### 1.7.2 Reakcija tipa II.

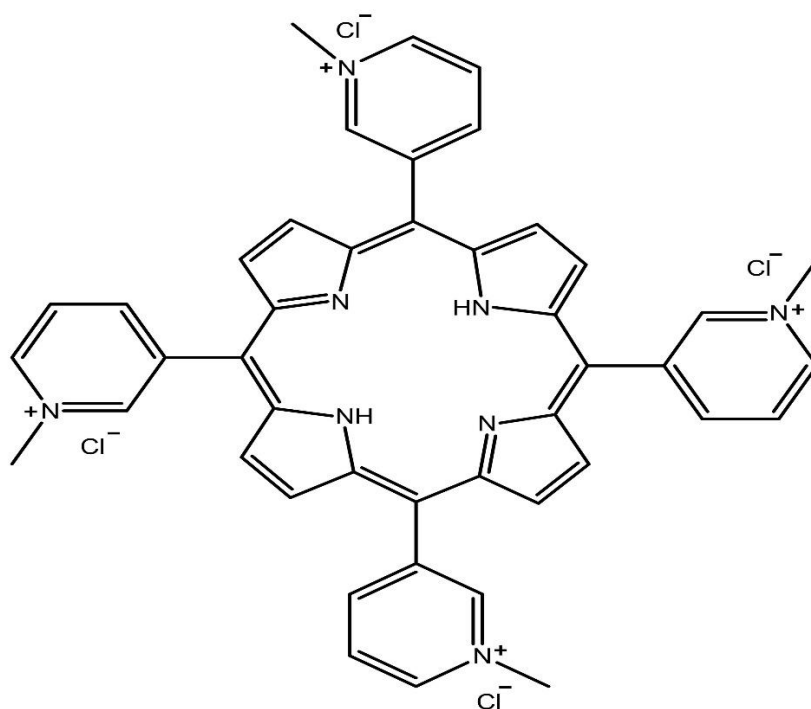
Reakciju tipa II. karakterizira ovisnost o koncentraciji kisika. Tripletno stanje fotosenzibilizatora ima mogućnost prenošenja energije direktno na triplet osnovnog molekularnog kisika koji se nalazi u većini stanica da bi se stvorio pobuđeni singletni kisik (Slika 7.). Reakcija tipa II. za svoje citotoksično djelovanje oslanja se na pobuđeni singletni kisik, naime, pobuđeni singletni kisik u stanici reagira na više ciljnih mjesta kao što su DNA baze, kolesterol i proteini koji se nalaze unutar staničnih membrana (34). Pobuđeni singletni kisik uzrokuje smrt stanice kroz više mehanizama, a neki od njih su oksidacija membranskih lipida i aminokiselina u lipidima, umrežavanje proteina i oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina, također inaktivira antioksidacijske enzime kao što su superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza (30).



Slika 7. Shematski prikaz fotokemijske reakcije tip II. (33)

## 1.8 Porfirini

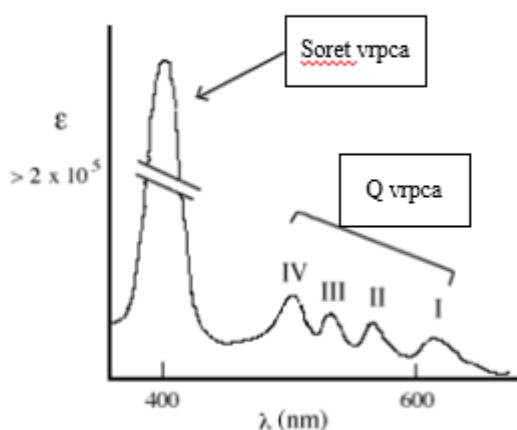
Porfirin dolazi od grčke riječi „porphura“ što znači ljubičast. Porfirini su složeni derivati osnovnog materijala porfina. Porfin sadrži četiri pirolne jedinice spojene metinom, metinski mostovi uspostavljaju konjugirane veze između komponenata pirolskih jezgri, tvoreći prošireni rezonantni sustav (Slika 8.). Porfirini su makrociklički spojevi koji su intenzivno obojeni, a zbog svoje jedinstvene strukture i jako korisnih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstva, kao što je vezanje aniona, stabilizacija metalnih iona s različitim oksidacijskim stanjima, prijenosom elektrona i izgradnjom supramolekulskih sklopova privukli su veliku pozornost. Porfirine pronalazimo i u prirodi gdje imaju bitnu ulogu u transportu kisika (hemoglobin i mioglobin) i u procesu fotosinteze (klorofil) (5, 35, 36, 37).



TMPyP3

**Slika 8.** Strukturni prikaz kationskog porfirina 5,10,15,20 tetrakis – (*N* – metil piridin-3-ij)porfirin tetraklorid (TMPyP3) (38)

Elektronski apsorpcijski spektar tipičnog porfirina sastoji se od snažnog prijelaza iz osnovnog singletnog stanja ( $S_0$ ) u pobuđeno singletno stanje ( $S_2$ ) na oko 400 nm, te nosi naziv Soret ili B vrpca i od slabog prijelaza iz osnovnog singletnog stanja ( $S_0$ ) u pobuđeno singletno stanje ( $S_1$ ) na oko 550 nm, te nosi naziv Q vrpca (Slika 9.) (5).



**Slika 9.** Tipični elektronski apsorpcijski spektar porfirina (39)

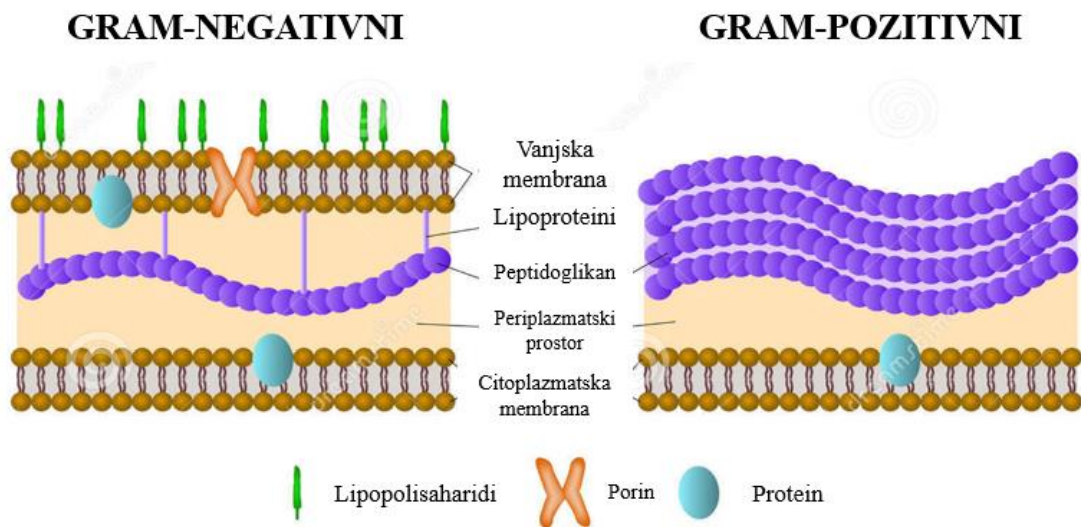
Porfirini su pronašli svoju veliku primjenu kod fotodinamičke inaktivacije zbog toga što djeluju učinkovito na deaktivaciju bakterija, virusa i gljivica, imaju antimikrobni učinak protiv različitih stanja kod mikroorganizama (spore, biofilm i plankton), a fotodinamička inaktivacija može brzo eradikirati mikroorganizme, te je mala šansa za razvijanje rezistencije (40).

### 1.9 Utjecaj fotodinamičke inaktivacije na mikroorganizme

Fotodinamička inaktivacija nema specifične ciljane stanice, pa zbog toga može s jako visokom efikasnošću oksidirati različite vrste bioloških molekula. Kao što je već poznato, gram-negativni mikroorganizmi su značajno otporniji na fotodinamičku inaktivaciju zbog posjedovanja stanične stijenke koja se sastoji od složene vanjske membrane fosfolipida,

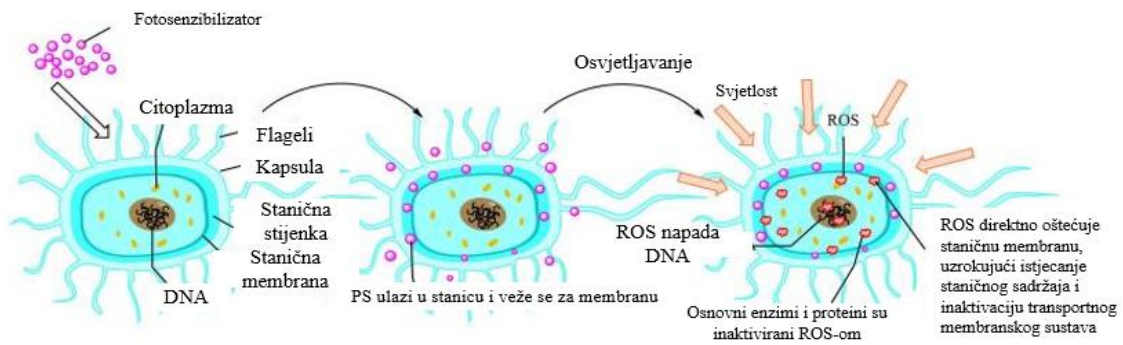


lipopolisaharida, lipidne teihoične kiseline i lipoproteina, dok gram-pozitivni mikroorganizmi imaju deblju staničnu stijenku koja se sastoji od sloja peptidoglikana, koja je čini propusnom, te tako antimikrobne tvari lakše ulaze unutar stanice. Gram-negativne bakterije na svojoj površini su negativnog naboja zbog liposaharidne ovojnice, te zbog toga potrebno je koristiti kationske fotosenzibilizatore, da bi se maksimizirali učinci fotodinamičke inaktivacije (Slika 10.) (41, 42).



**Slika 10.** Shematski prikaz građe gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (43)

U fotodinamičkom inaktivacijskom procesu fotosenzibilizatori se pričvršćuju za staničnu stijenku bakterije kako bi oslobodili reaktivne kisikove vrste (ROS), te tako dodatno uništavaju organele, također, reaktivne kisikove vrste mogu direktno napasti funkcionalne i strukturne stanične komponente. Postoji više mehanizama uz pomoć kojih fotosenzibilizator može oštetiti bakterijsku stanicu, to su oštećenje DNA i oštećenje stanične membrane (Slika 11.) (41).



**Slika 11.** Shematski prikaz prodora fotosenzibilizatora u bakterijsku stanicu (41)

**ROS** – (engl. Reactive Oxygen Species) – reaktivne kisikove vrste, **DNA** – deoksiribonukleinska kiselina, **PS** (engl. Photosensitizer) - fotosenzibilizator

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je ispitati preživljavanje različitih višestruko rezistentnih bakterija u različitim vodenim medijima s naglaskom na komunalnim vodama, zatim određivanje minimalne efektivne koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 u različitim vodenim medijima, određivanje minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 u različitim vodenim medijima i provesti fotoinaktivacijski test na višestruko rezistentnim bakterijama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali i uređaji

- Filter papir,
- Staklene laboratorijske boce,
- Staklene epruvete s čepom (15 mL),
- Stalak za epruvete,
- Plastične i metalne mikrobiološke ušice,
- Šprice (5-10 mL),
- Sterilni mikrofilter za šprice (0,25  $\mu\text{m}$ ),
- Kadice,
- 0,8 % fiziološka otopina,
- Hranjiva podloga Mueller – Hinton,
- Krvni, kromogeni i Pseudomonas agar,
- Plastične petrijeve posude,
- Plamenik (Bunsen poligas, Madrid, Španjolska),
- Plastične kivete za spektrofotometar,
- Spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- Miješalica (Kartell TK3S, Milano, Italija),
- Mikrotitarske ploče s ravnim i okruglim dnom (96 well, ROLL, Piove di Sacco, Italija),
- Nastavci za pipete 2-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- Automatske mikropipete 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-100  $\mu\text{L}$ , 50-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- Multikanalna pipeta 0,5-300  $\mu\text{L}$  (Transferpette S-8, Wertheim, Njemačka),
- Inkubator tresilica (Heidolph UNIMAX 1010, Schwabach, Njemačka),
- LED (engl. light-emitting diode) lampa – Laboratorij za fotoniku i kvantnu optiku, Zavod za eksperimentalnu fiziku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska (395 nm, 40 mW/cm<sup>2</sup>),
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin – BactoSonic, Berlin, Njemačka),
- Aluminijska folija i parafilm,

- Inkubator (Termo – medicinski aparati, Bodalec & Havočić, Dugo Selo – Zagreb, Hrvatska).

### 3.1.1 Filtrirana i autoklavirana komunalna otpadna voda

U svrhu ovog istraživanja, korišten je uzorak komunalne otpadne vode dobiven od Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije sa središnjeg uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Rijeke i njene okolice, Delta. Dobiveni uzorak filtriran je kako bi se uklonile suspendirane tvari, filtrirana komunalna otpadna voda izložena je sterilizaciji pri temperaturi od 121 °C, tlaku od 1,2 bara u trajanju od 20 minuta kako bi se uklonili svi mikroorganizmi. Sterilna komunalna otpadna voda čuvana je u hladnjaku na +4 °C.

### 3.1.2 Autoklavirana voda iz slavine

Za potrebe istraživanja korištena je riječka vodovodna voda koja je podvrgnuta sterilizaciji pri temperaturi od 121 °C, tlaku od 1,2 bara u trajanju od 20 minuta. Sterilna voda iz slavine čuvana je u hladnjaku na +4 °C.

### 3.1.3 Bakterijski sojevi

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su klinički izolati bakterija *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* OXA NTCT 13442, *Staphylococcus aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* ATCC 43360 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850. Bakterije su uz pomoć mikrobiološke ušice inokulirane na krvni agar, te inkubirane 24 sata na 37±2 °C u inkubatoru (Termo – medicinski aparati, Bodalec & Havočić, Dugo Selo – Zagreb, Hrvatska).

### 3.1.4 5,10,15,20 tetrakis – (N – metilpiridin-3-ij)porfirin tetraklorid

U ovom istraživanju za potrebe fotodinamičke inaktivacije koristio se kationski hidrofilni 5, 10, 15, 20 tetrakis – (N – metilpiridin-3ij)porfirin tetraklorid ili TMPyP3, molarne mase 820, 638 g/mol. Ovaj fotosenzibilizator sintetiziran je na Odjelu za biotehnologiju na Sveučilištu u Rijeci u grupi izv. prof. dr. sc. Nele Malatesti. Pripravljena je stock otopina molarne koncentracije 200

$\mu\text{M}$  (stock otopina dobivena je otapanjem 2,7 mg spoja TMPyP3 u 16 mL sterilne vode iz slavine), nakon toga, stock otopina je profiltrirana i zaštićena od svjetlosti uz pomoć aluminijske folije, te čuvana u hladnjaku na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Kemijska analiza komunalne otpadne vode

Na Odsjeku za kontrolu otpada i otpadnih voda Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije odrađena je kemijska analiza uzorka komunalne otpadne vode, a u tablici 1. navedeni su analizirani parametri i korištene metode za dobivanje istih.

**Tablica 1.** Prikaz parametara i metoda fizikalno – kemijske analize otpadnih voda

PARAMETAR	METODA
Temperatura zraka( $^{\circ}\text{C}$ )	SM 23rd Ed. 2017:2550
Temperatura vode ( $^{\circ}\text{C}$ )	SM 23rd Ed. 2017:2550 B
Protok (L/s)	-
pH	HRN EN ISO 10523:2012
Temperatura mjerenja pH ( $^{\circ}\text{C}$ )	-
Elektrovodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	HRN EN 27888:2008
Temperatura mjerenja EV( $^{\circ}\text{C}$ )	-
Vidljiva otpadna tvar	-
Miris vode	-
Otopljeni kisik (mg/L kao $\text{O}_2$ )	HRN EN 25813:2003
KPK ( mg/L kao $\text{O}_2$ )	HRN ISO 15705:2003
BPK5 ( mg/L kao $\text{O}_2$ )	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 detergents (mg/L)	HRN EN 903:2002
Kationski detergents (mg/L)	The Testing of Water 10th Ed. E.Merck
Neionski detergents (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

<b>Nitriti ( mg/L kao N )</b>	HRN EN 26777:1998
<b>Nitrati ( mg/L kao N )</b>	SM 23rd Ed. 2017:4500-NO3 B
<b>Kjeldahl dušik ( mg/L kao N )</b>	HRN EN 25663:2008
<b>Ukupni dušik ( mg/L kao N )</b>	P 5.4/197-230 (izdanje 1)
<b>Fosfati ( mg/L kao P )</b>	HRN EN ISO 6878:2008
<b>Ukupni fosfor ( mg/L kao P )</b>	HACH, LCK 349, P 5.4/165-230 (izdanje 2)
<b>AOX (mg/L)</b>	HACH, LCK 390, P 5.4/137-230 (izdanje 2)
<b>Boja (mg/L Pt)</b>	HRN EN ISO 7887:2012
<b>Ukupni koliformi cfu/100 mL</b>	SM 23rd Ed. 2017:9222 B
<b>Fekalni koliformi cfu/100 mL</b>	SM 23rd Ed. 2017:9222 D
<b>Zn (mg/L)</b>	HRN EN ISO 17294-2:2016
<b>Cd (mg/L)</b>	HRN EN ISO 17294-2:2016
<b>Cr (mg/L)</b>	HRN EN ISO 17294-2:2016
<b>Pb (mg/L)</b>	HRN EN ISO 17294-2:2016
<b>Hg (mg/L)</b>	AMA 254 Hg, P 5.4/146-270 (izdanje 3)

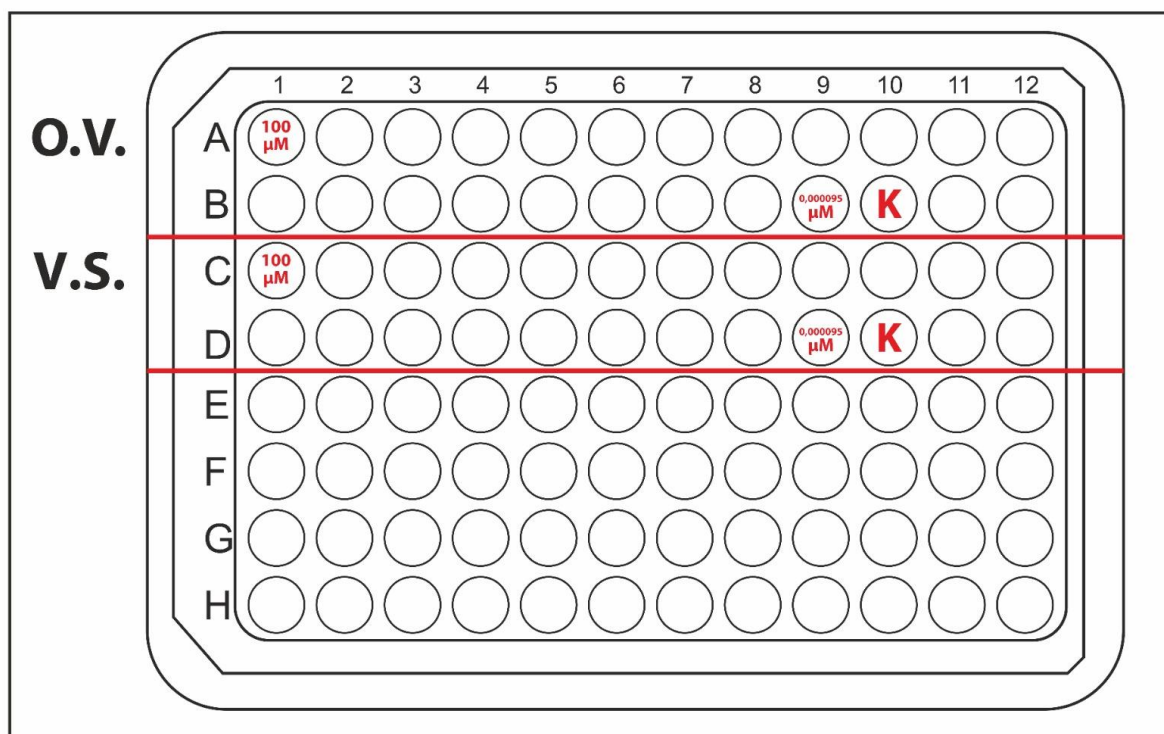
### 3.2.2 Preživljavanje višestruko rezistentnih bakterija u različitim vodenim medijima

Prilikom ispitivanja preživljavanja odabranih bakterija u vodenom mediju korištene su bakterijske kulture *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442, *S. aureus* ATCC 24213 i meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360. U sterilne staklene epruvete stavljeno je 3,0 mL 0,8 % fiziološke otopine, te uz pomoć sterilne mikrobiološke ušice dodani su odgovarajući sojevi kako bi se dobila bakterijska suspenzija koncentracije  $10^8$  CFU/mL, što je ekvivalent optičke gustoće (OD – Optical Density) od 0,2 koja se mjerila pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) uz pomoć spektrofotometra (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Za slijepu probu korištena je 0,8 % fiziološka otopina. Ovako pripremljena suspenzija homogenizirana je miješalicom (Kartell TK3S, Milano, Italija), a zatim razrijeđena do  $10^6$  CFU/mL, te se ova koncentracija koristila kao početna koncentracija tijekom ovog istraživanja. Volumen od 1 mL pripremljene bakterijske suspenzije dodan je u odgovarajuće sterilne plastične epruvete u kojima se nalazilo 9 mL filtrirane i sterilizirane komunalne otpadne vode ili 9 mL sterilizirane vode iz slavine. Iz svakog uzorka na sterilnoj mikrotitarskoj ploči (ROLL, Piove di Sacco, Italija) napravljeno je pet deseterostrukih razrjeđenja. Početne otopine i sva urađena razrjeđenja nasadeni su na Mueller – Hinton agar i inkubirani na 37 °C kroz 24 sata kako bi se odredio kvantitet bakterijskih stanica. Ovaj postupak ponovljen je nakon 1., 3., 5., 7., 9., 14. dana od

pripreme uzorka da bi se dobila krivulja preživljavanja navedenih bakterija u različitim vodenim medijima. Tijekom provedbe ovog istraživanja gore navedeni uzorci čuvani su u inkubatoru na 30 °C.

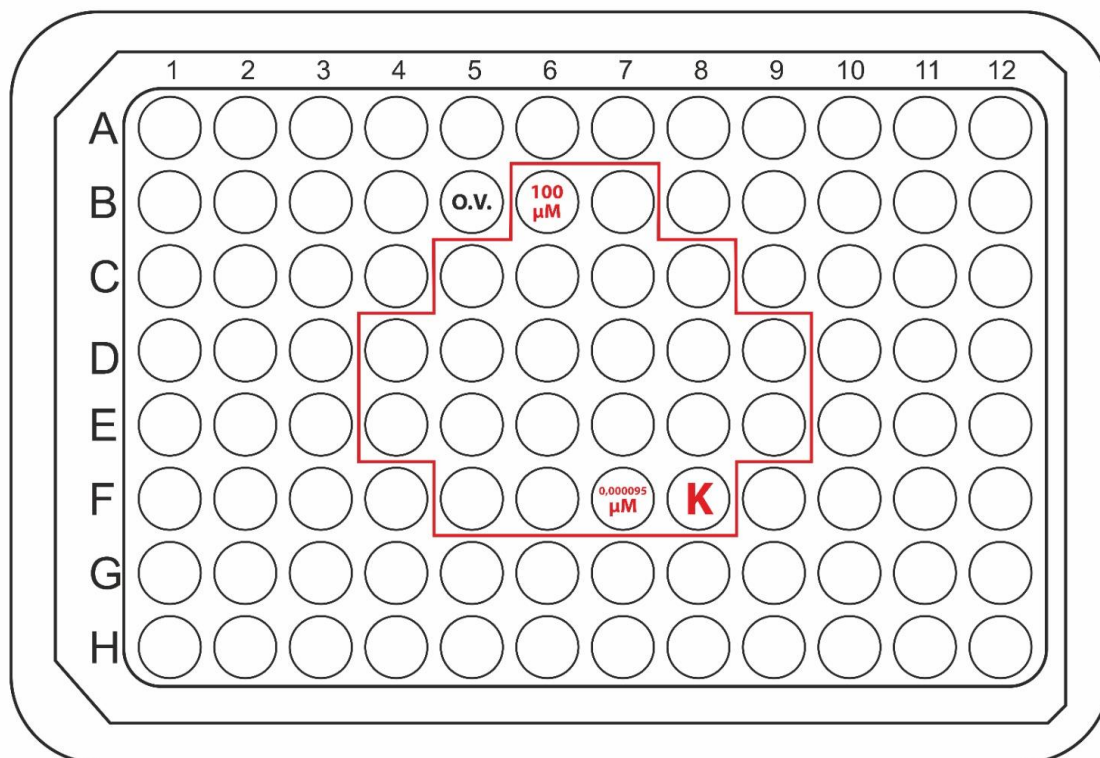
### 3.2.3 Određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) spoja TMPyP3 u različitim medijima

Minimalna efektivna koncentracija (MEK) je najmanja koncentracija nekog spoja gdje je jasno vidljiv prestanak rasta mikroorganizama. Minimalna efektivna koncentracija određivana je na *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442, *S. aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentnom *S. aureus* ATCC 43360 i *P. aeruginosa* ATCC 27850. Pripravljene su bakterijske suspenzije gore navedenih bakterija u filtriranoj sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine u koncentraciji od  $10^6$  CFU/mL. U sterilnoj mikrotitarskoj ploči (ROLL, Piove di Saco, Italija) napravljena je serija dvostrukih razrjeđenja kationskog porfirina TMPyP3 u koncentracijskom rasponu od 100  $\mu$ M – 0,000095  $\mu$ M.





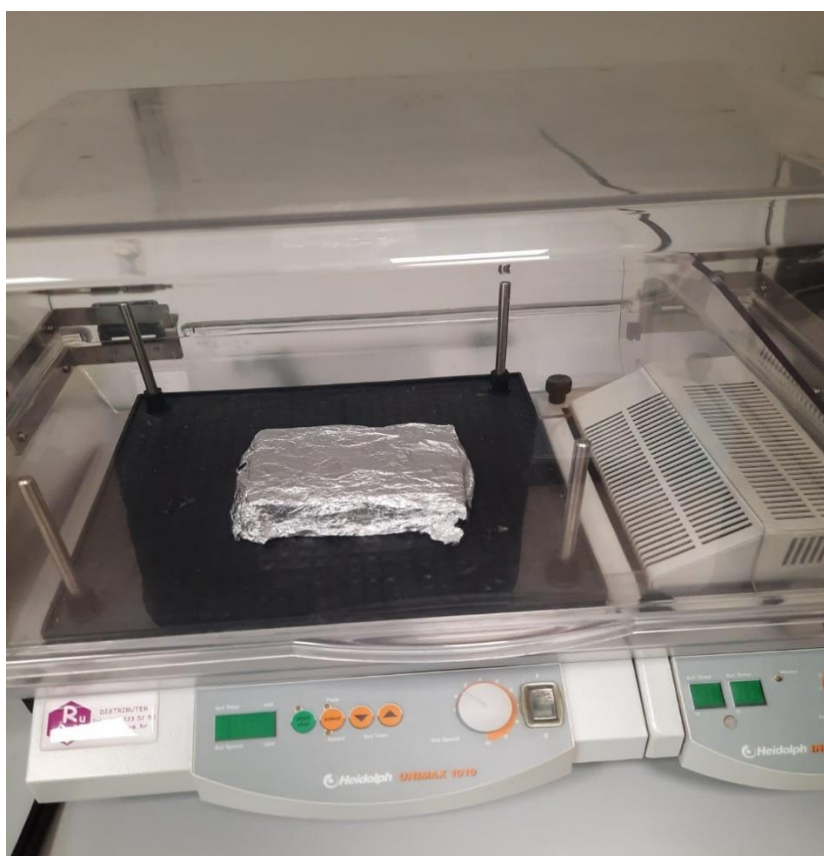
**Slika 12.** Shematski prikaz mikrotitarske ploče na kojoj je određivana minimalna efektivna koncentracija (MEK) kationskog porfirina TMPyP3, bez izlaganja ispitivanih uzoraka izvoru ljubičaste svjetlosti. **O.V.** – komunalna otpadna voda, **V.S.** – voda iz slavine, **K** – kontrola



**Slika 13.** Shematski prikaz mikrotitarske ploče na kojoj su određivane minimalne efektivne koncentracije (MEK) kationskog porfirina TMPyP3, gdje su ispitivani uzorci izlagani ljubičastoj svjetlosti (valne duljine od 395 nm, intenziteta svjetlosti od 20 mW/cm<sup>2</sup> i ukupne doze svjetlosti od 12 J/cm<sup>2</sup>). **O.V.** – komunalna otpadna voda, **K** – kontrola

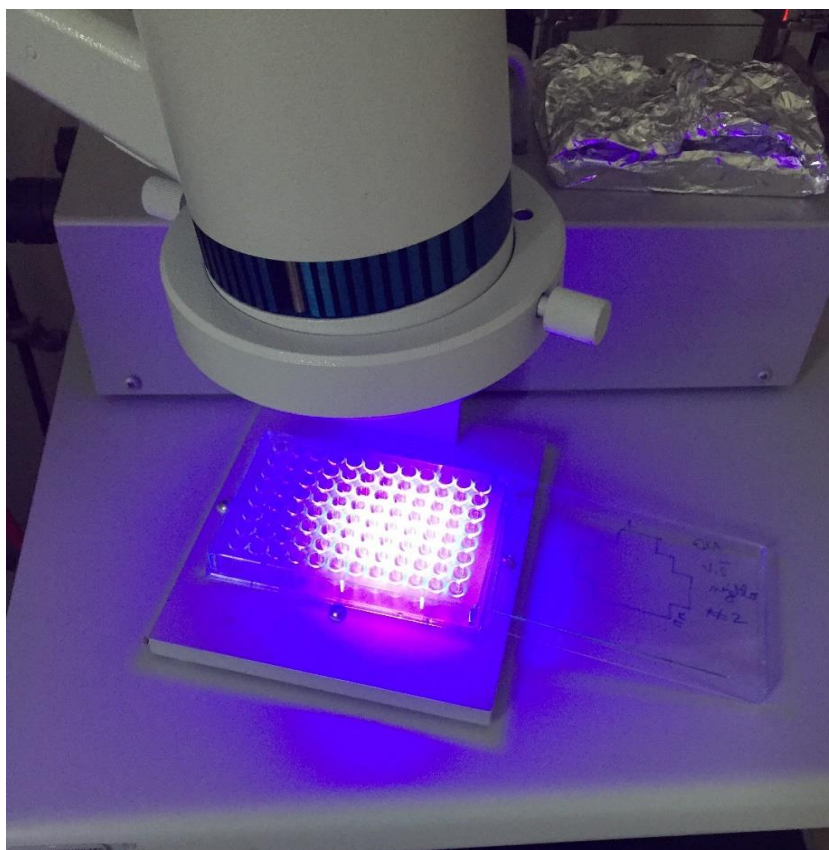
Za određivanje minimalne efektivne koncentracije u mraku, odnosno, bez izlaganja ispitivanih uzoraka izvoru ljubičaste svjetlosti razrjeđenja za svaku kombinaciju bakterija i ispitivanog medija napravljena su u dva reda mikrotitarske ploče (Slika 12.).

S obzirom na to da, izvor svjetlosti koji je korišten u ovom eksperimentu ravnomjerno osvjetljava određena područja na mikrotitarskoj ploči, serijska razrjeđenja za određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) na svjetlu rađena su u označenom području na mikrotitarskoj ploči gdje izvor ljubičaste svjetlosti LED lampe jednakomjerno osvjetljava (Slika 13). Također, na slici 13 označena jažica sa slovom K služila je kao kontrola, u kojoj se nalazio uzorak bakterijske suspenzije bez prisutnosti kationskog porfirina. Po završetku pripreme serijskih razrjeđenja kationskog porfirina, u sve jažice, izuzev kontrolne, dodano je 50  $\mu\text{L}$  odgovarajuće bakterijske suspenzije ( $10^6$  CFU/mL), koja je kao i razrjeđenja kationskog porfirina pripravljena u sterilnoj otpadnoj vodi i vodi iz slavine. Takvi uzorci zamotani su aluminijskom folijom zbog što manjeg prisustva svjetla i inkubirani u tresilici (Heidolph UNIMAX 1010, Schwabach, Njemačka) u vremenskom intervalu od pola sata (Slika 14.).

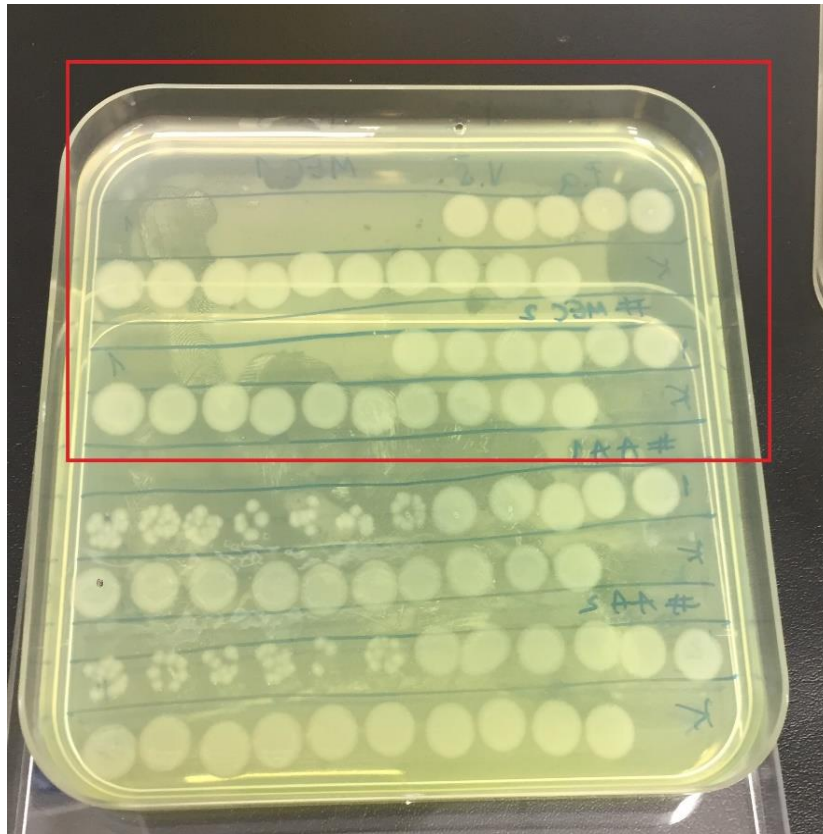


**Slika 14.** Prikaz inkubator tresilice (Heidolph UNIMAX 1010, Schwabach, Njemačka) u kojoj su uzorci inkubirani u mraku, pri sobnoj temperaturi, u vremenskom intervalu od pola sata

Poslije inkubacije uzorci su izloženi izvoru ljubičaste svjetlosti (valne duljine od 395 nm, intenziteta svjetlosti od  $20 \text{ mW/cm}^2$  i ukupne doze svjetlosti od  $12 \text{ J/cm}^2$ ) u vremenskom intervalu od 10 minuta (Slika 15.). Nakon osvjetljavanja, mikrotitarska ploča s odgovarajućim uzorkom, opet je zamotana u aluminijsku foliju i stavljena u inkubator na 24 sata, pri temperaturi od  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poslije inkubacijskog perioda od 24 sata,  $10 \mu\text{L}$  svakog uzorka nasađeno je na Mueller – Hinton agar u duplikatu, isti postupak ponovljen je i za određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) kationskog porfirina u mraku, s tim da uzorak nije izlagan izvoru ljubičaste svjetlosti.



**Slika 15.** Prikaz LED lampe koja se koristila kao izvor ljubičaste svjetlosti u provedenom eksperimentu.



**Slika 16.** Reprezentativni prikaz dobivenih rezultata minimalne efektivne koncentracije (MEK) kationskog porfirina TMPyP3 na Mueller – Hinton agaru.

Za određivanje minimalne anti-adhezivne koncentracije slijedio je isti postupak kao i kod određivanja minimalne efektivne koncentracije osim što su nakon 24 sata ispitivani uzorci u mikrotitarskim pločama ispirani dva puta sterilnom vodom iz slavine, da bi se uklonile sve bakterije koje nisu adherirane na površini jažice. Poslije ispiranja, rubovi mikrotitarske ploče oblijepljeni su parafilmom, da bi se spriječilo prodiranje vode u mikrotitarsku ploču, a potom su mikrotitarske ploče prebačene u ultrazvučnu kupelj (Bandelin – BactoSonic, Berlin, Njemačka). Ispitivani uzorci su sonificirani pri frekvenciji od 40 kHz i snazi od 200 W u vremenskom intervalu od 1 minute. Ovaj proces je korišten da bi se sve bakterije koje su adherirane na površini jažica odlijepile. Pomoću pipete ispitivani uzorci su resuspendirani, a stijenke jažica su sastrugane i uzorci su nasađeni na Mueller – Hinton agar. Ploča s uzorkom je stavljena u inkubator na  $37 \pm 2$  °C kroz 24 sata. Isti postupak ponovljen je i za ispitivanje

minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 u mraku, s tim da uzorak nije izlagan izvoru ljubičaste svjetlosti.

#### 3.2.4 Fotoinaktivacijski test u različitim medijima

Kako bi se proveo fotoinaktivacijski test, kationski porfirin TMPyP3 (stock otopine 200  $\mu\text{M}$ ) razrijeđen je sa sterilnom vodom iz slavine na 0,5xMEK, 1xMEK i 2xMEK vrijednosti, a potrebne bakterijske suspenzije pripremljene su u komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine u koncentraciji od  $10^6$  CFU/mL. Volumen od 50  $\mu\text{L}$  kationskog porfirina odgovarajućih koncentracija i 50  $\mu\text{L}$  odgovarajuće bakterijske suspenzije dodan je u mikrotitarsku ploču (ROLL, Piove di Sacco, Italija). Mikrotitarska ploča zajedno s odgovarajućom bakterijskom suspenzijom i koncentracijom kationskog porfirina prekrivena je aluminijskom folijom i stavljena u inkubator tresilicu (Heidolph UNIMAX 1010, Schwabach, Njemačka) u vremenskom intervalu od trideset minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što je prošlo vrijeme inkubacije, mikrotitarska ploča izložena je izvoru ljubičaste svjetlosti LED lampe (valne duljine od 395 nm, intenziteta svjetlosti od  $20 \text{ mW/cm}^2$  i ukupne doze svjetlosti od  $12 \text{ J/cm}^2$ ) u vremenskim intervalima od 15, 30 i 60 minuta. Prilikom ozračivanja u gore navedenim vremenskim intervalima uzeto je 100  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg uzorka, te 20  $\mu\text{L}$  istog uzorka da bi se pripremila serija deseterostrukih razrjeđenja i nasadila na Mueller – Hinton agar, a tako nasadene hranjive podloge stavljene su u inkubator (Termo – medicinski aparati, Bodalec & Havočić, Dugo Selo – Zagreb, Hrvatska) na  $37 \pm 2$  °C kroz 24 sata. Sva istraživanja rađena su u duplikatu.

#### 3.2.5 Statistička obrada podataka

Rezultati dobivenih analiza statistički su obrađeni u računalnom programu „Microsoft Excel 2013.“. Vrijednosti na grafikonima prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Iz rezultata dobivenih fotoinaktivacijskim testom izračunat je postotak inhibicije rasta bakterija *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442, , *S. aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 i *P. aeruginosa* ATCC 27850. Postotak inhibicije izračunat je uz pomoć formule:

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

Potom je iz % poraslih bakterija izračunat % inhibicije uz pomoć formule:

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

## 4. REZULTATI

### 4.1 Kemijska analiza komunalne otpadne vode

Rezultati analize fizikalno – kemijskih parametara komunalne otpadne vode obrađeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Prikaz rezultata fizikalno-kemijske analize komunalne otpadne vode

Temperatura zraka:		10,0 °C	Temperatura vode:	<b>GV</b> <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)		475	Zn (mg/L)	<b>2</b>	0,478
pH	<b>6,5-9,0</b>	7,43	Cd (mg/L)	<b>0,1</b>	0,0004
Temp. mjerenja pH (°C)		24,2	Cr (mg/L)	<b>0,5</b>	0,054
Elektrovodljivost (µS/cm)		25373	Pb (mg/L)	<b>0,5</b>	0,012
Temp. mjerenja EV(°C)		25,4	Hg (mg/L)	<b>0,01</b>	<0,00025
Vidljiva otpadna tvar		sitne plivajuće čestice	AOX (mg/l)	<b>0,5</b>	1,30
Miris vode		po fekalnoj tvari	Boja (mg/L Pt)		67
Otopljeni kisik (mg/L kao O <sub>2</sub> )		2,1	-		
KPK ( mg/L kao O <sub>2</sub> )	<b>125</b>	356	-		
BPK5 ( mg/L kao O <sub>2</sub> )	<b>25</b>	150	-		
Ukupne krutine (mg/L)		23199	-		
Suspendirana tvar (mg/L)	<b>35</b>	426	-		
Taložna tvar (mL/L)	<b>0,5</b>	8,0	-		
Kloridi (mg/L)		8901	-		
Ukupne masti i ulja (mg/L)	<b>20</b>	15,1	-		
Fenoli (mg/L)	<b>0,1</b>	0,008	-		
Anionski detergentski (mg/L)	<b>1</b>	1,28	-		
Kationski detergentski (mg/L)	<b>0,5</b>	0,50	-		
Neionski detergentski (mg/L)	<b>1</b>	<0,20	-		
Amonij ion (mg/L)	<b>10</b>	12,5	-		
Nitriti ( mg/L kao N )	<b>1</b>	0,023	-		
Nitrati ( mg/L kao N )	<b>2</b>	0,41	-		
Kjeldahl dušik ( mg/L kao N)		18,2	-		
Ukupni dušik ( mg/L)	<b>15</b>	18,6	-		

Fosfati ( mg/L kao P)	<b>1</b>	0,733	-		
Ukupni fosfor ( mg/L)	<b>2</b>	3,93	-		

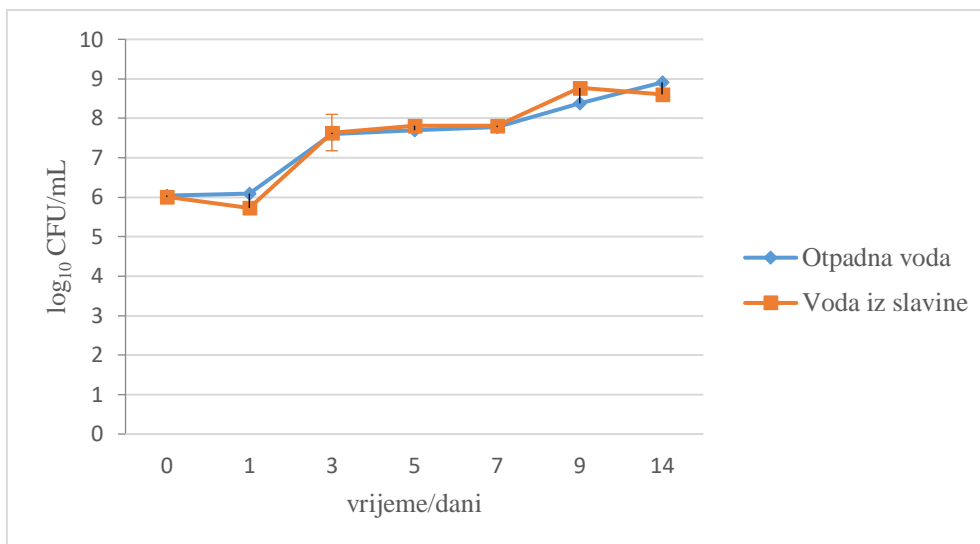
**GV-** granična vrijednost

Analizom fizikalno – kemijskih parametara u komunalnoj otpadnoj vodi na Nastavnom Zavod za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije. Usporedbom rezultata dobivenih analizom i graničnih vrijednosti propisanih Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020) (49) vidljivo je da 9 parametara premašuje granične vrijednosti, neki od njih su BPK<sup>5</sup> (koji pokazuje količinu razgradive organske tvari u vodi), KPK (pokazuje količinu nerazgradive organske tvari u vodi), suspendirana tvar, taložna tvar, anionski detergentski amonij ion, ukupni dušik, ukupni fosfor i AOX (adsorbabilni organski halogenidi).

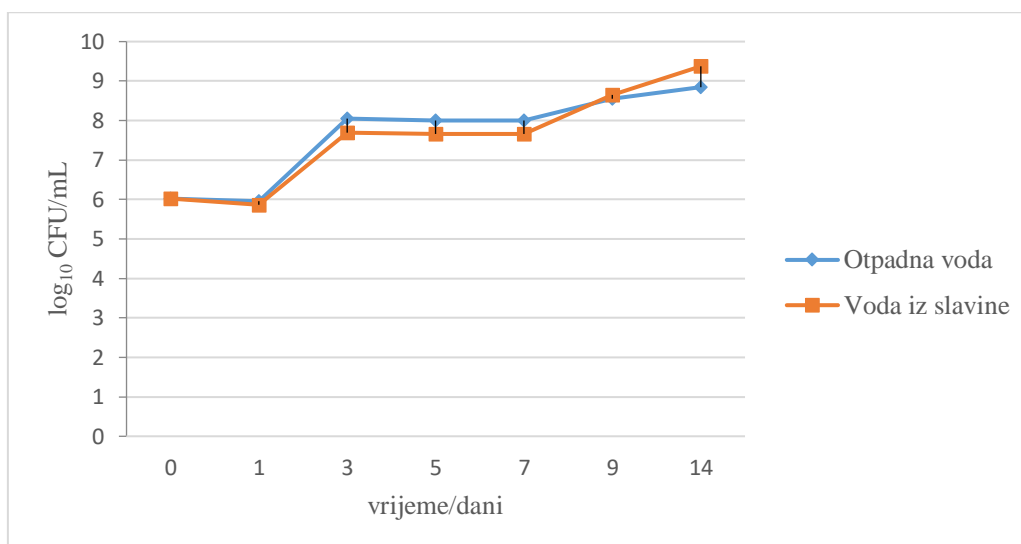
#### 4.2 Preživljavanje višestruko rezistentnih bakterija u vodenim medijima

Na grafikonima 1, 2, 3 i 4 prikazana je krivulja preživljavanja višestruko rezistentnih bakterija (*K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442, *S. aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360,) u sterilnoj vodi iz slavine i u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi u periodu od 1., 3., 5., 7., 9. i 14. dana od pripremljanja ispitivanog uzorka. Porasle bakterije na Mueller – Hinton agaru su izbrojane, zatim je izračunata aritmetička sredina, koja je potom logaritmirana, te je dodana standardna devijacija u obliku trake pogrešaka.



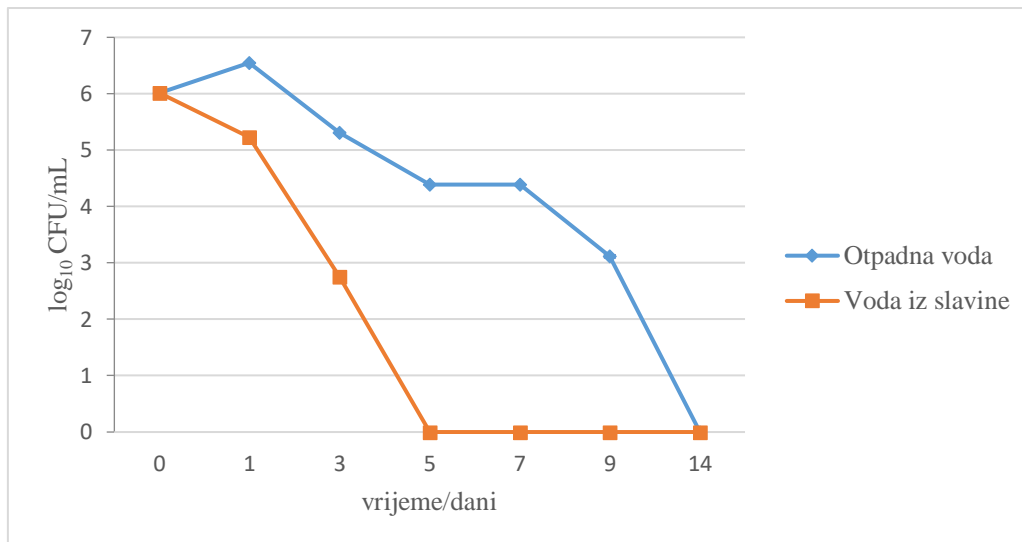


**Grafikon 1.** Preživljavanje bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine

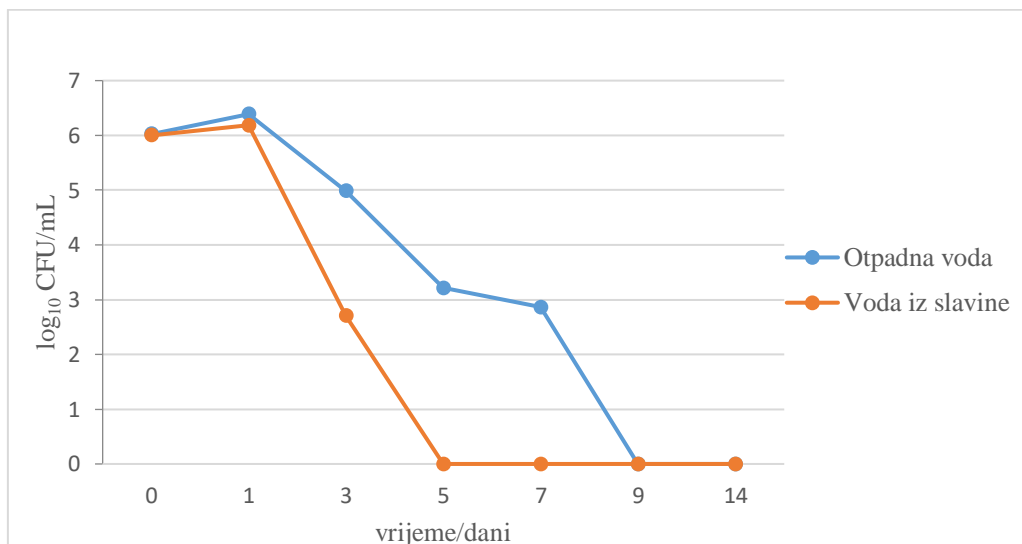


**Grafikon 2.** Preživljavanje bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine

Iz grafikona 1. i 2. može se uočiti da sterilna voda iz slavine i sterilna komunalna otpadna voda pogoduju rastu bakterija iz roda *Klebsiella*, te se u vremenskom intervalu od samo 3 dana broj bakterija povećao za dvije logaritamske jedinice u odnosu na broj bakterija na početku eksperimenta, a za 15 dana broj bakterija iznosio je oko 9 logaritamskih jedinica CFU/mL.



**Grafikon 3.** Preživljavanje bakterije *S. aureus* ATCC 24213 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine



**Grafikon 4.** Preživljavanje bakterije meticilin rezistentnog *S. aureus* ATCC 43360 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i sterilnoj vodi iz slavine

Na grafikonima 3. i 4. jasno je vidljivo da već za 5 dana u sterilnoj vodi iz slavine dolazi do izostanka rasta MRSA ATCC 43360 i *S. aureus* ATCC 24213, a dok u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi za izostanak rasta potrebno je 9 dana, odnosno 14 dana u slučaju *S. aureus*, jedna od vjerojatnosti zašto bakterije iz roda *Staphylococcus* duže preživljavaju u sterilnoj

komunalnoj otpadnoj vodi jest da se u njoj nalazi više hranjivih nutrijenata u odnosu na sterilnu vodu iz slavine.

#### 4.3 Određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) spoja TMPyP3 u različitim medijima

Određena je minimalna efektivna koncentracija (MEK) kationskog porfirina TMPyP3 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i u sterilnoj vodi iz slavine. Tablica 3. prikazuje MEK vrijednosti koje su dobivene nakon što je 50  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzija i 50  $\mu\text{L}$  kationskog porfirina TMPyP3 odgovarajuće koncentracije izloženo izvoru ljubičaste svjetlosti i u mraku, odnosno, bez izlaganju izvoru ljubičaste svjetlosti (LED lampa, valna duljina 395 nm, intenzitet 20  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , ukupna doza svjetlosti 12  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

**Tablica 3.** Minimalna efektivna koncentracija (MEK) spoja TMPyP3 određena u sterilnoj otpadnoj vodi bez izloženosti izvoru ljubičaste svjetlosti (u tablici označeno „MRAK“) i poslije izloženosti izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 10 minuta (u tablici označeno „SVJETLO“)

BAKTERIJA	MRAK/SVJETLO	MEK ( $\mu\text{M}$ )
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	MRAK	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	SVJETLO	1,562
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	MRAK	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	SVJETLO	3,125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 24213	MRAK	12,5

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 24213	SVJETLO	0,78
<b>MRSA ATCC 43360</b>	MRAK	6,25
<b>MRSA ATCC 43360</b>	SVJETLO	3,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	MRAK	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	SVJETLO	6,25

**MRSA** – meticilin rezistentni *S. aureus*; **MEK** – minimalna efektivna koncentracija

**Tablica 4.** Minimalna efektivna koncentracija (MEK) spoja TMPyP3 određena u sterilnoj vodi iz slavine bez izloženosti izvoru ljubičaste svjetlosti (u tablici označeno „MRAK“) i poslije izloženosti izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 10 minuta (u tablici označeno „SVJETLO“)

BAKTERIJA	MRAK/SVJETLO	MEK (μM)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	MRAK	3,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	SVJETLO	1,562
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	MRAK	3,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	SVJETLO	1,562
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	MRAK	50

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	SVJETLO	1,562
---	---------	-------

**MEK** – minimalna efektivna koncentracija

Iz tablica 3. i 4. jasno je vidljivo da minimalne efektivne koncentracije (MEK) imaju različite vrijednosti kod ispitivanih bakterija, smatra se da je jedan od razloga otpornosti pojedinih bakterija na kationski porfirin posljedica snažniji mehanizama obrane tj. rezistencije.

Također, ispitano je u kojoj mjeri će se minimalna efektivna koncentracija smanjiti s povećanjem vremena izloženosti izvoru ljubičaste svjetlosti, a u tablici 5. prikazani su dobiveni rezultati.

**Tablica 5.** Ovisnost vremena ozračivanja o minimalnoj efektivnoj koncentraciji kationskog porfirina TMPyP3 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi

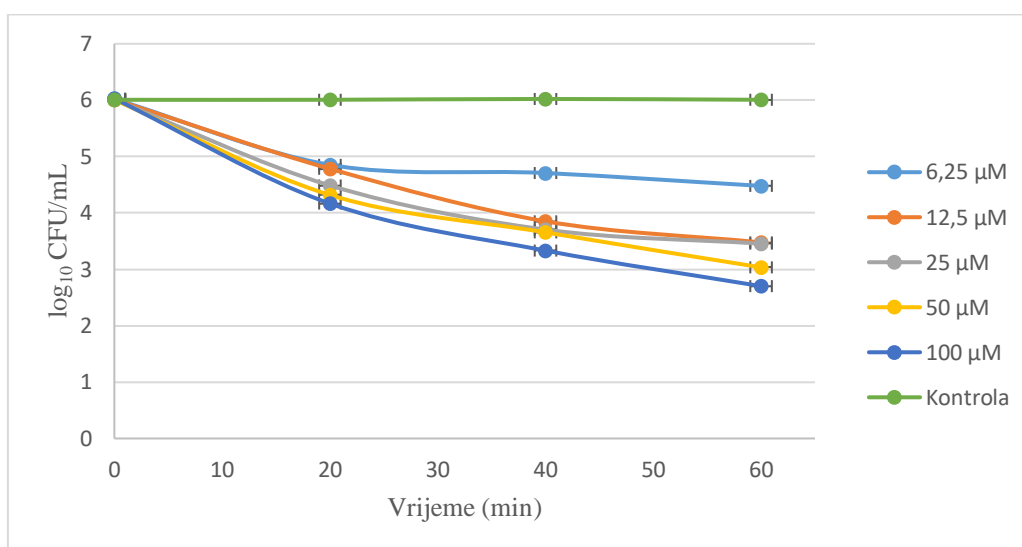
Bakterija	MEK ( $\mu\text{M}$ ) Vrijeme ozračivanja – 10 min	MEK ( $\mu\text{M}$ ) Vrijeme ozračivanja – 30 min
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	1,562	1,562
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	3,125	1,562
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	6,25	3,125

Iz tablice 5. jasno je vidljivo da se kod *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 i *P. aeruginosa* ATCC 27850 MEK vrijednost dvostruko smanjila nakon 30 minuta ozračivanja, a kod *K. pneumoniae* ATCC 700603 MEK vrijednost je identična.

#### 4.4 Fotoinaktivacijski test u različitim medijima

Ekspiriment fotoinaktivacijskog učinka proveden je na *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442, *S. aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 i *P. aeruginosa* ATCC 27850 u različitim medijima (sterilna komunalna otpadna voda i sterilna voda iz slavine). Provedeno je testiranje u vremenskim intervalima od 15, 30 i 60 minuta pri 0,5xMEC, 1xMEC, 2xMEC vrijednostima koje su različite kod gotovo svih bakterija.

#### 4.4.1 Fotoinaktivacijski test u sterilnoj otpadnoj vodi



**Grafikon 5.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta

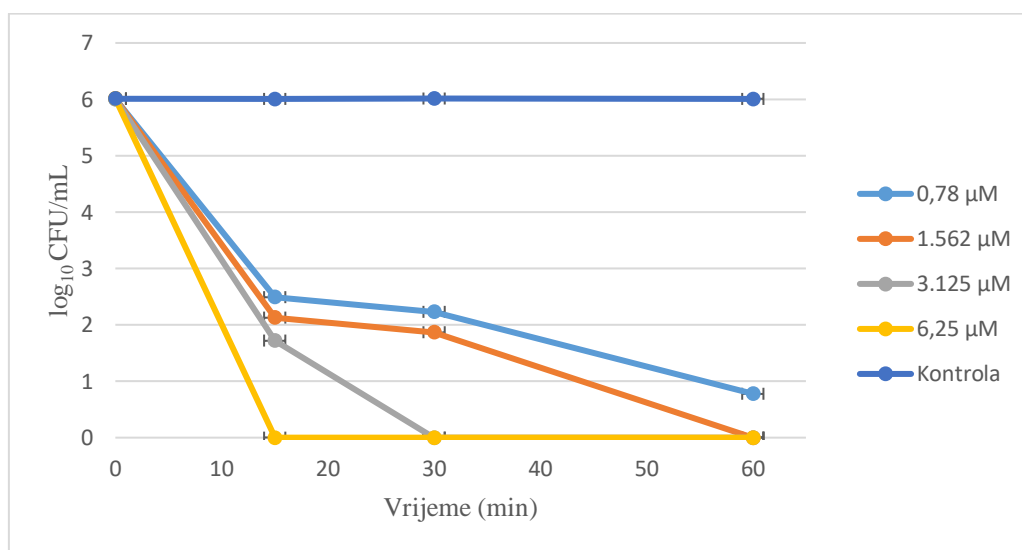
Na grafikonu 5. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 sterilnoj otpadnoj vodi bez izlaganja svjetlosti gdje se jasno vidi da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku broj bakterija reduciran za 1 do 3 logaritamske jedinice u odnosu na kontrolnu krivulju.

**Tablica 6.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u koncentracijama 0,5xMEK (25

$\mu\text{M}$ ), 1xMEK (50  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (100  $\mu\text{M}$ ) u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta.

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 25 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 50 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 100 $\mu\text{M}$
20	97,00	98,00	98,50
40	99,50	99,50	99,80
60	99,72	99,90	99,95

Tablica 6. prikazuje postotak inhibicije rasta kod bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi nakon 20, 40 i 60 minutnog tretmana u mraku, odnosno bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Iz tablice se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku postotak inhibicije rasta bakterije kod svih koncentracija iznosi gotovo 100%.



**Grafikon 6.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

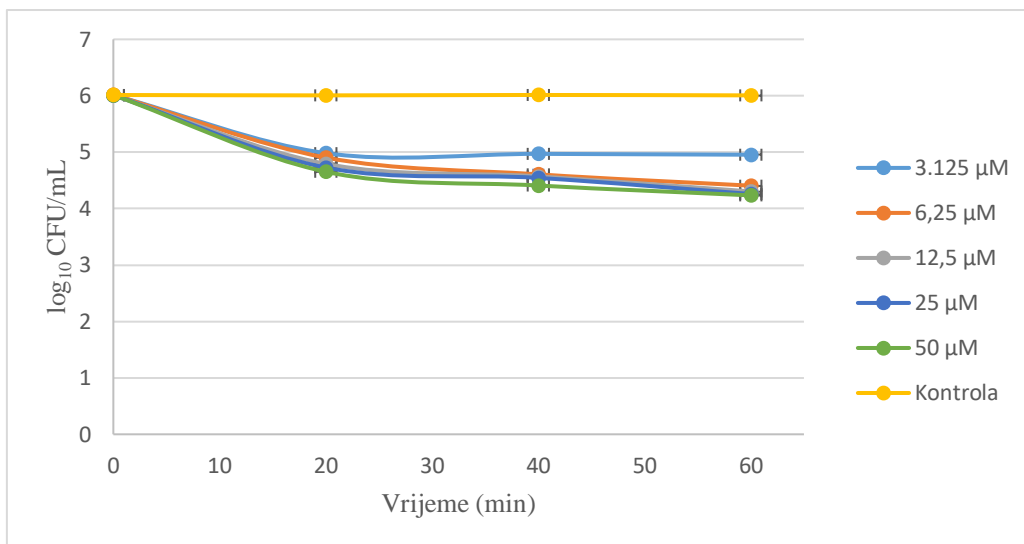
Na grafikonu 6. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je za potpunu inhibiciju rasta potrebno 15 minuta izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti za koncentraciju 6,25  $\mu\text{M}$ , 30 minuta za koncentraciju 3,125  $\mu\text{M}$ , a dok je za koncentracije 1,562  $\mu\text{M}$  (koja je ujedno i minimalna efektivna koncentracija) i 0,78  $\mu\text{M}$  potrebno oko 60 minuta za potpuno inhibiranje rasta bakterije.

**Tablica 7.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u koncentracijama 0,5xMEK (0,78  $\mu\text{M}$ ), 1xMEK (1,562  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (3,125  $\mu\text{M}$ ) u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 0,78 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 1,562 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 3,125 $\mu\text{M}$
15	100	100	100
30	100	100	100
60	100	100	100

Tablica 7. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj otpadnoj vodi uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta. Iz tablice se može vidjeti da je postignuta 100%-tna inhibicija rasta bakterije kod svih ispitivanih koncentracija već nakon petnaestominutnog ozračivanja.





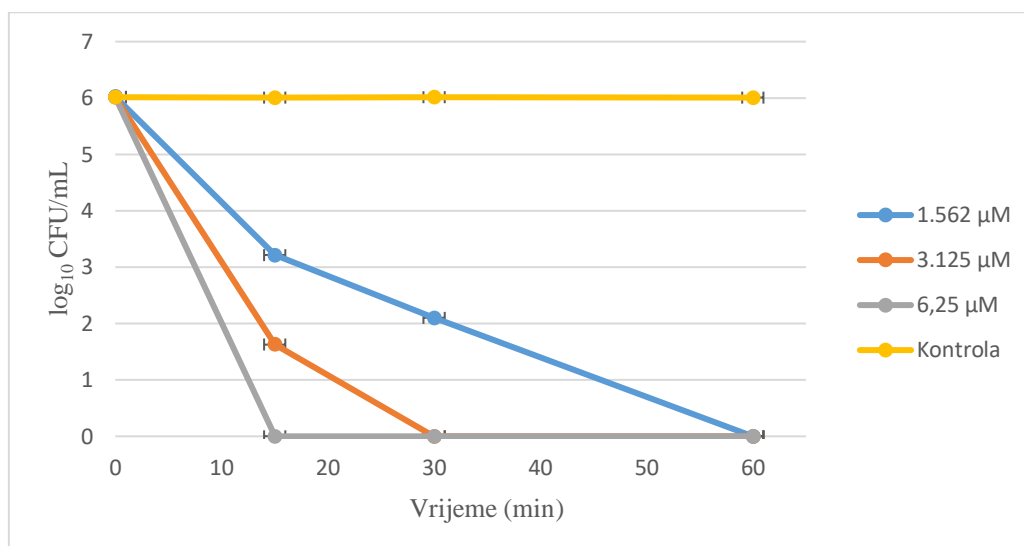
**Grafikon 7.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta

Na grafikonu 7. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku ukupan broj bakterija u 1 mL smanjen za 2 logaritamske jedinice, osim kod koncentracije 3,125 µM gdje je broj bakterija smanjen za 1 logaritamsku jedinicu u odnosu na kontrolnu krivulju.

**Tablica 8.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u koncentracijama 0,5xMEK (12,5 µM), 1xMEK (25 µM) i 2xMEK (50 µM) u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta.

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 12,5 µM	% inhibicije – 25 µM	% inhibicije – 50 µM
20	93,80	94,70	95,50
40	96,30	97,00	97,50
60	98,00	98,20	98,30

Tablica 8. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi nakon 20, 40 i 60 minutnog tretmana u mraku, odnosno bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Iz tablice se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku postotak inhibicije rasta bakterije kod svih koncentracija iznosi približno 98%



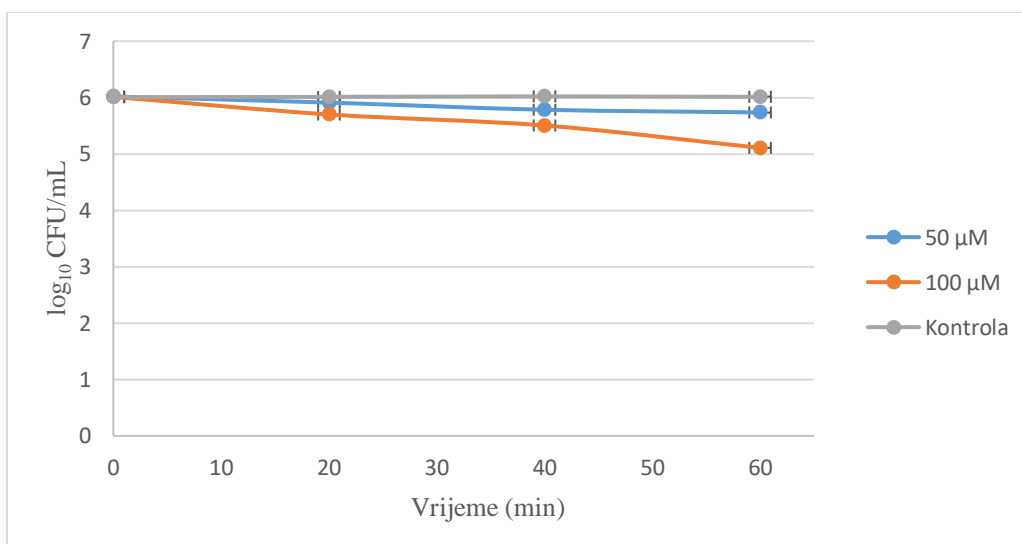
**Grafikon 8.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Na grafikonu 8. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je za potpunu inhibiciju rasta potrebno 15 minuta kod koncentracije 6,25 µM, 30 minuta kod koncentracije 3,125 µM (koja je ujedno i minimalna efektivna koncentracija), a 60 minuta kod koncentracije 1,562 µM.

**Tablica 9.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u koncentracijama 0,5xMEK (1,562 µM), 1xMEK (3,125 µM) i 2xMEK (6,25 µM) u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 1,562 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 3,125 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 6,25 $\mu\text{M}$
15	99,84	100	100
30	99,99	100	100
60	100	100	100

Tablica 9. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj otpadnoj vodi uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta. Iz tablice se može vidjeti da je postignuta 100%-tna inhibicija rasta bakterije kod svih ispitivanih koncentracija već nakon petnaestominutnog ozračivanja.



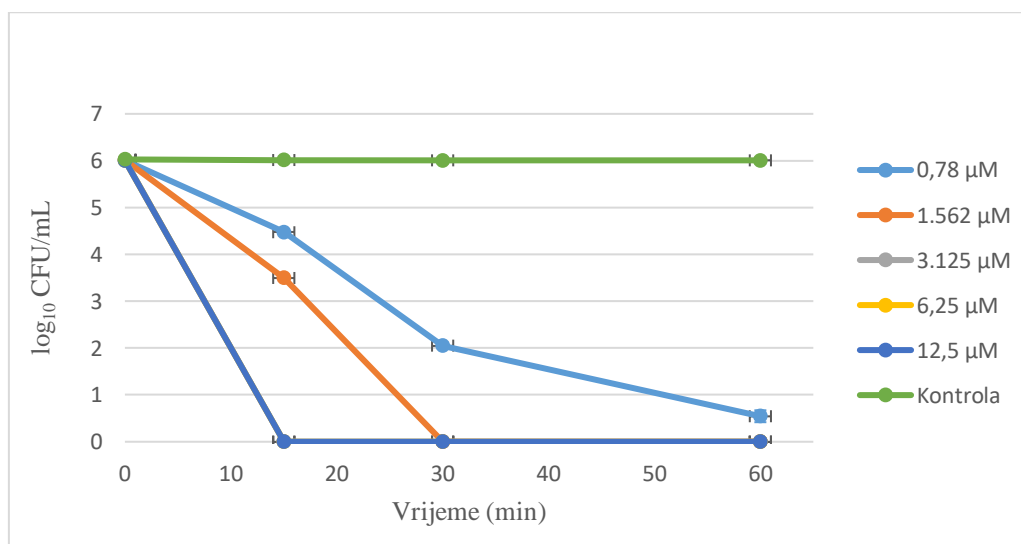
**Grafikon 9.** Fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta

Na grafikonu 9. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku ukupan broj bakterija u 1 mL smanjen za 1 logaritamsku jedinicu kod koncentracije 100  $\mu\text{M}$ , a kod koncentracije 50  $\mu\text{M}$  ukupan broj bakterija smanjen je neznatno u odnosu na kontrolnu krivulju.

**Tablica 10.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u koncentracijama 1xMEK (50  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (100  $\mu\text{M}$ ) u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta.

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 50 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 100 $\mu\text{M}$
20	20,00	50,00
40	40,00	70,00
60	45,00	87,50

Tablica 10. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi nakon 20, 40 i 60 minutnog tretmana u mraku, odnosno bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Iz tablice se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku postotak inhibicije rasta bakterije za koncentraciju 50  $\mu\text{M}$  iznosi 45%, a za koncentraciju 100  $\mu\text{M}$  iznosi 87,50%.



**Grafikon 10.** Fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Na grafikonu 10. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je za potpunu inhibiciju rasta potrebno 15 minuta kod koncentracije 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$  (koja je ujedno i minimalna efektivna koncentracija) i kod koncentracije 3,125  $\mu\text{M}$ , 30 minuta kod koncentracije 1,562, a 60 minuta kod koncentracije 0,78  $\mu\text{M}$ .

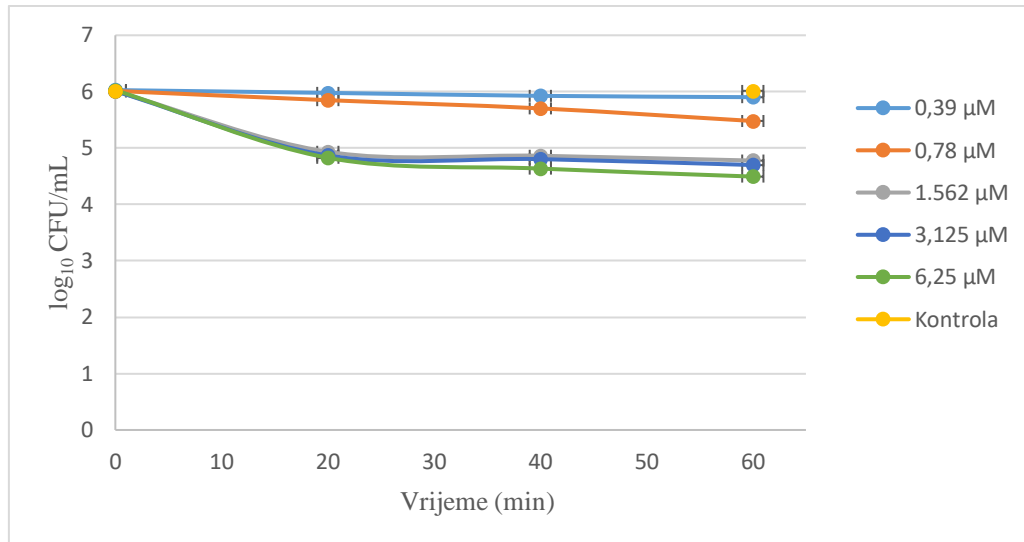
**Tablica 11.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u koncentracijama 0,5xMEK (3,125  $\mu\text{M}$ ), 1xMEK (6,25  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (12,5  $\mu\text{M}$ ) u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 3,125 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 6,25 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 12,5 $\mu\text{M}$
15	100	100	100
30	100	100	100
60	100	100	100

Tablica 11. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj otpadnoj vodi uz izlaganje izvoru ljubičastog zračenja u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta. Iz tablice se može vidjeti da je postignuta 100%-tna inhibicija rasta bakterije kod svih ispitivanih koncentracija već nakon petnaestominutnog ozračivanja.

Na grafikonima 5, 6, 7, 8, 9 i 10 primjetna je ovisnost fotodinamičkog efekta kationskog porfirina TMPyP3 o korištenoj koncentraciji istog. Također, jasno se vidi obrnuto proporcionalna ovisnosti ukupnog broja bakterija u 1 mililitru u odnosu na koncentraciju kationskog porfirina.

#### 4.4.2 Fotoinaktivacijski test u sterilnoj vodi iz slavine



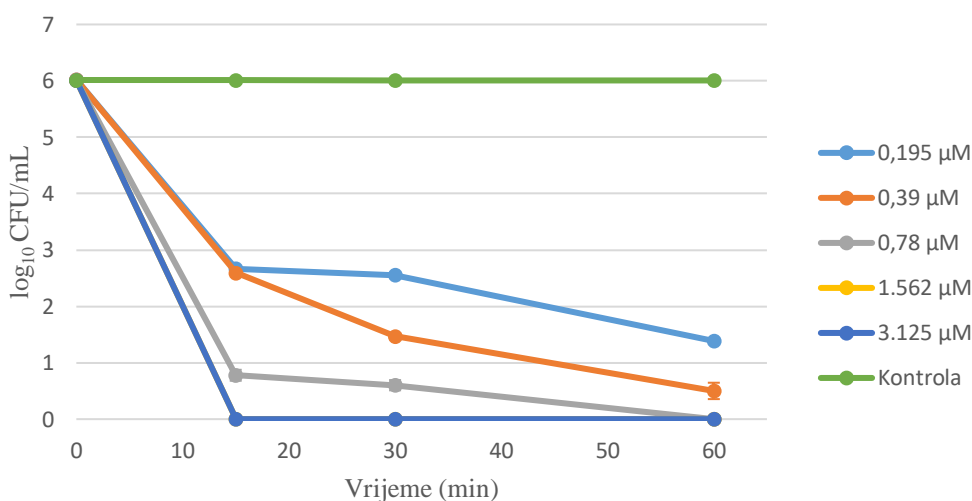
**Grafikon 11.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta

Na grafikonu 11. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se vidi da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku broj bakterija u većini slučajeva smanjen za 1 logaritamsku jedinicu, a kod koncentracija 0,78  $\mu\text{M}$  i 0,39  $\mu\text{M}$  broj bakterija smanjen je neznatno u odnosu na kontrolnu krivulju.

**Tablica 12.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u koncentracijama 0,5xMEK (1,562  $\mu\text{M}$ ), 1xMEK (3,125  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (6,25  $\mu\text{M}$ ) u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta.

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 1,562 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 3,125 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 6,25 $\mu\text{M}$
20	91,50	92,60	93,30
40	92,70	93,70	95,70
60	94,00	95,00	97,00

Tablica 12. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine nakon 20, 40 i 60 minutnog tretmana u mraku, odnosno bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Iz tablice se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku postotak inhibicije rasta bakterije za koncentraciju 1,562  $\mu\text{M}$  iznosi 94,00 %, za koncentraciju 3,125  $\mu\text{M}$  iznosi 95,00%, a za koncentraciju 6,25  $\mu\text{M}$  iznosi 97,00 %.



**Grafikon 12.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Na grafikonu 12. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može primijetiti da je za

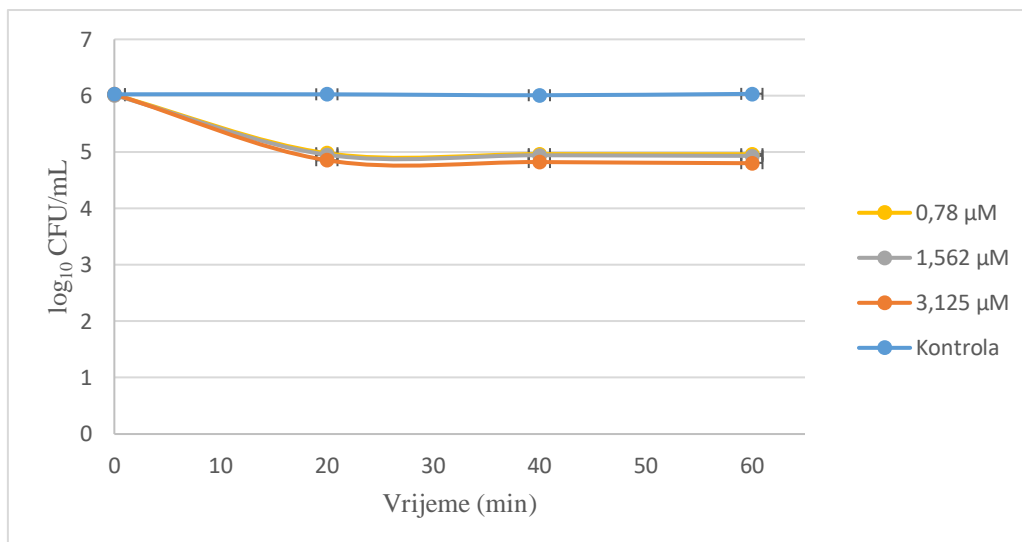
potpunu inhibiciju rasta potrebno 15 minuta kod koncentracije 3,125  $\mu\text{M}$ , a dok je za koncentracije 1,562  $\mu\text{M}$  (koja je ujedno i minimalna efektivna koncentracija), 0,78  $\mu\text{M}$ , 0,39  $\mu\text{M}$  i 0,195  $\mu\text{M}$  potrebno oko 60 minuta.

**Tablica 13.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u koncentracijama 0,5xMEK (0,78  $\mu\text{M}$ ), 1xMEK (1,562  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (3,125  $\mu\text{M}$ ) u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 0,78 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 1,562 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 3,125 $\mu\text{M}$
15	100	100	100
30	100	100	100
60	100	100	100

Tablica 13. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta. Iz tablice se može vidjeti da je postignuta 100%-tna inhibicija rasta bakterije kod svih ispitivanih koncentracija već nakon petnaestominutnog ozračivanja.





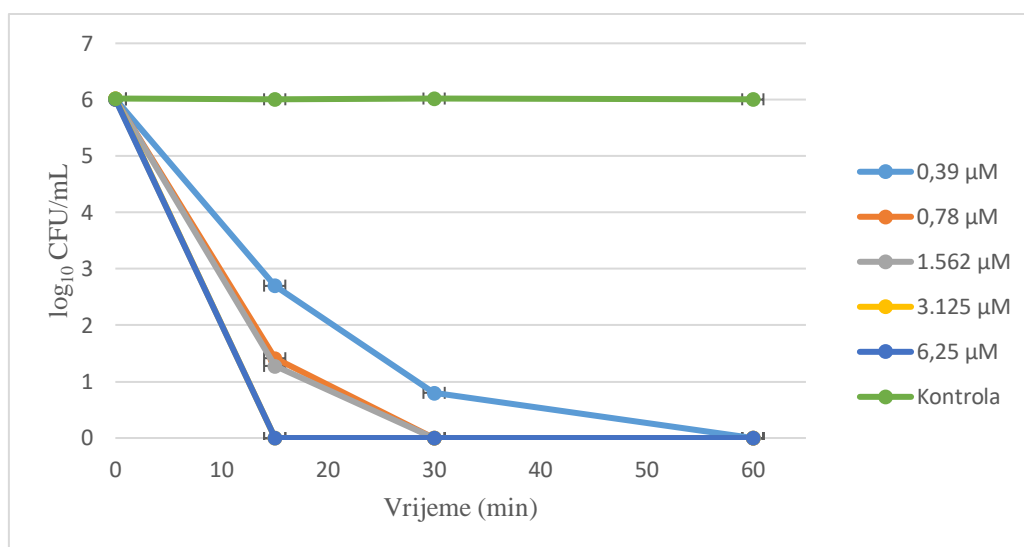
**Grafikon 13.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta

Na grafikonu 14. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se vidi da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku broj bakterija kod svih koncentracija smanjen za 1 logaritamsku jedinicu u odnosu na kontrolnu krivulju.

**Tablica 14.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u koncentracijama 0,5xMEK (1,562 µM), i 1xMEK (3,125 µM) u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta.

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 1,562 µM	% inhibicije – 3,125 µM
20	91,20	93,20
40	91,40	93,70
60	91,60	94,00

Tablica 14. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine nakon 20, 40 i 60 minutnog tretmana u mraku, odnosno bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Iz tablice se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku postotak inhibicije rasta bakterije za koncentraciju 1,562  $\mu\text{M}$  iznosi 91,60 %, a za koncentraciju 3,125  $\mu\text{M}$  iznosi 94,00 %.



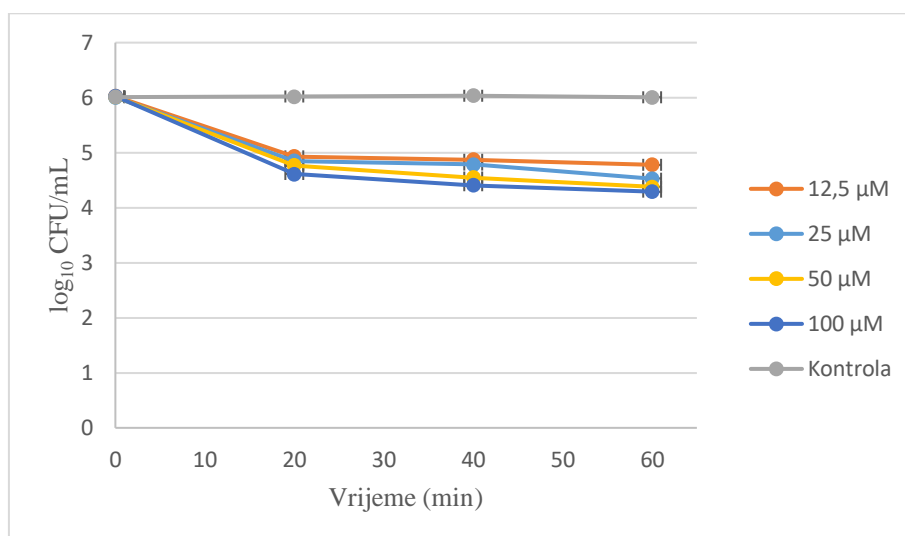
**Grafikon 14.** Fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Na grafikonu 14. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je za potpunu inhibiciju rasta potrebno 15 minuta kod koncentracije 6,25  $\mu\text{M}$ , a za koncentracije 3,125  $\mu\text{M}$ , 1,562  $\mu\text{M}$  (koja je ujedno i minimalna efektivna koncentracija) i 0,78  $\mu\text{M}$  potrebno je 30 minuta, a za koncentraciju 0,39  $\mu\text{M}$  potrebno je 60 minuta kontinuiranog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti.

**Tablica 15.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u koncentracijama 0,5xMEK (0,78  $\mu\text{M}$ ), 1xMEK (1,562  $\mu\text{M}$ ) i 2xMEK (3,125  $\mu\text{M}$ ) u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 0,78 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 1,562 $\mu\text{M}$	% inhibicije – 3,125 $\mu\text{M}$
15	100	100	100
30	100	100	100
60	100	100	100

Tablica 15. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj vodi iz slavine uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta. Iz tablice se može vidjeti da je postignuta 100%-tna inhibicija rasta bakterije kod svih ispitivanih koncentracija već nakon petnaestominutnog ozračivanja.



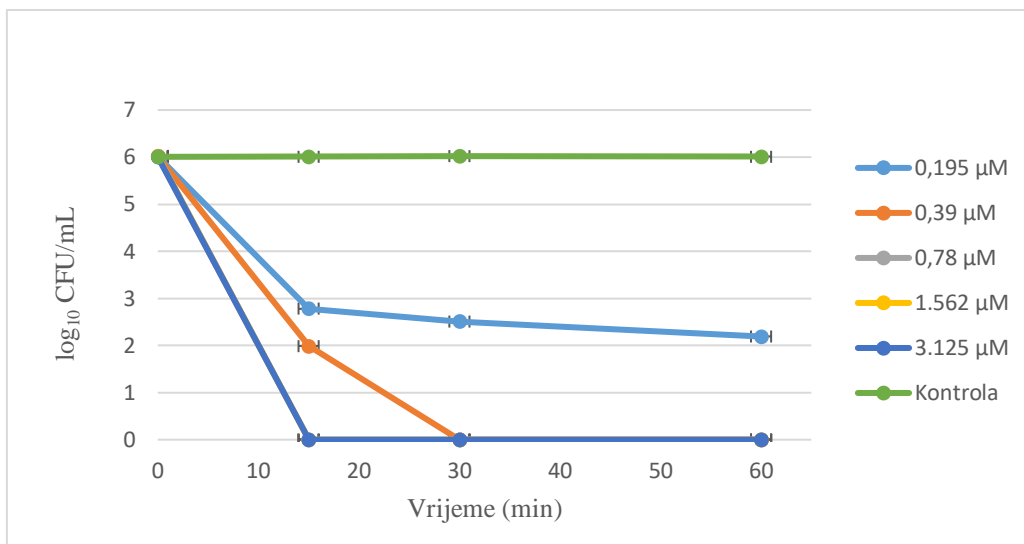
**Grafikon 15.** Fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta

Na grafikonu 15. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku ukupan broj bakterija u 1 mL smanjen za 1 do 2 logaritamske jedinice u odnosu na kontrolnu krivulju.

**Tablica 16.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 u koncentracijama 0,5xMEK (25 $\mu$ M), 1xMEK (50  $\mu$ M) i 2xMEK (100  $\mu$ M) u mraku u vremenskom periodu od 20, 40 i 60 minuta.

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 25 $\mu$ M	% inhibicije – 50 $\mu$ M	% inhibicije – 100 $\mu$ M
20	93,00	94,20	96,00
40	94,00	96,50	97,50
60	96,70	97,60	98,10

Tablica 16. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine nakon 20, 40 i 60 minutnog tretmana u mraku, odnosno bez izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Iz tablice se može vidjeti da je nakon šezdesetominutnog tretmana u mraku postotak inhibicije rasta bakterije za koncentraciju 25  $\mu$ M iznosi 96,70 %, za koncentraciju 50  $\mu$ M iznosi 97,60 %, a za koncentraciju 100  $\mu$ M iznosi 98,10 %.



**Grafikon 16.** Fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Na grafikonu 16. prikazana je fotoinaktivacija bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine uz izlaganje ljubičaste izvoru ljubičaste svjetlosti gdje se može vidjeti da je za potpunu inhibiciju rasta potrebno 15 minuta kod koncentracije 3,125 µM, 1,562 µM (koja je ujedno i minimalna efektivna koncentracija) i 0,78 µM, 30 minuta kod koncentracije 0,39 µM, a za koncentraciju 0,195 µM potrebno je duže od 60 minuta kontinuiranog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti.

**Tablica 17.** Prosječni postotak fotoinaktivacije bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine poslije dodavanja porfirina TMPyP3 i izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti u koncentracijama 0,5xMEK (0,78 µM), 1xMEK (1,562 µM) i 2xMEK (3,125 µM) u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta

Vrijeme ozračivanja (min)	% inhibicije – 0,78 µM	% inhibicije – 1,562 µM	% inhibicije – 3,125 µM
15	100	100	100
30	100	100	100

60	100	100	100
----	-----	-----	-----

Tablica 17. prikazuje postotak inhibicije rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj vodi iz slavine uz izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 15, 30 i 60 minuta. Iz tablice se može vidjeti da je postignuta 100%-tna inhibicija rasta bakterije kod svih ispitivanih koncentracija već nakon petnaestominutnog ozračivanja.

Na grafikonima 11, 12, 13, 14, 15 i 16 primjetna je ovisnost fotodinamičkog efekta kationskog porfirina TMPyP3 o korištenoj koncentraciji istog. Također, jasno se vidi obrnuto proporcionalna ovisnosti ukupnog broja bakterija u 1 mililitru u odnosu na koncentraciju kationskog porfirina.

#### 4.5 Određivanje minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 u različitim medijima

**Tablica 18.** Minimalna anti-adhezijska koncentracija kationskog porfirina TMPyP3 u sterilnoj otpadnoj vodi

BAKTERIJA	MRAK/SVJETLO	KONCENTRACIJA ANTI-ADHEZIJA (μM)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	MRAK	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	SVJETLO	1,562
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	MRAK	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	SVJETLO	3,125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 24213	MRAK	6,25

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 24213	SVJETLO	0,78
<b>MRSA ATCC 43360</b>	MRAK	6,25
<b>MRSA ATCC 43360</b>	SVJETLO	1,562
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	MRAK	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	SVJETLO	6,25

**MRSA** – meticilin rezistentni *S. aureus*

**Tablica 19.** Minimalna anti-adhezijska koncentracija kationskog porfirina TMPyP3 u sterilnoj vodi iz slavine

BAKTERIJA	MRAK/SVJETLO	KONCENTRACIJA ANTI-ADHEZIJA ( $\mu$ M)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	MRAK	3,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	SVJETLO	0,78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	MRAK	3,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA NTCT 13442	SVJETLO	1,562
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	MRAK	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27850	SVJETLO	1,562

Tablice 18. i 19. prikazuju minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina u različitim ispitivanim medijima. Usporedbom rezultata dobivenih određivanjem minimalne efektivne koncentracije i rezultata dobivenih određivanjem minimalne anti-adhezijske

koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 može se zaključiti da je kod bakterija *K. pneumoniae* ATCC 700603 i meticilin rezistentnog *S. aureus* ATCC 43360 minimalna anti-adhezivna koncentracija manja za dvostruku vrijednost u odnosu na minimalnu efektivnu koncentraciju. Kod bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj vodi iz slavine nakon desetominutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti MEK vrijednost iznosi 1,562  $\mu\text{M}$ , a minimalna anti-adhezivna koncentracija iznosi 0,78  $\mu\text{M}$ , dok kod bakterije MRSA ATCC 43360 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi nakon desetominutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti MEK vrijednost iznosi 3,125  $\mu\text{M}$ , a minimalna anti-adhezijska koncentracija iznosi 1,562  $\mu\text{M}$ . Dok minimalna efektivna koncentracija i minimalna anti-adhezijska koncentracija kationskog porfirina TMPyP3 kod bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 imaju iste vrijednosti i u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi (3,125  $\mu\text{M}$ ) i u sterilnoj vodi iz slavine (1,562  $\mu\text{M}$ ).



## 5. RASPRAVA

U današnje vrijeme rezistentni patogeni predstavljaju sve veći izazov, kako u liječenju pacijenata tako i u širenju rezistencije u okolišu, iz tog razloga željeli smo ispitati potencijalnu primjenu fotodinamičke inaktivacije na rezistentnim patogenima u komunalnoj otpadnoj vodi. Porfirini imaju bitnu ulogu u različitim fotokemijskim i metaboličkim procesima, uključujući transport kisika i prijenos elektrona. Posljednjih godina istraživana je fotokemijska aktivnost porfirina, odnosno primjena u fotodinamičkoj inaktivaciji, ali i u fotodinamičkoj terapiji. Jedno od dobrih svojstava porfirina je to što pri osvjetljavanju izvorom svjetlosti određene valne duljine izaziva antimikrobni učinak (44). Prema „Pravilniku o graničnim vrijednostima opasnih tvari i drugih tvari u otpadnim vodama“ (NN 94/2008) u komunalne otpadne vode spadaju sve vode koje nastaju kao produkt otjecanja oborina, voda koja se koristila u različitim industrijskim pogonima, te voda koja se koristi kod odvodnje fekalija s različitih prostora u kojima ljudi borave (7). Komunalna otpadna voda prolazi kroz čitav niz različitih metoda pročišćavanja, međutim, u komunalnoj otpadnoj vodi zaostaju rezistentni organizmi. Maravić Ana *et al.* u svom radu su dokazali kako je u Kaštelanskom zaljevu pronađeno oko 470 bakterijskih sojeva višestruko rezistentno, a to su većinom *E. coli*, *Enterobacter cloacae* i *K. pneumoniae*. Autori navode kako postoji vrlo velika vjerojatnost da su rezistentne bakterije u more dospjele upravo iz bolničkog okruženja (45). Istraživanjem literature nisu pronađeni rezultati u kojima se dokazuje prisutnost rezistentnih bakterija u Kvarnerskom zaljevu. Osim rezistentnih bakterija u moru se mogu pronaći rezidue antibiotika koji mogu utjecati na bakterijsku rezistenciju (46).

U ovom radu istraživano je preživljavanje višestruko rezistentnih bakterija u vodenom mediju, a iz rezultata se može zaključiti da meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 bilježi kraće vrijeme preživljavanja u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi (9 dana) u odnosu na osjetljivi soj *S. aureus* ATCC 24213 (između 9-14 dana), dok u sterilnoj vodi iz slavine oba soja bakterije preživljavaju samo 5 dana. Međutim, kod bakterija *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 nema razlike u vremenu preživljavanja, te oba soja preživljavaju 14 dana u sterilnoj vodi iz slavine i u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi, što znači da se ove bakterije lako adaptiraju na nove uvjete života. Naime, u ovom radu korištena

je sterilna otpadna voda, te smo time isključili prisutnost drugih organizama koji bi utjecali na preživljavanje ovih bakterija, jer to nije njihovo prirodno stanište. U prethodnim radovima koji su također ispitivali preživljavanje višestruko rezistentnih bakterija dokazano je da prisutnost drugih organizama u otpadnoj vodi utječe na preživljavanje pojedinih bakterija (9).

Kod određivanja minimalne efektivne koncentracije (MEK) koristila se sterilna voda iz slavine koja nije bogata hranjivim tvarima i sastavni je dio komunalne otpadne vode i sterilna komunalna otpadna voda. Rezultati provedenog istraživanja ukazuju da *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 (MEK→3,125 μM) pokazuje veću rezistentnost na utjecaj kationskog porfirina TMPyP3 u odnosu na osjetljiviji soj *K. pneumoniae* ATCC 700603 (MEK→1,562 μM) nakon desetominutnog osvjetljavanja izvorom ljubičastog svjetla u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi, dok su u sterilnoj vodi iz slavine podjednako osjetljive na fotodinamičko djelovanje kationskog porfirina nakon desetominutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti, te MEK koncentracija iznosi 1,562 μM. Kod bakterija iz roda *Staphylococcus* meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 (MEK→3,125 μM) pokazuje veću rezistentnost u odnosu na osjetljiviji soj *S. aureus* ATCC 24213 (MEK→1,562 μM) nakon desetominutnog osvjetljavanja izvorom ljubičaste svjetlosti u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi. Prema ovom istraživanju, rezistentne bakterije pokazale su se otpornijim što je kontradiktorno radovima koji govore da fotodinamička inaktivacija ima podjednak utjecaj na rezistentne bakterije (47). U ovom istraživanju koristile su se gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, te se može primijetiti da je u sterilnoj otpadnoj vodi najmanja MEK vrijednost upravo kod gram-pozitivne bakterije *S. aureus* ATCC 24213 (0,78 μM), dok meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 ipak pokazuje veću rezistentnost i njegova MEK vrijednost iznosi 3,125 μM, što potkrepljuje dokaze iz provedenih istraživanja koja navode da su gram-pozitivne bakterije manje otporne na stres izazvan fotodinamičkom inaktivacijom zbog svoje debele stanične stijenke ispunjene slojem peptidoglikana (48). Potom su rađena istraživanja i u mraku, gdje smo dokazali da su MEK vrijednosti značajno više u odnosu na MEK vrijednosti prilikom izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti što nam ukazuje na nisku toksičnost u mraku. To možemo vidjeti na primjeru bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 gdje je MEK vrijednost prilikom desetominutnog osvjetljavanja izvorom ljubičaste svjetlosti u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 6,25 μM, a u mraku

iznosi 100  $\mu\text{M}$ . Možemo zaključiti da izlaganje izvoru ljubičaste svjetlosti povećava antimikrobno djelovanje, ali i produljivanjem vremena ozračivanja s 10 na 30 minuta (Tablica 5.) smanjuje se MEK vrijednost što nam ukazuje da osvjetljavanjem dolazi do aktivacije kationskog porfirina, te se tako povećava njegova učinkovitost. Dobiveni rezultati se slažu s prijašnjim rezultatima koji su određivali MEK vrijednosti u riječkoj komunalnoj otpadnoj vodi, a također je otkriveno da i tvrdoća vode značajno utječe na učinkovitost fotodinamičke inaktivacije (38). U sterilnoj vodi iz slavine nismo odredili MEK prilikom tretmana u mraku i u svjetlu za *S. aureus* i MRSA jer, ni nakon ponavljanja pokusa s nižim koncentracijama spoja nije evidentiran porast bakterija na hranjivom agaru. Jedno od objašnjenja ovog rezultata leži u činjenici da voda nije prirodni medij za ove bakterije. Što ih čini osjetljivijim prema djelovanju svjetla i porfirina. Svakako bi trebalo detaljnije istražiti razloge dobivenih rezultata.

Fotodinamička aktivacija kationskog porfirina TMPyP3 ispitivana je u različitim medijima i to kod bakterija *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442, *S. aureus* ATCC 24213, meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 i *P. aeruginosa* ATCC 27850. Bakterijska suspenzija ( $10^6$  CFU/mL) i odgovarajuća koncentracija fotosenzibilizatora podvrgnuti su izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskim razmacima od 15, 30 i 60 minuta. Iz grafikona koji su prikazani u rezultatima vidljivo je da u većini slučajeva nakon 60 minuta ozračivanja dolazi do djelomične ili potpune inhibicije rasta bakterije, što nam govore i postotci inhibicije gdje u svim slučajevima imamo 100%-tnu inhibiciju rasta. Ovakvi rezultati impliciraju na to da se tijekom šezdesetominutnog ozračivanja stvara dovoljno reaktivnih kisikovih vrsta, koji direktno oštećuju DNA molekulu ili oštećuju staničnu strukturu, što izaziva istjecanje staničnog sadržaja i naposljetku smrt stanice. U ovom istraživanju koristio se kationski porfirin zbog toga što je u prethodnim istraživanjima (48) dokazano da na gram-negativne bakterije kationski porfirini imaju bolji učinak zbog svog pozitivnog naboja, naime, gram-negativne bakterije na površini svoje stanične stijenke (koja se sastoji od složene vanjske membrane fosfolipida, lipopolisaharida, lipidne teihoične kiseline i lipoproteina) imaju negativan naboj, te tako kationski porfirini lakše prodiru u staničnu stijenku i izazivaju antimikrobne učinke (41).

## 6. ZAKLJUČAK

U sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi bakterija *S. aureus* ATCC 24213 preživljava između 9 i 14 dana, dok u sterilnoj vodi iz slavine preživljava 5 dana, meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi preživljava 9 dana, dok u sterilnoj vodi iz slavine preživljava 5 dana. Bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i u sterilnoj vodi iz slavine preživljavaju 14 dana s tim da je zabilježen porast ukupnog broja bakterija za 2 logaritamske jedinice u odnosu na ukupan broj bakterija na početku eksperimenta, što nam ukazuje na to da se ove dvije bakterije vrlo lako adaptiraju na nove uvjete života. Kationski porfirin TMPyP3 pokazao se kao učinkovit u inhibiciji rasta kod svih bakterija koje su korištene u ovom eksperimentu. Minimalne efektivne koncentracije (MEK) kod bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 nakon desetominutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti (LED lampa, valna duljina 395 nm, intenzitet 20 mW/cm<sup>2</sup>, ukupna doza svjetlosti 12 J/cm<sup>2</sup>) u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i u sterilnoj vodi iz slavine iznosila je 1,562 μM, kod bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 MEK vrijednost u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosila je 3,125 μM, dok je u vodi iz slavine iznosila 1,562 μM, kod bakterije *S. aureus* ATCC 24213 MEK vrijednost u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 0,78 μM, kod bakterije meticilin rezistentni *S. aureus* MEK vrijednost u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 3,125 μM, a kod bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi MEK vrijednost iznosila je 6,25 μM, dok je u sterilnoj vodi iz slavine iznosila 1,562 μM. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je najosjetljivija u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi bila bakterija *S. aureus* ATCC 24213, a u sterilnoj vodi iz slavine jednaku osjetljivost pokazale su sve ispitivane bakterije (*K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 i *P. aeruginosa* ATCC 27850) nakon desetominutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Valja napomenuti, kako je dokazano da se MEK vrijednosti smanjuju za dvostruke vrijednosti s povećavanjem vremena ozračivanja s 10 na 30 minuta i to kod bakterija *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 i *P. aeruginosa* ATCC 27850. Također, ispitivane su minimalne efektivne koncentracije (MEK) i u mraku. Kod bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 MEK vrijednosti nakon tretmana u mraku u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 50 μM, dok u sterilnoj vodi iz slavine iznosi 3,125 μM, kod

bakterije *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 nakon tretmana u mraku u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 25  $\mu\text{M}$ , a u sterilnoj vodi iz slavine iznosi 3,125  $\mu\text{M}$ , kod bakterije *S. aureus* ATCC 24213 MEK vrijednosti nakon tretmana u mraku u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 12,5  $\mu\text{M}$ , kod bakterije meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 MEK vrijednosti nakon tretmana u mraku u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 6,25  $\mu\text{M}$ , a kod bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27850 MEK vrijednosti nakon tretmana u mraku u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi iznosi 100  $\mu\text{M}$ , a u sterilnoj vodi iz slavine iznosi 50  $\mu\text{M}$ . Iz rezultata možemo zaključiti da je kationski porfirin u mraku najučinkovitiji na bakteriju meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi, dok su bakterije *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 pokazale podjednaku toksičnost u sterilnoj vodi iz slavine. No treba napomenuti kako čitav eksperiment nije proveden u potpunom mraku, tijekom pripreme uzorka za inkubaciju kationski porfirin bio je izložen maloj količini svjetlosti, što bi na kraju moglo utjecati na rezultate dobivene ovim eksperimentom. Usporedbom rezultata dobivenih određivanjem minimalne efektivne koncentracije i rezultata dobivenih određivanjem minimalne anti-adhezijske koncentracije kationskog porfirina TMPyP3 može se zaključiti da je kod bakterija *K. pneumoniae* ATCC 700603 i meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43360 minimalna anti-adhezivna koncentracija manja za dvostruko u odnosu na minimalnu efektivnu koncentraciju. Fotodinamička inaktivacija uz prisutnost svjetla ovisna je o vremenu izlaganja, te je 100% inaktivacija za bakteriju *K. pneumoniae* ATCC 700603 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi za 1xMEK koncentraciju dosegnuta nakon 60 minuta kontinuiranog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti, dok je u sterilnoj vodi iz slavine dosegnuta nakon 15 minuta. Za bakteriju *K. pneumoniae* OXA NTCT 13442 100% inaktivacija u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi za 1xMEK koncentraciju dosegnuta je nakon 30 minuta kontinuiranog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti, a u sterilnoj vodi iz slavine dosegnuta je nakon 15 minuta, dok je za bakteriju *P. aeruginosa* ATCC 27850 u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi i u sterilnoj vodi iz slavine za 1xMEK koncentraciju dosegnuta nakon 15 minuta kontinuiranog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti. Zbog toga što uništava veliki broj gram-pozitivnih i gram-negativnih organizama, ali i zbog smanjene mogućnosti stvaranja rezistencije kationski porfirin TMPyP3 pokazuje dobar antimikrobni

potencijal kod inaktivacije osjetljivih, ali i kod inaktivacije rezistentnih sojeva, te bi trebalo provesti daljnja istraživanja na ovu temu.

## 7. LITERATURA

1. Al Aukidy M, Al Chalabi S, Verlicchi P. Hospital Wastewater Treatments Adopted in Asia, Africa, and Australia. *Hospital Wastewaters*. 2017 Feb 25;60:171–88,
2. Bartolomeu M, Reis S, Fontes M, Neves M, Faustino M, Almeida A. Photodynamic Action against Wastewater Microorganisms and Chemical Pollutants: An Effective Approach with Low Environmental Impact. *Water* [Internet]. 2017 Aug 23;9(9):630,
3. Bracamontes-Ruelas AR, Ordaz-Díaz LA, Bailón-Salas AM, Ríos-Saucedo JC, Reyes-Vidal Y, Reynoso-Cuevas L. Emerging Pollutants in Wastewater, Advanced Oxidation Processes as an Alternative Treatment and Perspectives. *Processes* [Internet]. 2022 May 23;10(5):1041,
4. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jun 17;90(12):889-905,
5. E. Alves, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, Â. Cunha, H. Nadais, and A. Almeida, "Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 22, pp. 34–57, 2015,
6. Liu D, Gu W, Wang L, Sun J. Photodynamic inactivation and its application in food preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021 Aug 28:1-15,
7. Zakon o vodama (»Narodne novine«, br. 107/95 i 150/05) – Pravilnik o graničnim vrijednostima opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama,
8. Tomić H. Obrada otpadnih voda : diplomski rad [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Rudarsko-geološko-naftni fakultet; 2019 [pristupljeno 05.09.2022.],
9. Crepulja A. Fotodinamički učinak kationskog porfirina TMPyP3 na rezistentne bakterije u komunalnoj otpadnoj vodi [Diplomski rad]. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2020 [pristupljeno 05.09.2022.],
10. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Sep 2;57(13):2857-2876,
11. Kalenić S. Rezistencija bakterija na antibiotike. *Medicus* [Internet]. 2000 [pristupljeno 06.09.2022.];9(2\_Antibiotici):149-153,
12. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*. 2018 Nov 30;9:2928.
13. Cvetnić Ž, Ostojić M, Kvesić A. Mikrobiologija i parazitologija, Mostar: Sveučilište u Mostaru, Farmaceutski fakultet, 2013,
14. Kuzman I.; Infektologija za visoke zdravstvene škole. Zagreb: Medicinska naklada, 2012,
15. Haney Carr, J. and Arduino, M., 2022. [online] Pixnio. Available at: <<https://pixnio.com/hr/znanost/mikroskopske-slike/staphylococcus-aureus/visoke-uvecanje-10000-x-deformacije-staphylococcus-aureus-bakterije>> [Accessed 8 September 2022].

16. Baršić B. Spektr infekcija uzrokovanih meticilin-rezistentnim sojevima bakterije *Staphylococcus aureus*. Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti [Internet]. 2012 [pristupljeno 10.09.2022.];(511=37):96-96,
17. Centers for disease control and prevention. 2022. *MRSA Bacteria Photo 1*. [online] Available at: <<https://www.cdc.gov/mrsa/community/photos/photo-mrsa-1.html>> [Accessed 24 September 2022],
18. 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. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 May 19;19(10):6177.
19. Choi M, Hegerle N, Nkeze J, Sen S, Jamindar S, Nasrin S, Sen S, Permala-Booth J, Sinclair J, Tapia MD, Johnson JK, Mamadou S, Thaden JT, Fowler VG Jr, Aguilar A, Terán E, Decre D, Morel F, Krogfelt KA, Brauner A, Protonotariou E, Christaki E, Shindo Y, Lin YT, Kwa AL, Shakoor S, Singh-Moodley A, Perovic O, Jacobs J, Lunguya O, Simon R, Cross AS, Tennant SM. The Diversity of Lipopolysaccharide (O) and Capsular Polysaccharide (K) Antigens of Invasive *Klebsiella pneumoniae* in a Multi-Country Collection. *Front Microbiol*. 2020 Jun 12;11:1249.
20. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. 2022 Feb 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–.
21. Nath A, Joshi SR. Ultrastructural effect on mastitis pathogens by extract of endophytic fungi associated with ethnoveterinary plant, *Hibiscus sabdariffa* L. *J Microsc Ultrastruct*. 2015 Jan-Mar;3(1):38-43. doi: 10.1016/j.jmau.2014.10.001. Epub 2014 Oct 22.
22. Bubonja-Šonje M, Abram M. Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2014 [pristupljeno 10.09.2022.];50(2):128-149.
23. Machuca J, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Mora-Navas L, Mediavilla-Gradolph C, López-Rodríguez I, Pascual Á. OXA-48-Like-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Spain in 2014-2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Dec 21;63(1):e01396-18.
24. Stewart A, Harris P, Henderson A, Paterson D. Treatment of Infections by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Oct 24;62(11):e01195-18.
25. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*. 2020 Jan;166(1):30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860. Erratum in: *Microbiology (Reading)*. 2021 Aug;167(8)
26. Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik* [Internet]. 2012 [pristupljeno 15.09.2022.];32(2):71-80.



27. Nelman-Gonzales M. NASA - Spacebound Bacteria Inspire Earthbound Remedies [Internet]. Nasa.gov. 2022 [cited 16 September 2022]. Available from: [https://www.nasa.gov/topics/shuttle\\_station/features/pseudomonas.html](https://www.nasa.gov/topics/shuttle_station/features/pseudomonas.html)
28. Aroso RT, Schaberle FA, Arnaut LG, Pereira MM. Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases. *Photochem Photobiol Sci*. 2021 Nov;20(11):1497-1545.
29. Dąbrowski JM, Arnaut LG. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Oct;14(10):1765-80,
30. Amos-Tautua BM, Songca SP, Oluwafemi OS. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 2019 Jul 4;24(13):2456.
31. Kashef N, Huang YY, Hamblin MR. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics*. 2017 Aug;6(5):853-879.
32. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004 Dec;1(4):279-93.
33. Liu T, Hu X, Wang Y, Meng L, Zhou Y, Zhang J, Chen M, Zhang X. Triazine-based covalent organic frameworks for photodynamic inactivation of bacteria as type-II photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Oct;175:156-162.
34. MacDonald I, Dougherty T. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001;05(02):105-129.
35. Zubarev D, Boldyrev A. Revealing Intuitively Assessable Chemical Bonding Patterns in Organic Aromatic Molecules via Adaptive Natural Density Partitioning. *The Journal of Organic Chemistry*. 2008;73(23):9251-9258.,
36. Wang Z, Stout S, Fingas M. Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification. *Environmental Forensics*. 2006;7(2):105-146.
37. Goldoni A. Porphyrins: fascinating molecules with biological significance. In: *ELETTRA highlights 2001–2002*. Sincrotrone Trieste SCpA, Trieste, Italy. 2002, pp. 64–66.
38. Mušković M, Čavar I, Lesar A, Lončarić M, Malatesti N, Gobin I. Photodynamic Inactivation of *Legionella pneumophila* Biofilm Formation by Cationic Tetra- and Tripyridylporphyrins in Waters of Different Hardness. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 23;22(16):9095
39. Prushan M. Absorption and Fluorescence Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin§ and Metallo-Tetraphenylporphyrin [Internet]. Philadelphia, USA: La Salle University; 2005 [cited 19 September 2022]. Available from: <https://www1.lasalle.edu/~prushan/Abs%20and%20Fluor%20of%20TPPH2.pdf>
40. Wang D, Kyere E, Ahmed Sadiq F. New Trends in Photodynamic Inactivation (PDI) Combating Biofilms in the Food Industry-A Review. *Foods*. 2021 Oct 26;10(11):2587
41. Zhu S, Song Y, Pei J, Xue F, Cui X, Xiong X, Li C. The application of photodynamic inactivation to microorganisms in food. *Food Chem X*. 2021 Oct 28;12:100150

42. Ribeiro C, Lourenço L. Overview of cationic phthalocyanines for effective photoinactivation of pathogenic microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2021;48:100422.
43. Difference of Gram-positive and Gram-negative bacteria [Internet]. Designua. 2022 [cited 18 September 2022]. Available from: <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024>
44. Sułek A, Pucelik B, Kobielski M, Barzowska A, Dąbrowski JM. Photodynamic Inactivation of Bacteria with Porphyrin Derivatives: Effect of Charge, Lipophilicity, ROS Generation, and Cellular Uptake on Their Biological Activity In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 18;21(22):8716.
45. Maravić A, Skočibušić M, Cvjetan S, Šamanić I, Fredotović Ž, Puizina J. Prevalence and diversity of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Mar Pollut Bull*. 2015 Jan 15;90(1-2):60-7.
46. Hernández F, Calisto-Ulloa N, Gómez-Fuentes C, Gómez M, Ferrer J, González-Rocha G, Bello-Toledo H, Botero-Coy AM, Boix C, Ibáñez M, Montory M. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *J Hazard Mater*. 2019 Feb 5;363:447-456.
47. Tang HM, Hamblin MR, Yow CM. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother*. 2007 Apr;13(2):87-91.
48. Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Aug;8(2):108-20
49. Zakon o vodama (»Narodne novine«, br. 66/2019) – Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih tvari.

## 8. ŽIVOTOPIS



### Matej Planinić

📍 Adresa: Gradnići 4, 88260, Čitluk, Bosna i Hercegovina

✉ E-adresa: [mateiplaninic46@gmail.com](mailto:mateiplaninic46@gmail.com) 📞 Telefonski broj: (+385) 976813861

📞 Telefonski broj: (+387) 63212329

🌐 LinkedIn: <https://www.linkedin.com/in/matej-planinić-3026611ab/>

Datum rođenja: 04. lipnja 1998. Državljanstvo: hrvatsko

#### OBRAZOVANJE I OSPO- SOBLJAVANJE

---

[ 14. listopada 2020. –  
Trenutačno ]

##### **Prvostupnik sanitarnog inženjerstva**

*Medicinski fakultet na Sveučilištu u Rijeci* <https://www.medri.uniri.hr/hr/>

Adresa: Ulica Braće Branchetta 20, 51000, Rijeka, Hrvatska

Područja obrazovanja: Zdravstvo i socijalna skrb : *Interdisciplinarni programi i kvalifikacije u području zdravstva i socijalne skrbi*

[ 21. kolovoza 2022. –  
Trenutačno ]

##### **Karate sudac (pomoćni županijski KUMITE i glavni županijski KATE)**

*Hrvatski Karate Savez* <https://karate.hr/web/index.php>

Adresa: Trg Krešimira Čosića 11, 11000, Zagreb, Hrvatska

[ 20. svibnja 2022. –  
20. srpnja 2022. ]

##### **Međunarodna studentska razmjena "ERASMUS"**

*Univerza v Ljubljani Zdravstvena fakulteta* <https://www.zf.uni-lj.si/si/>

Adresa: Zdravstvena pot 5, 100, Ljubljana, Slovenija

[ 01. listopada 2021. –  
20. srpnja 2022. ]

##### **Ekperimentalni dio diplomskog rada u mikrobiološkom laboratoriju**

*Medicinski fakultet na Sveučilištu u Rijeci* <https://www.medri.uniri.hr/hr/>

Adresa: Braće Branchetta 20, 51000, Rijeka, Hrvatska

Glavni predmet / profesionalne vještine:

Istraživanje na temu: "Utjecaj kationskih porfirina na višestruko rezistentne bakterije u komunalnoj otpadnoj vodi".

Mentor: izv. dr. sc. Ivana Gobin,

Komentor: izv. dr. sc. Nela Malatesti.

## JEZIČNE VJEŠTINE

---

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C1 ČITANJE B2 PISANJE B2

GOVORNA PRODUKCIJA B2 GOVORNA INTERAKCIJA B2

njemački

SLUŠANJE A1 ČITANJE A1 PISANJE A1

GOVORNA PRODUKCIJA A1 GOVORNA INTERAKCIJA A1

## DIGITALNE VJEŠTINE

---

### Moje digitalne vještine

Windows | Microsoft Word | Internet | MS Office (Word Excel PowerPoint) |  
Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) | Informacije i komunikacija  
(pretraživanje interneta) | korištenje alata za statistiku obradu i analizu podataka Statistica  
| Rad na računalu

## PUBLIKACIJE

---

[ 2022 ]

Combined Biocidal Effect of Gaseous Ozone and Citric Acid on *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formed on Ceramic Tiles and Polystyrene as a Novel Approach for Infection Prevention and Control

<https://www.mdpi.com/2227-9717/10/9/1788>

## VOZAČKA DOZVOLA

---

Automobili: B

## KONFERENCIJE I SEMI-NARI

---

[ 04. travnja 2019. –  
05. travnja 2019. ]

Drugi Studentski kongres zaštite zdravlja "Sanitas" Rijeka, Hrvatska

Pasivni sudionik

[ 08. svibnja 2019. ]

Prvi Studentski kongres "Sanitarno inženjerstvo jučer, danas, sutra"  
Mostar, BiH

Pasivni sudionik

[ 07. lipnja 2019. ]

Manifestacija promocije održivog razvoja Sarajevo, BiH

Pasivni sudionik

[ 25. rujna 2019. –  
26. rujna 2019. ]

Treći Studentski kongres "Okolišnog zdravlja s međunarodnim učešćem"

Rijeka, Hrvatska

Pasivni sudionik

[ 16. siječnja 2020. ] Drugi znanstveni BH Cochrane simpozij "Cochrane za sve" Mostar, BiH  
Pasivni sudionik

[ 06. veljače 2020. ]

Međunarodni znanstveno - stručni skup "Znanost, znanstvena komunikacija i časopisi"  
Mostar, BiH  
Pasivni sudionik

[ 18. lipnja 2020. –  
20. lipnja 2020. ] Treći Studentski kongres zaštite zdravlja "Sanitas" Rijeka, Hrvatska  
Pasivni sudionik

[ 17. rujna 2020. ] Prvi Studentski simpozij sanitarnog inženjerstva "SanMo" Mostar, BiH  
Pasivni sudionik

[ 05. svibnja 2021. –  
06. svibnja 2021. ] Drugi Studentski simpozij Sanitarnog inženjerstva "SanMo" Mostar, BiH  
Pasivni sudionik

[ 20. svibnja 2021. –  
21. svibnja 2021. ] Četvrti Studentski kongres zaštite zdravlja "Sanitas" Rijeka, Hrvatska  
Pasivni sudionik

[ 08. travnja 2022. –  
09. travnja 2022. ] Peti Studentski kongres zaštite zdravlja "Sanitas" Rijeka, Hrvatska  
Aktivni sudionik

[ 05. svibnja 2022. –  
06. svibnja 2022. ] Studentski simpozij Sanitarnog inženjerstva "SanMo 2022" Mostar, BiH  
Aktivni sudionik

#### **POČASTI I NAGRADE**

---

[ 26. ožujka 2020. ] Dekanova nagrada za najboljeg studenta u akademskoj godini 2018./2019. Ustanova koja je dodijelila priznanje/nagradu: Fakultet zdravstvenih studija na Sveučilištu u Mostaru

Crni pojas u karateu Ustanova koja je dodijelila priznanje/nagradu: Hrvatski Karate Savez

[ 06. svibnja 2022. ] Najbolje usmeno izlaganje na studentskom simpoziju "SanMo 2022" Ustanova koja je dodijelila priznanje/nagradu: Fakultet zdravstvenih studija Mostar

#### **ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE**

---

Drugi Studentski simpozij Sanitarnog inženjerstva "SanMo" 2021  
Organizacijski odbor

Četvrti Studentski kongres zaštite zdravlja "Sanitas" 2021  
Organizacijski odbor

Peti Studentski kongres zaštite zdravlja "Sanitas" 2022  
Organizacijski odbor

Studentski simpozij Sanitarnog inženjerstva "SanMo 2022"  
Organizacijski odbor

**VOLONTIRANJE**

---

[ 2016 – 2018 ] Volonter u udruzi "Marijine Ruke" Međugorje, BiH