

Utjecaj ozona na biofilm kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*

Kovač, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:184:682743>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Kovač

UTJECAJ OZONA NA BIOFILM KLINIČKIH IZOLATA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bruno Kovač

UTJECAJ OZONA NA BIOFILM KLINIČKIH IZOLATA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

Diplomski rad obranjen je dana 29.06.2023. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Vanja Vasiljev, dipl. sanit. ing.
2. prof. dr. sc. Darinka Vučković, dr. med.
3. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Rad ima 57 stranica, 26 slika, 6 grafikona, 6 tablica i 55 literaturnih navoda.

Proslov

Ovaj diplomski rad nastao je kao produkt rada na projektu „Oportunistički patogeni vodoopskrbnog sustava: novi izazov u obradi voda“ financiran od strane Sveučilišta u Rijeci (broj odobrenja: UNIRI-biomed-18-171).

Veliko hvala na svim pruženim mogućnostima, prilikama, savjetima i putovanjima mojoj mentorici od početka prijediplomskog studija pa do danas, prof. dr. sc. Ivani Gobin.

Zahvaljujem se i Kaći Piletić kao svojoj suradnici na projektu i koautorici provedenih istraživanja.

Također se zahvaljujem obitelji, prijateljima i svima ostalima koji su cijeli ovaj proces olakšavali kroz ove akademske godine.

SAŽETAK

Bolničke infekcije predstavljaju jedan od važnijih izazova u medicini u 21. stoljeću, a multi-rezistentni mikroorganizmi se ističu kao njihovi glavni uzročnici. Među njima je *Klebsiella pneumoniae*, emergentna patogena bakterija koja u formi biofilma može kontaminirati bolničko okruženje čija je eradikacija sa standardnim dezinficijensima vrlo teška. Stoga se posljednjih godina razvijaju nove moderne tehnologije suzbijanja biofilmova s ciljem postizanja asepsa u bolničkom okruženju. Kao jedna od učinkovitih metoda pokazala se primjena plinovitog ozona budući da ozon posjeduje jaka antimikrobna svojstva i visoki oksidacijski potencijal. Cilj ovog rada bio je utvrditi učinkovitost plinovitog ozona na redukciju broja bakterija u biofilmu pet kliničkih i jednog standardnog soja *K. pneumoniae* tijekom 60-minutne izloženosti ozonu te kvantificirati količinu biofilma prije i nakon tretmana koristeći različite metode detekcije. Biofilmovi svih ispitivanih sojeva stvoreni su na keramičkim pločicama dimenzija 2,5 cm x 2,5 cm tijekom 24h koji su zatim izloženi djelovanju ozona kroz 1h. Nakon ispiranja, određen je ukupan broj kultivabilnih bakterija, izmjerena je biološka aktivnost te ukupna biomasa nakon bojenja kristal-violetom. Analizom pretražnim elektronskim mikroskopom vizualizirana je destrukcija biofilma. Plinoviti ozon pokazao se vrlo učinkovitim te statistički značajnim u uništavanju stvorenih bakterijskih biofilmova na keramičkim pločicama. Tretman ozonom je uzrokovao smanjenje ukupnog broja kultivabilnih bakterija do $2,63 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ te smanjio količinu ukupne biomase do 67,17%. Postotci inhibicije varirali su od 36,61% do 99,76%, ovisno o korištenoj metodi kvantifikacije. Sve metode korištene u ovom istraživanju učinkovite su u određivanju inhibicije stvaranja biofilma plinovitog ozona, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ispitaio združeni učinak s drugim metodama dezinfekcije.

Ključne riječi: biofilm, dezinfekcija, plinoviti ozon, *Klebsiella pneumoniae*

SUMMARY

Hospital-acquired infections represent one of the most important challenges in medicine in the 21st century, and multi-resistant microorganisms stand out as their main causative agents. Among them is *Klebsiella pneumoniae*, an emerging and pathogenic bacterium that can contaminate the hospital environment in the form of a biofilm, whose eradication with standard disinfectants is very difficult. Therefore, in recent years, new modern biofilm suppression technologies have been developed with the aim of greater microbiological purity. One of the most effective methods is the application of gaseous ozone since ozone has strong antimicrobial properties and a high oxidation potential. The aim of this work was to determine the effectiveness of gaseous ozone in reducing the number of bacteria in the biofilm of five clinical and one standard strain of *K. pneumoniae* during a 60-minute exposure to ozone and to quantify the amount of biofilm before and after treatment using different methods. Biofilms of all tested strains were created on ceramic plates measuring 2.5 cm x 2.5 cm for 24 hours, which were then exposed to ozone for 1 hour. After washing, the total number of cultivable bacteria was determined, biological activity and total biomass were measured after staining with crystal violet. Analysis with a scanning electron microscope visualized the destruction of the biofilm. Gaseous ozone proved to be very effective and statistically significant in destroying the created bacterial biofilms on ceramic tiles. Ozone treatment caused a decrease in the total number of cultivable bacteria to $2.63 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$, followed by a decrease in total biomass to 67.17%. The inhibition percentages varied from 36.61% to 99.76%, depending on the quantification method used. All methods used in this research are effective in determining the ability of gaseous ozone against biofilms, but additional research is required.

Keywords: biofilm, disinfection, gaseous ozone, *Klebsiella pneumoniae*

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	IV
SUMMARY	V
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA	1
1.1. Višestruko rezistentni mikroorganizmi kao uzročnici bolničkih infekcija.....	1
1.2. Biofilm.....	4
1.3. Karakteristike ozona	7
1.3.1. Svojstva i struktura ozona te reakcije u kojima sudjeluje.....	7
1.3.2. Načini dobivanja ozona i njegova primjena.....	9
1.3.2.1. Metoda koronarnog pražnjenja.....	9
1.3.2.2. Metoda primjene ultraljubičastog zračenja	10
1.3.3. Stratosferski i troposferski ozon	11
1.3.4. Mehanizam djelovanja plinovitog ozona na bakterijski biofilm.....	12
1.3.5. Raspad ozona	13
1.4. <i>Klebsiella</i> spp.	14
1.4.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.4.1.1. Čimbenici virulencije	17
1.4.2. Antibiotici i podjela antibiotika.....	19
1.4.2.1. β -laktamski antibiotici.....	21
1.4.2.2. Klasifikacija karbapenemaza.....	22
2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	25
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Laboratorijski pribor, kemikalije i uređaji.....	26
3.2. Korišteni mikroorganizmi.....	27
3.2.1. Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike korištenih <i>K. pneumoniae</i> sojeva.....	27
3.2.2. Priprema keramičkih pločica	28
3.2.3. Priprema bakterijskih suspenzija	28
3.2.4. Tretman plinovitim ozonom	28
3.2.5. Metode detekcije i kvantifikacije biofilma	30
3.2.5.1. Određivanje ukupnog broja kultivabilnih bakterija	30
3.2.5.2. Mjerenje biološke aktivnosti prije i nakon tretmana plinovitim ozonom	32
3.2.5.3. Ukupna biomasa prije i nakon tretmana plinovitim ozonom	33
3.2.5.4. Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM)	33
3.2.6. Statistička obrada podataka.....	34

4. REZULTATI.....	35
4.1. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike	35
4.2. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma	36
4.3. Prikaz broja kultivabilnih bakterija prije i nakon tretmana plinovitim ozonom.....	40
4.4. Smanjenje biološke aktivnosti nakon tretmana plinovitim ozonom.....	41
4.5. Redukcija biomase nakon tretmana plinovitim ozonom određena bojanjem kristal violetom.....	42
4.6. Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM)	43
4.7. Postotci inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom.....	45
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČAK	50
7. LITERATURA	51
8. ŽIVOTOPIS.....	57

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA

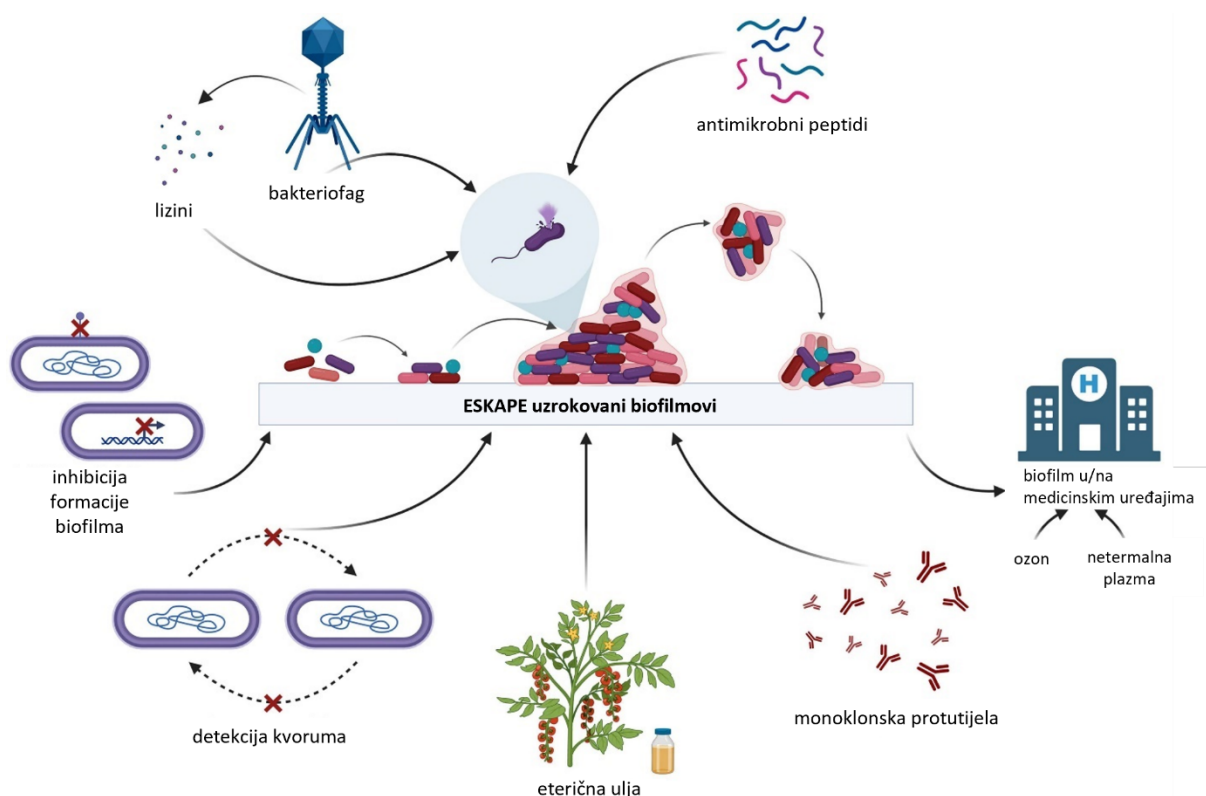
1.1. Višestruko rezistentni mikroorganizmi kao uzročnici bolničkih infekcija

Bolničke infekcije (eng. *hospital acquired infections*, HAI) predstavljaju jedan od važnijih izazova u medicini u 21. stoljeću (1). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) definira bolničke infekcije kao svaku infekciju stečenu u ustanovama za zdravstvenu njegu za koju se utvrdi da se razvila kao posljedica liječenja i skrbi te nakon terapijskog ili dijagnostičkog postupka. Izraz *bolničke infekcije* sve je manje u upotrebi te se zamjenjuje izrazom *infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi* jer se iste mogu pojaviti i razviti na bilo kojem mjestu i van bolnice gdje se pruža neki vid zdravstvene zaštite (2). Pojavnost bolničkih infekcija kontinuirano raste kroz godine posebno u zemljama u razvoju gdje one povećavaju stopu mortaliteta i morbiditeta, produljuju vrijeme hospitalizacije te predstavljaju svojevrsni veliki trošak za zdravstvo (3). Svjetska zdravstvena organizacija kao glavni, jeftin i efektivan način prevencije razvoja bolničkih infekcija, promovira i potiče pravilno i higijensko pranje ruku gdje su zdravstveni radnici dužni oprati svoje ruke prije diranja pacijenta, čišćenja i previjanja rana, nakon diranja pacijenta te prilikom bilo kojeg mogućeg kontakta s pacijentom i njegovim tjelesnim izlučevinama (4). Preporuča se i dezinfekcija ruku dezinficijensom na bazi alkohola (5). Postoje istraživanja koja su potvrdila da jednostavno pranje ruku i dezinfekcija alkoholnim dezinficijensom pomaže prevenirati razvoj bolničke infekcije, smanjiti morbiditet i smanjiti troškove liječenja (6). Pored Svjetske zdravstvene organizacije, Centar za kontrolu i sprječavanje bolesti (eng. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) razvio je plan s nizom smjernica za prevenciju bolničkih infekcija koji također naglašavaju važnost pranja ruku. Plan i smjernice Centra za kontrolu i sprečavanje bolesti za prevenciju bolničkih infekcija dotiču se i rezistencije na antibiotike (7). Kao još jedan od načina prevencije zdravstvenih radnika od bolničkih infekcija navodi se korištenje jednokratnih rukavica, maski za lice, vizira, zaštitnih naočala i ostale opreme kako bi se spriječio prijenos mikroorganizama te doticaj s eventualno infektivnim tjelesnim tekućinama (8).

Bolničke infekcije najčešće su uzrokovane višestruko rezistentnim organizmima (eng. *multidrug-resistant organisms*, MDRO) za koje je karakteristično da su otporni na djelovanje više antibiotika (9). Višestruko rezistentni organizmi koji su najproblematičniji uzročnici bolničkih infekcija pripadnici su ESKAPE grupe. ESKAPE je akronim koji udružuje šest najvirulentnijih bakterija odgovornih za otprilike $\frac{2}{3}$ svih bakterijskih infekcija, a to su

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. ESKAPE grupa sadrži gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, od kojih su dominantnije gram-negativne (10). Inaktivacija lijeka, modifikacija mjesta vezanja lijeka, promjene u propusnosti stanica te mutiranje razlozi su neučinkovitosti antimikrobnih lijekova protiv patogena ESKAPE grupe (11). Kao rezultat neučinkovitosti, ovi patogeni mogu preživjeti u bolničkom okružju i prenositi se s jedne osobe na drugu (12).

Zbog rezistencije bakterija ESKAPE grupe na širok raspon antibiotika, postoje ozbiljni izazovi u liječenju njihovih infekcija, osobito kada su u pitanju biofilmovi. Shodno tome, postoji potreba za razvojem novih metoda i tehnika za borbu protiv ovih patogena, s posebnim naglaskom na eradicaciju njihovih biofilmova. Diljem svijeta istražuje se nekoliko strategija za suzbijanje biofilmova povezanih s ESKAPE prikazanih na slici ispod. (13)



Slika 1. Strategije za suzbijanje biofilmova uzrokovanih s ESKAPE. Izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1029098/full>, prevedeno.

Osim cijepljenja (aktivne imunizacije) i monoklonskih protutijela (pasivne imunizacije), u sprječavanju biofilma uzrokovanog ESKAPE bakterijama ističu se antimikrobni peptidi, bakteriofazi i prirodni proizvodi kao što su to eterična ulja. Budući da su ove bakterije uzročnici bolničkih infekcija, ključno je pronaći odgovarajući način tretmana biofilma s obzirom na medicinsku opremu i uređaje na kojima se može pojaviti. Kao mogući tretmani ističu se ozon te primjena netermalne plazme (eng. *non-thermal plasma*, NTP), djelomično ioniziranog plina s antimikrobnim i antibiofilmskim djelovanjem. Pokazalo se da NTP učinkovitije djeluje na gram negativne bakterije u odnosu na gram pozitivne. Primjena eteričnih ulja ističe se kao moguća strategija budući da imaju mali potencijal za razvoj antimikrobne rezistencije zbog svoje kompleksne prirode s višestrukim bioaktivnim komponentama u strukturi. Primjeni i utjecaju ozona posvećena su kasnija poglavlja. (13)

Centar za kontrolu i sprečavanje bolesti (CDC) definira i razlikuje tri tipa rezistentnih bakterija, a to su višestruko rezistentne (eng. *multidrug-resistant*, MDR), prošireno rezistentne (eng. *extensively drug-resistant*, XDR) i potpuno rezistentne (eng. *pandrug-resistant*, PDR). Višestruko rezistentne bakterije su bakterije koje su stekle rezistenciju na barem jedan lijek u tri ili više skupina antibiotika. Prošireno rezistentne bakterije su bakterije koje su neosjetljive na barem jedan lijek u svim skupinama, osim dvije ili manje skupina antibiotika. Posljednja kategorija, potpuno rezistentne bakterije, definirane su kao bakterije koje su rezistentne na sve agense u svim skupinama antibiotika (14).

Da bi se uopće moglo govoriti o razvoju infekcije, potrebno se dotaknuti bakterijske rezistencije koja može biti prirodna i stečena. Prirodna rezistencija predstavlja „normalno“ ponašanje neke bakterijske vrste pa je tako npr. enterokok otporan na cefalosporine, a bakterije roda *Klebsiella* su prirodno otporne na antibiotik ampicilin (15,16). Bakterije roda *Klebsiella* proizvode enzime β -laktamaze koje inaktiviraju lijek prije nego što se on uspije vezati za ciljna mjesta (16). S druge strane, stečena rezistencija nastaje naknadno, najčešće pod pritiskom antibiotika te predstavlja klinički značajno veći problem od prirodne rezistencije (17).

Već je ranije spomenuto pranje ruku kao jedan od glavnih i jeftinih metoda prevencije bolničkih infekcija (3). U slučaju da se ne peru redovito i pravilno, ruke postaju čimbenik koji odmaže prevenciji infekcija te su medij koji služi se održavanje vlažnih, mokrih i prašnjavih površina (17). Prašina može poslužiti kao vezno mjesto za proliferaciju mikroorganizama, što predstavlja dodatan razlog zašto je važno brzo čišćenje i dezinfekcija prostora, bez obzira na to radi li se o bolničkom području ili ne (18). Učinkovita dezinfekcija površina i okoliša, zajedno s pranjem ruku, nisu se pokazale kao mikrobiološki učinkovite metode čišćenja (19). Zbog toga su u tijeku

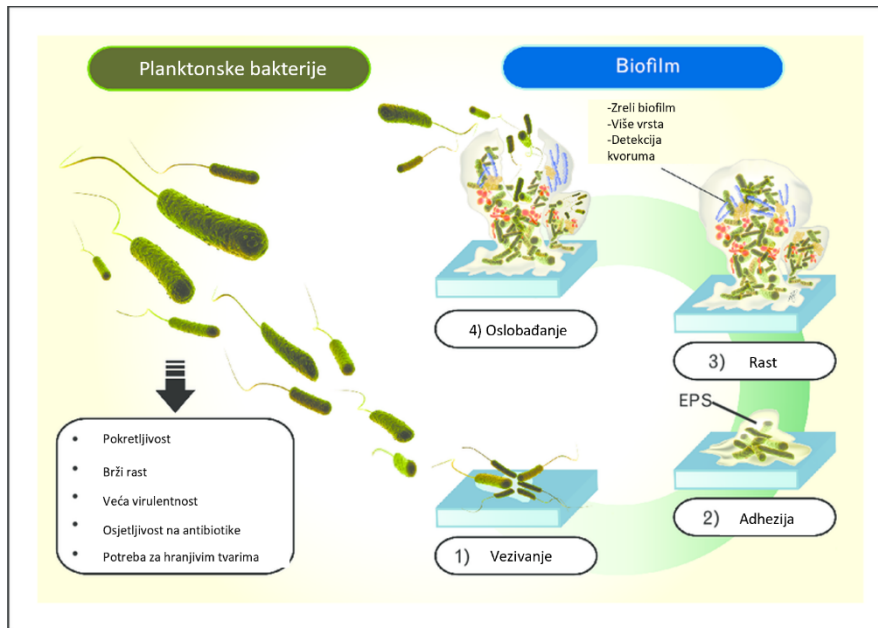
istraživanja alternativnih metoda dezinfekcije i sanitacije, a dezinfekcija plinovitim ozonom ističe se kao jedna od mogućnosti (20). Kao prednost primjene plinovite dezinficijense, u odnosu na standardne metode čišćenja, je u tome što dezinficijens u formi plina može doprijeti do mjesta i površina do kojih je teško doprijeti tekućim dezinficijensom ili standardnim načinom (21).

1.2. Biofilm

Sve veća prisutnost biofilmova je zabrinjavajuća te se razvijaju nove moderne tehnologije s ciljem lakšeg i boljeg suzbijanja biofilmova (22). Za razliku od planktonskih bakterija, biofilm je nakupina bakterija u vlastitoj sluzi na određenoj površini koja je u doticaju s vodom. Biofilm je većinski bakterijski, no unutar njega mogu se naći i alge, protozoe i drugi mikroorganizmi u manjoj koncentraciji. Bakterije unutar biofilma komuniciraju koristeći različite signalne molekule i mehanizme, kao što su to detekcija kvoruma i autoinduktorska molekula AI-2. (23)

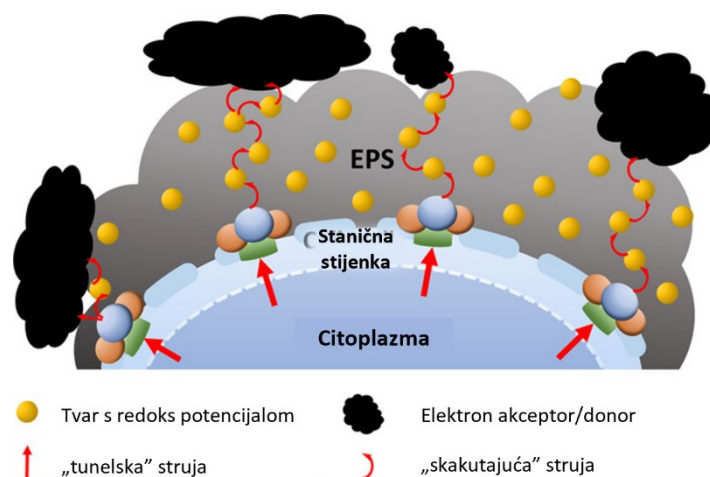
Bakterijama u takvoj zajednici dostupnije su hranjive tvari te pokazuju 150 do 3000 puta veću otpornost prema dezinficijensima na bazi klora nego planktonske bakterije. Provedeno je istraživanje kako dezinficijens na bazi klora utječe na smanjenje broja bakterija u biofilmu. Kao aktivnu tvar dezinficijens je sadržavao benzalkonijev klorid te je dokazano da 5%-tna i 20%-tna otopina tog dezinficijensa statistički značajno smanjuju broj bakterija u biofilmu standardnih sojeva *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium te *Listeria monocytogenes*. Nije ispitivan učinak na biofilm kliničkih izolata. (24)

Ono što je još pozitivna strana za bakterije u biofilmu jest što su zaštićenije od djelovanja antibiotika te je potrebna puno veća koncentracija antibiotika za uništavanje bakterija u biofilmu nego standardno. Upravo zbog sve veće primjene antibiotika, vrlo često neracionalne, stvara se globalni problem kojem danas svjedočimo, a to je antimikrobna rezistencija. (25)



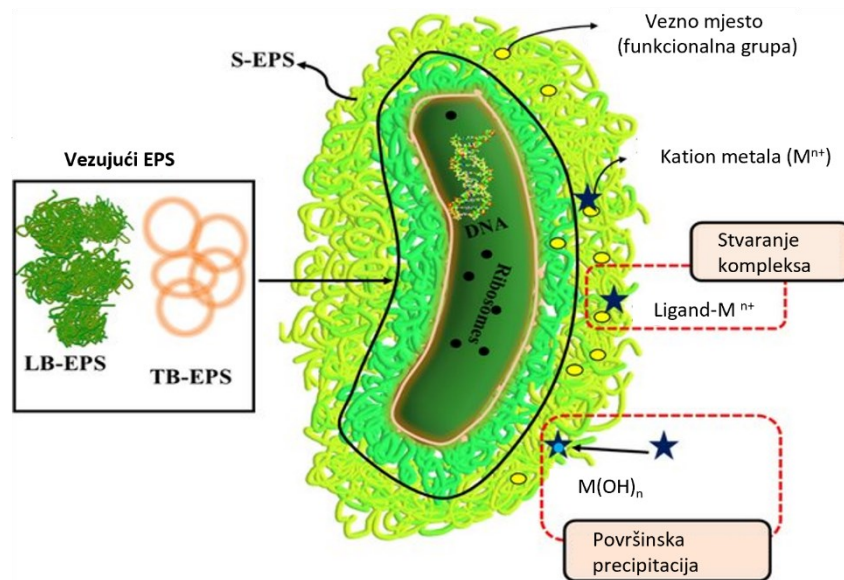
Slika 2. Faze formiranja biofilma. Izvor: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26855081/>, prevedeno.

Na Slici 2. prikazane su faze formiranja biofilma. Za vrijeme trajanja faze adhezije, dolazi do stvaranja i produkcije izvanstaničnih polimernih tvari (eng. *extracellular polymeric substances*, EPS). EPS se sastoji u najvećem djelu od egzopolisaharida, zatim od nukleinske kiseline, proteina, lipida i ostalih bioloških molekula. Za EPS se smatra kako određuje strukturu biofilma te se uzima kao temeljna komponenta koja određuje fizikalno-kemijska svojstva biofilma. (26)



Slika 3. Shematski prikaz položaja EPS-a u odnosu na citoplazmu i staničnu stijenku. Izvor: Yong Xiao et al., Extracellular polymeric substances are transient media for microbial extracellular electron transfer. *Sci. Adv.* 3,e1700623(2017). DOI:10.1126/sciadv.17006, prevedeno.

U građi EPS-a, osim mjesta gdje se vežu metali te tako omogućuju mehanizme apsorpcije metala, postoji vezno mjesto (eng. *binding site*) na koje se vežu funkcionalne grupe npr. antibiotika.



Slika 4. Struktura EPS-a s prikazanim veznim mjestima za metale i funkcionalne grupe. Izvor: 10.1007/s11157-022-09620-5, prevedeno.

Biofilm kao zajednica nema jedno specifično mjesto gdje se može pronaći, već je ubikvitarn, odnosno pojavljuje se svugdje. U kućanstvu se može pronaći u odvodima umivaonika, sudopera, kada te tuš-kabina. Veći problem biofilmovi predstavljaju kada se nađu u zdravstvenim ustanovama te kod imunokompromitiranih pacijenata. Postoji mogućnost da se biofilm formira u kateterima te u cijevima koje dovode kisik na respiratoru te da se na taj način poveća mogućnost zaraze u bolničkim sredinama. No, ukoliko se provodi pravilno čišćenje i dezinfekcija te zbrinjavanje i rukovanje s uređajima, ti mogući problemi trebali bi biti svedeni na minimum. (21,23–25,27,28)

Budući da se pokazalo kako su klasične metode čišćenja i dezinfekcije sve manje djelotvorne na biofilme, razvijaju se nove moderne tehnologije s ciljem zadovoljavanja što veće mikrobiološke čistoće površina i prostorija. Upotreba plinovitog ozona primjer je „no touch“ dekontaminacije, skupa s vodikovim peroksidom u obliku pare i/ili aerosola, uređaja koji zrače ultraljubičasto (UV-C) te *high-intensity narrow-spectrum light* (HINS). (22)

1.3. Karakteristike ozona

Počeci otkrivanja ozona i njegovih karakteristika sežu 200-tinjak godina unatrag, u 1840. godinu do Christiana Friedricha Schönbeina koji je tada primijetio curenje plina s *električnim* i oštrim mirisom te ga nazvao *super aktivnim kisikom* (29). Danas se o samoj strukturi i djelovanju ozona zna jako puno, a njegova primjena sve je šira i korištenija, pogotovo u industrijske svrhe.

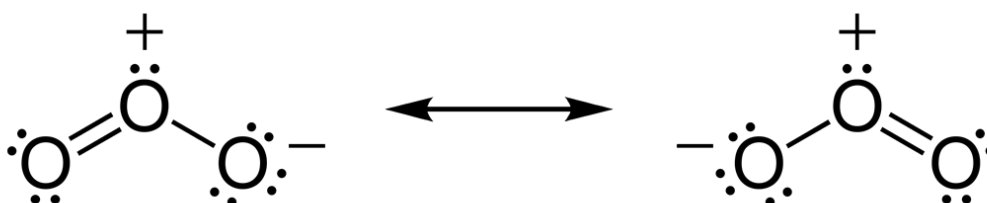
1.3.1. Svojstva i struktura ozona te reakcije u kojima sudjeluje

Alotropna modifikacija pojam je koji opisuje pojavu jedne te iste tvari u dva ili više strukturnih oblika te se takve modifikacije (alotropije) razlikuju po kemijskim i fizikalnim svojstvima. Osim ugljika i fosfora, alotropsku modifikaciju posjeduje i kisik. Riječ je o troatomnoj molekuli kisika – ozonu (O_3). Ozon je plin blijedo plave boje te karakteristično oštrog mirisa kao što je to nakon grmljavinske oluje (30). U prilog tome da je oštrog i prodornog mirisa, govori činjenica da ga pri koncentraciji od 0,0001 % u zraku većina ljudi može osjetiti. Primjer gdje se može uočiti razlika u svojstvima između kisika (O_2) i ozona (O_3) jest magnetičnost. Kisik je paramagnetičan, dok je ozon dijamagnetičan (31). Dijamagnetizam je pojava do koje dolazi kada su u nekom atomu svi elektroni spareni, odnosno nema nesparenih elektrona. Zbog toga što su svi elektroni spareni, njihovi spinski magnetski momenti se poništavaju. S druge strane, u molekuli kisika nisu spareni svi elektroni te dolazi do paramagnetizma. Ostala fizikalna i termokemijska svojstva ozona nalaze se u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz fizikalnih i termokemijskih svojstava plinovitog ozona (O_3) s pripadajućim vrijednostima.

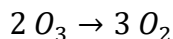
Fizikalna svojstva	Molarna masa	48,0 g/mol
	Talište	-192 °C
	Vrelište	-112 °C
	Gustoća (kod 0 °C)	2,144 kg/m ³
	Topljivost (kod 0 °C)	1,05 g/dm ³
Termokemijska svojstva	Standardna entalpija oblikovanja $\Delta_f H^\circ$	142,67 kJ/mol
	Standardna molarna entropija S°	238,92 J K ⁻¹ mol ⁻¹

Molekula ozona strukturno jako sliči molekuli vode. Polarna je kao i molekula vode te sadrži jednu jednostruku kovalentnu i jednu dvostruku kovalentnu vezu. Kut između atoma kisika u molekuli ozona iznosi 116,78 °. Za usporedbu, kut između atoma vodika i kisika u molekuli vode iznosi 104,9 °, a obje veze su jednostruko kovalentne. Struktura molekule ozona prikazana je na Slici 6.

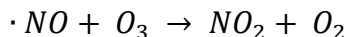


Slika 5. Struktura molekule ozona (O_3). Izvor: Autor Ben Mills - Vlastito djelo postavljača, Javno vlasništvo, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6875842>

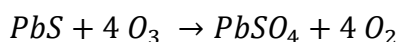
Ozon sudjeluje u čitavom nizu kemijskih reakcija u funkciji snažnog oksidansa. Po jačini se nalazi na drugom mjestu, odmah nakon fluora (9F). Budući da je vrlo nestabilan pri višim koncentracijama, njegov raspad može se prikazati jednostavnom reakcijom:



gdje iz dvije molekule ozona nastaju tri molekule kisika. Kao katalizatori ovog raspada mogu se smatrati povišena temperatura i tlak budući da oni pospješuju raspad molekule ozona. Ozon u doticaju s metalima uzrokuje povećanje oksidacijskog stupnja metala, a prilikom reakcije s dušikovim oksidom dovodi do procesa kemoluminiscencije. Donjom jednadžbom prikazana je reakcija koja posljedično uzrokuje kemoluminiscenciju.

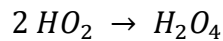
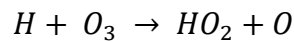


Još jedan primjer oksidacijske sposobnosti ozona je oksidacija sulfida i sulfita da bi nastali sulfati. Kao primjer može poslužiti iduća jednadžba:



Gore navedene reakcije samo su neki od primjera jake oksidacijske moći molekule ozona. Uz njih, postoji još čitav niz mogućih primjera i reakcija kojima je moguće prikazati djelotvornost ozona.

Iz Tablice 1. vidljivo je da je talište ozona na $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ te na vrijednostima nižim od navedene temperature, ozon prelazi iz plinovitog oblika u tekućinu. Ono što je interesantno je da i tekući ozon može ulaziti u reakcije i reagirati na niskim temperaturama. Reakcijom tekućeg ozona s vodikom na temperaturi od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ nastaje superoksidni radikal kako slijedi:

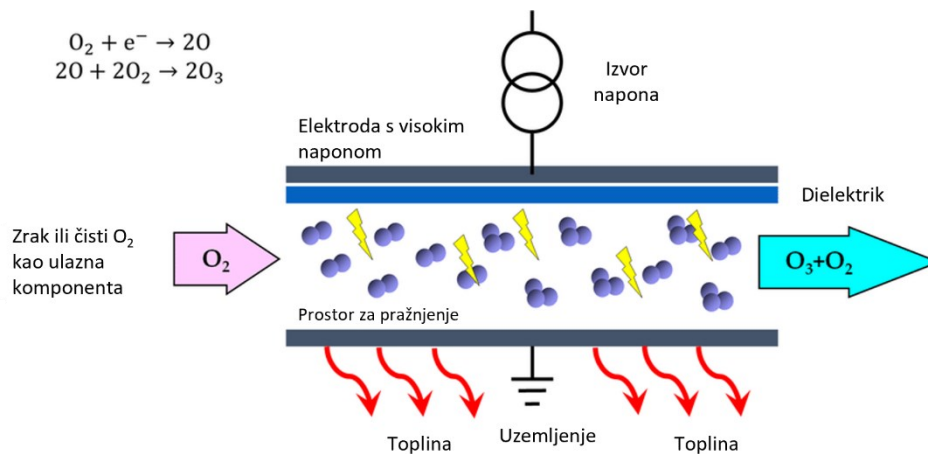


1.3.2. Načini dobivanja ozona i njegova primjena

Postoje dvije metode dobivanja ozona koje se najčešće koriste u praksi te u industrijskoj proizvodnji. Ostale metode su preskupe da bi se isplatile.

1.3.2.1. Metoda koronarnog pražnjenja

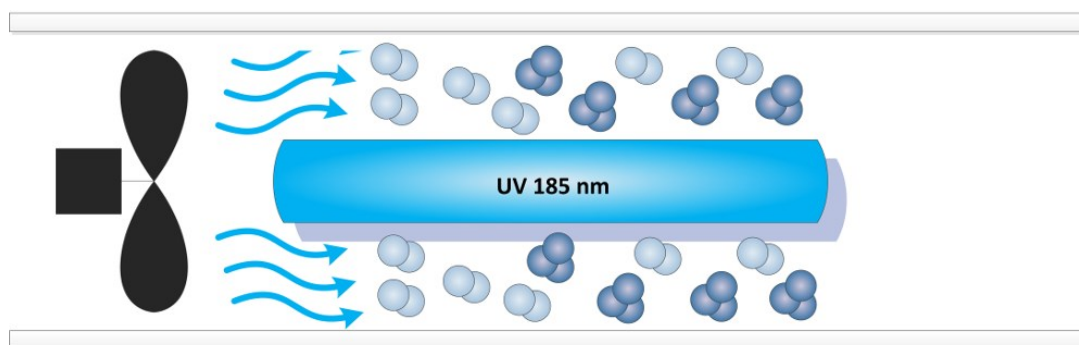
Metoda koronarnog pražnjenja najčešća je metoda koja se koristi za proizvodnju ozona u industrijske svrhe. Princip nastanka ozona ovom metodom je slijedeći. Generator ozona na ulaznoj točki uzima određeni volumen zraka iz prostorije te ga upuhuje u komoru generatora. Komora generatora nije ništa drugo nego visoko nabijeno električno polje između dvije elektrode. Prilikom prolaska kroz međuelektrodni prostor dolazi do pucanja jednostruke veze u molekuli kisika. Dolazi do stvaranja atomskog kisika (O). Atomski kisik jedan je od slobodnih kisikovih radikala (eng. *reactive oxygen species*, ROS). Takav radikal nastavlja reagirati s kisikom (O_2) tako tvoreći ozon (O_3). Slika 6. shematski prikazuje opisani proces. (32)



Slika 6. Metoda koronarnog pražnjenja. Izvor: 10.3390/foods10030605, prevedeno.

1.3.2.2. Metoda primjene ultraljubičastog zračenja

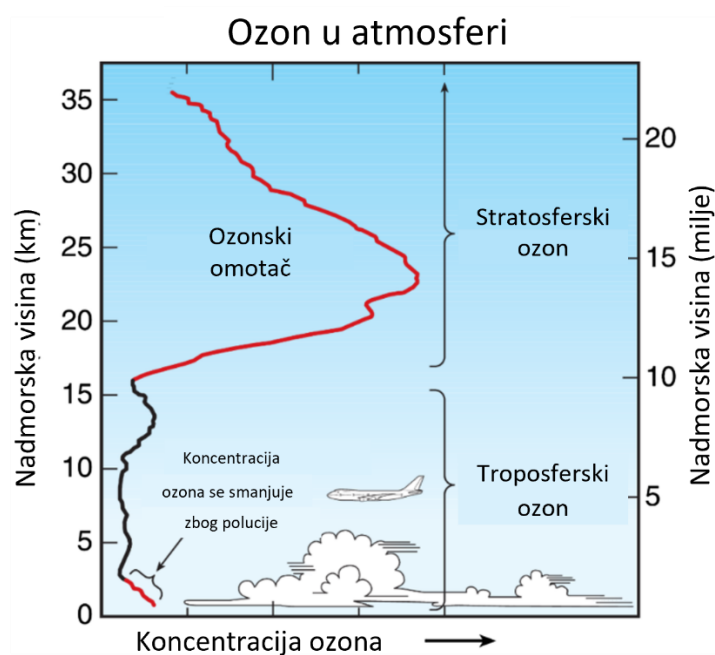
Drugi način dobivanja ozona je primjenom ultraljubičastog zračenja. Ova metoda nije toliko rasprostranjena jer se dobiva vrlo malo konačnog produkta, ali i zbog slabe električne učinkovitosti korištene UV lampe. Razlika između ove metode i metode koronarnog pražnjenja je u tome što se u komori generatora ozona ne koristi visoko nabijeno električno polje nego UV lampa valne duljine 185 nm. Valna duljina od 185 nm ultraljubičastog zračenja odgovorna je za pucanje jednostruke veze u molekuli kisika te stvaranje atomskog kisika (O) i posljedično reakcije spajanja atomskog kisika i molekularnog kisika s ciljem dobivanja ozona (O_3). Slika 7. prikazuje opisani proces. (33)



Slika 7. Generiranje ozona primjenom ultraljubičastog zračenja. Izvor: https://www.oxidationtech.com/media/wysiwyg/Ozone_From_UV_Light_commercially.png.

1.3.3. Stratosferski i troposferski ozon

Osim što se ozon može umjetno stvoriti, on se prirodno nalazi u sastavu atmosfere. Ozon služi kao svojevrsni filter ultraljubičastog zračenja koje dolazi od sunca. Nalazi se u stratosferi, gdje se naziva ozonski omotač, te u troposferi. Ovisno o tome u kojem se sloju atmosfere nalazi, razlikujemo „dobri“ i „loši“ ozon. Koncentracija ozona u atmosferi iskazana je Dobsonovom jedinicom (DU) i u prosjeku je ta vrijednost 300 DU. Troposferski ozon je polutant, ima toksične učinke na ljude i vegetaciju te je u njemu sadržano 10% ukupnog atmosferskog ozona. Ostalih 90% ukupnog atmosferskog ozona nalazi se u stratosferi gdje se ponaša kao štit od ultraljubičastog sunčevog zračenja. U stratosferi, s porastom nadmorske visine, koncentracija ozona se smanjuje dok je u troposferi koncentracija ozona skoro uvijek jednaka. (34)



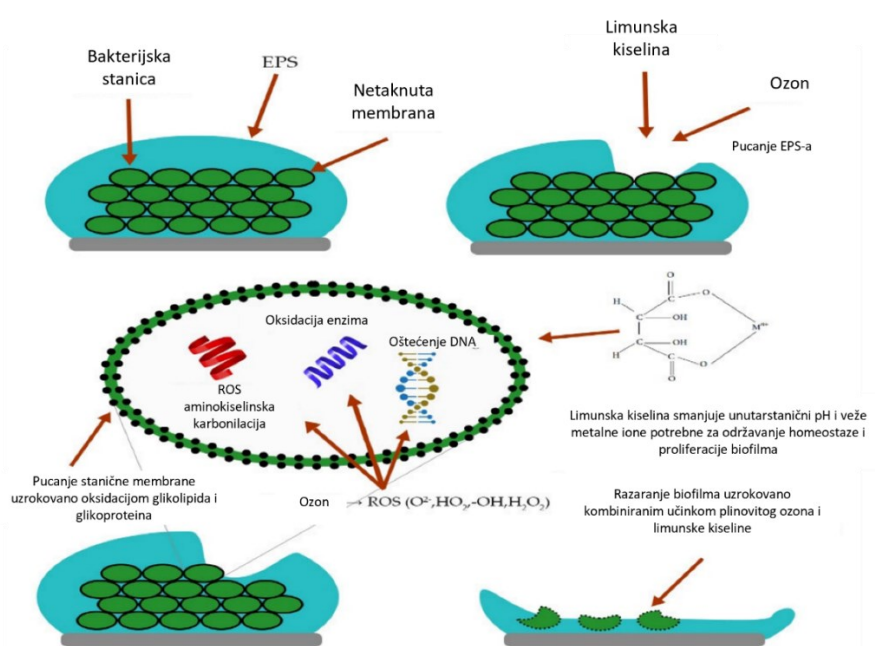
Slika 8. Promjene koncentracije ozona u ovisnosti o nadmorskoj visini i sloju atmosfere. Izvor: Langematz, U. Stratospheric ozone: down and up through the anthropocene. *ChemTexts* 5, 8 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0082-7>, prevedeno.

1.3.4. Mehanizam djelovanja plinovitog ozona na bakterijski biofilm

Osim baktericidnog, ozon posjeduje virucidno, fungicidno i protozoicidno djelovanje. Načelno postoje dva biokemijska mehanizma kojima ozon djeluje na ubijanje mikroorganizama. Jedan od mehanizama je oksidacija sulfhidrilnih veza u aminokiselinama koje tvore proteine. Drugi mehanizam vezan je za polinezasićene masne kiseline gdje one oksidiraju do peroksida. (35)

Istraživanje se bavilo proučavanjem mehanizma djelovanja ozona na biofilm. Došlo se do logičnog zaključka da ozon prvo djeluje na vanjski dio biofilma, odnosno na dijelove EPS-a. Ozon dovodi do stvaranja rupa u EPS-u koje zatim prodiru dalje do stanične membrane. U membrani se pucanje događa zbog oksidacije glikolipida i glikoproteina. Molekule ozona se raspadaju u reaktivne kisikove vrste (ROS) kao što su to superoksidni radikal (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i hidroperoksidni radikal (HO_2). Nastale reaktivne kisikove vrste su zatim odgovorne za oksidaciju enzima, oštećenje DNA i aminokiselinsku karbonilaciju. (27)

Ono što je istraživanje dodatno ispitalo je učinak 15%-tne limunske kiseline koja je kombinirana s tretmanom ozonom. Pokazalo se da limunska kiselina smanjuje pH-vrijednost i veže metale potrebne za postizanje homeostaze te proliferacije biofilma, odnosno djeluje kelirajući. Shematski je navedeno prikazano na Slici 8. (27)

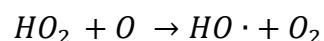
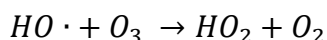


Slika 9. Mehanizam djelovanja plinovitog ozona na biofilm. Izvor: <https://www.mdpi.com/2227-9717/10/9/1788>, prevedeno.

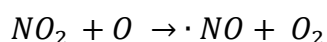
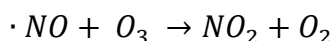
1.3.5. Raspad ozona

Na raspad ozona utječe dosta faktora, počevši od njegove nestabilnosti pri višim koncentracijama. Ozon prilikom svog raspada može uzrokovati različite nizove lančanih reakcija s drugim radikalima.

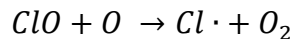
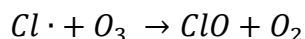
Ukoliko ozon reagira s hidroksilnim radikalom, odvijaju se iduće reakcije:



Ozon može reagirati i s drugim radikalom, kao što je to dušikov (II) oksid:



Kao treći primjer reakcije raspada ozona, ističe se reakcija s radikalom klora:



Ono što se može iz sva tri primjera zaključiti je činjenica da raspadom ozona nastaje molekula kisika te međuprodukt, tj. nestabilan spoj s kisikom, koji dalje reagira s atomskim kisikom i opet tvori početni radikal i produkt molekularni kisik. Takva lančana reakcija ponavlja se neograničeni broj puta i konstantno. (36)

Temperatura okoline, relativna vlažnost kao i brzina strujanja zraka su čimbenici koji u konačnici određuju vrijeme poluraspada ozona (eng. *half-life time*). Interesantna je činjenica da statistički značajno početna koncentracija ozona ne igra ulogu u vremenu poluraspada. Što je veća brzina strujanja zraka, to je manja vrijednost vremena poluraspada ozona. Ukoliko se promatra samo utjecaj temperature, kada se ona povećava od 4 °C prema 40 °C, vrijeme poluraspada se linearno skraćuje. Relativna vlažnost utječe na sličan način, no ne linearno. Ako se povećava relativna vlažnost od 0% prema 30%, tada se vrijeme poluraspada smanjuje za do 54%. Pri relativnoj vlažnosti od 30% do 80%, smanjuje se vrijeme poluraspada za do 36%. (37)

Postoji jednačba kojom se empirijski može izračunati koje će biti vrijeme poluraspada ozona.

$$Y = 2274.4 + 0.483 * x_1 - 17896.76 * x_2 - 51.64 * x_3 - 12.01 * x_4$$

Ukoliko su nam poznati parametri x_1 , x_2 , x_3 i x_4 , uvrštavanjem vrijednosti u gornji izraz možemo vrlo lako dobiti vrijeme poluraspada ozona.

Y je vrijeme poluraspada (min), x_1 je početna koncentracija ozona (ppm), x_2 je brzina strujanja zraka (m^3/s), x_3 predstavlja temperaturu ($^{\circ}C$), a x_4 relativnu vlažnost (%). (37)

Ponašanje ozona prati uobičajene plinske zakone koji održavaju međumolekularne reakcije uslijed raspada toplinske kinetičke energije. Stoga, kako se protok zraka unutar zatvorenog sustava povećava, vrijeme poluraspada ozona se smanjuje. Molekule plina unutar zatvorenog sustava raspršuju se i međusobno djeluju brže kada se protok zraka poveća. Dolazi do interakcije molekula ozona s drugim molekulama ozona te razgradnje ozona na kisik, a time i smanjenju koncentracija ozona. (37)

1.4. *Klebsiella* spp.

Porodica *Enterobacteriaceae* čini 1-2 % ukupne normalne crijevne mikrobiote, a unutar te porodice nalaze se bakterije roda *Klebsiella*. Pojedine vrste roda *Klebsiella* su oportunistički patogeni, a neke su primarni patogeni. Unutar roda *Klebsiella* nalazi se vrsta *Klebsiella pneumoniae*, a unutar koje se nalaze tri podvrste:

- a) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*,
- b) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozenae* i
- c) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (23).

Vrsta *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* oduvijek je poznata samo kao *Klebsiella pneumoniae*. Zbog prekomjerne i često nepotrebne upotrebe antibiotika, sve je izraženija antimikrobna rezistencija, odnosno visoka otpornost na različite antibiotike. Tako je *K. pneumoniae* prirodno otporna na antibiotik ampicilin. Preporuka je da se prije liječenja infekcija uzrokovanih *K. pneumoniae* napravi test osjetljivosti na antibiotike kako bi se točno znalo na koji od niza antibiotika je soj rezistentan, odnosno osjetljiv. Ovo se posebno odnosi na kliničke izolate navedene bakterije kako bi liječnici znali prepisati primjerenu antimikrobnu terapiju (23).

Klebsiella ozenae uzrokuje upalu sluznice nosa s fetidnim zadahom iz nosa. Uz navedeno, može izazvati infekcije mokraćnog sustava, sepsu, meningitis te druge respiratorne infekcije. Pokazuje dobru osjetljivost na antibiotike.

Rinosklerom je kronična upala nosne sluznice uzrokovana s *Klebsiella rhinoscleromatis*. Neki od simptoma ove upale su začepjenost nosa, neugodan zadah te stvaranje granuloma i krusta. Pojavljuje se vrlo rijetko i to ne na području europskog kontinenta.

1.4.1. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae je štapićasta, kapsulirana, gramu negativna bakterija. Nije pokretna i ne stvara spore, a kada je u pitanju njena potreba za kisikom, ističe se kao fakultativni anaerob. Nema specifičnih zahtjeva za rast, no optimalnim se pokazala temperatura između 35 °C i 37 °C te pH 7,2 (23). Osim klasične *K. pneumoniae* (cKp), danas se veća pažnja posvećuje hipervirulentnoj *K. pneumoniae* (hvKp) koja može uzrokovati bolest i kod zdravih pojedinaca te može zaraziti gotovo svako mjesto na tijelu (38).



Slika 10. *Klebsiella pneumoniae*. Izvor: Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "*klebsiella*". *Encyclopedia Britannica*, 12 Sep. 2022, <https://www.britannica.com/science/Klebsiella>.

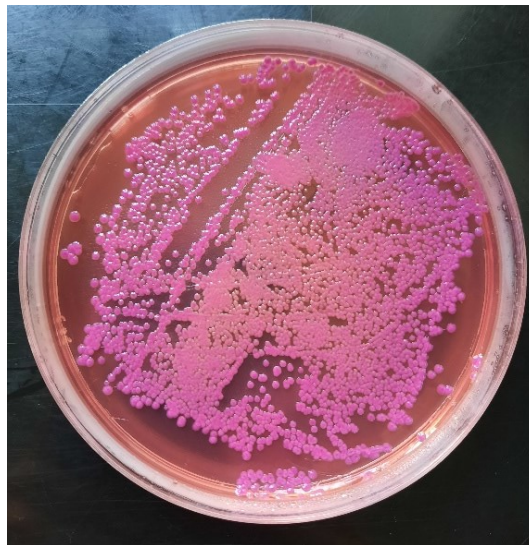
Prvi puta je *K. pneumoniae* opisana 80-tih godina 19. stoljeća kao bacil s kapsulom. Tada je bakterija izolirana iz pluća osobe koja je umrla zbog pneumonije. Par godina kasnije dobiva svoj sadašnji naziv.

K. pneumoniae normalan je stanovnik probavnog sustava, orofarinksa i površina sluznica (23). Problem nastaje kada se bakterija nađe na mjestima gdje nije normalan stanovnik. U ovom

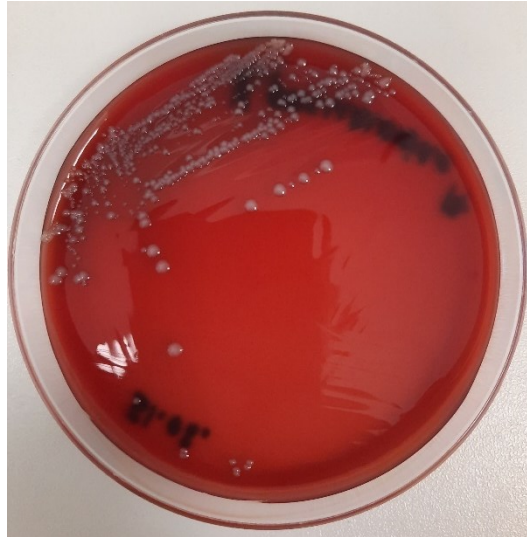
slučaju, riječ je o stanicama i tkivu mokraćnog sustava, moždanim ovojnicama, krvnim žilama i plućima. Najčešće infekcije povezane s zdravstvenom skrbi uzrokovane *K. pneumoniae* su infekcije mokraćnog sustava gdje najveću prevalenciju pokazuju pacijenti s kateterom (39). Također, veću šansu za oboljenje imaju osobe koje su na respiratoru, ukoliko je cijev koja dovodi kisik kontaminirana s *K. pneumoniae*.

Simptomi variraju u ovisnosti od mjesta gdje se prirodno ne nalazi. Ukoliko je *K. pneumoniae* dospjela u krvne žile uzorkovat će temperaturu, zimicu, umor, ošamućenost i promijenjena mentalna stanja. Ukoliko dospije do moždanih uvojnica uzrokovat će meningitis, konfuzije, temperaturu i pretjeranu osjetljivost na jako svjetlo. Može dospjeti do pluća gdje se očitava temperaturom, zimicom, simptomima nalik gripi, problemima s disanjem te kašljem s gnojnim ili krvavim iskašljajem. (23)

Kolonije *K. pneumoniae* na MacConkey agaru su sluzave zbog postojanja kapsule i ružičasto obojene zbog fermentacije laktoze (23). Na običnom, hranjivom agaru, kolonije se očitavaju kao velike, mukozne i bijele. Na krvnom agaru rastu kao bjelkaste i mukozne.



Slika 11. Porast kolonija *K. pneumoniae* na MacConkey agaru. Izvor: autor.



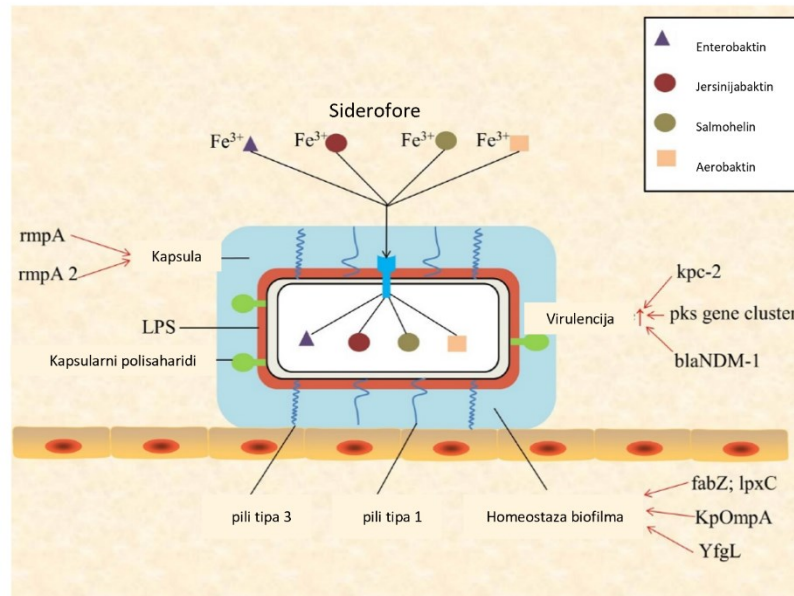
Slika 12. Porast *K. pneumoniae* na krvnom agaru. Izvor: autor.

Zaraza s *K. pneumoniae* nije moguća zrakom, pa se nije moguće zaraziti udisanjem istog zraka kao zaražena osoba. Infekcije nastaju kada se medicinska oprema kontaminira *K. pneumoniae* i bakterija nađe put do tijela. Na primjer, ljudi na respiratorima mogu dobiti *K. pneumoniae* ako su cijevi za disanje kontaminirane bakterijom. Analogno tome, uporaba kontaminiranih intravenskih katetera može dovesti do infekcija krvotoka. *K. pneumoniae* također se širi izravnim kontaktom s osobe na osobu, primjerice kada netko s kontaminiranim rukama dodirne ranu. (23,40)

1.4.1.1. Čimbenici virulencije

Virulencija je sposobnost patogena da uzrokuje štetu domaćinu, odnosno to je mjera patogenosti. Patogenost određuje niz čimbenika virulencije kao što su kapsula, adhezini, egzotoksini i endotoksini (23). Trenutno su identificirana četiri virulentna čimbenika *K. pneumoniae*: pili, kapsula, lipopolisaharid (LPS) i nosači željeza (41). *K. pneumoniae* sadrži adhezine, pile tipa 1 i tipa 3 te potiče bakterijsku adheziju na epitelne, imunološke stanice i abiotičke površine. *RmpA* je faktor virulencije bakterije *K. pneumoniae* smješten u plazmidu koji regulira sintezu kapsularnih polisaharida. Iako kapsula igra ključnu ulogu u zaštiti *K. pneumoniae* od imunoloških odgovora domaćina, njezina virulentnost može biti uzrokovana drugim čimbenicima. Zapravo, LPS u glavnim sojevima *K. pneumoniae* može biti djelomično

modificiran, a to dovodi do toga da stanica domaćina ne prepoznaje *K. pneumoniae*, dok drugi sojevi mogu koristiti kapsulu za kamuflažu LPS-a (42).



Slika 13. Shematski prikaz čimbenika virulencije *K. pneumoniae*. Izvor: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/17/6278>, prevedeno.

Sposobnost dobivanja željeza ključna je za rast i razmnožavanje bakterija. U *K. pneumoniae* postoje četiri molekule koje apsorbiraju željezo, a nazivaju se nosačima željeza odnosno sideroforima. To su:

- a) enterobaktin,
- b) jersinijabaktin,
- c) salmohelin i
- d) aerobaktin.

Postojeći u tipičnim i visoko virulentnim sojevima, enterobaktin ima najveći afinitet za željezo i smatra se glavnim sustavom apsorpcije željeza. Salmohelin je povezan s invazivnim bolestima i čest je u visoko virulentnim sojevima *K. pneumoniae* koji uzrokuju ozbiljne infekcije povezane s populacijom, kao što su apsces jetre i upala pluća. (43)

1.4.2. Antibiotici i podjela antibiotika

Antibiotici se dijele u nekoliko kategorija, a problem današnjice je sve veća antimikrobna rezistencija na antibiotike. Primarno se koriste za sprječavanje bakterijskih infekcija, u obliku tableta ili kapsula. Glavno obilježje antibiotika je da su toksični za bakterije, a netoksični ili slabo toksični za čovjeka. Ovo obilježje naziva se selektivna toksičnost. (23)

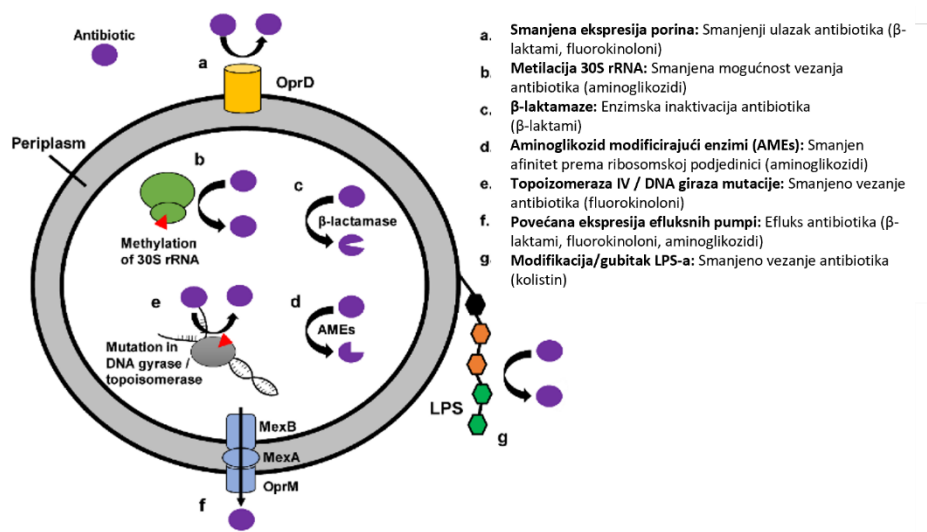
Antibiotici se dijele prema mehanizmu djelovanja na bakterijsku stanicu u četiri skupine, a unutar tih skupina dalje prema kemijskoj strukturi.

Antibakterijski lijekovi mogu djelovati na sintezu stanične stijenke, na citoplazmatsku opnu, na sintezu proteina na ribosomima te na sintezu nukleinskih kiselina. Najznačajniji predstavnici svakog od mehanizama prikazani su u Tablici 2.

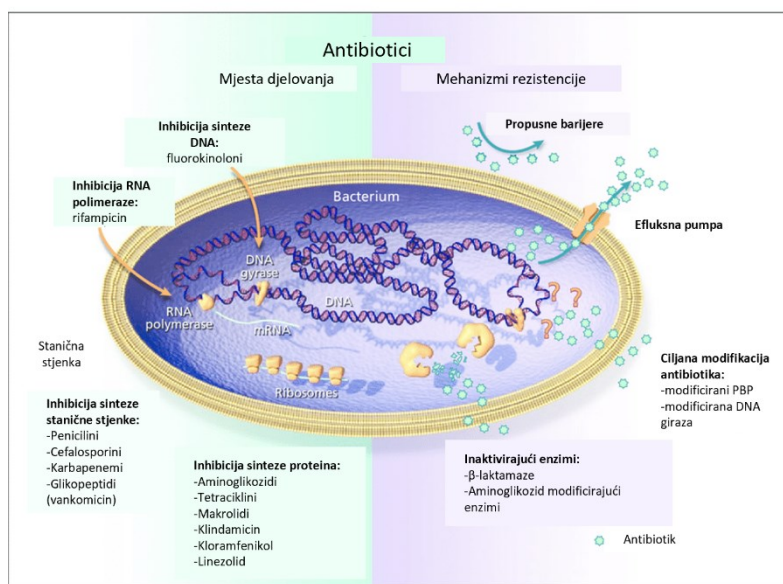
Tablica 2. Najznačajniji antibiotici prema mehanizmu djelovanja prema (23).

Antibiotik prema mehanizmu djelovanja				
Blokiranje sinteze stanične stijenke		Djelovanje na citoplazmatsku membranu	Sprječavanje sinteze proteina na ribosomima	Sprječavanje sinteze nukleinskih kiselina
β-laktamski antibiotici	penicilini	polimiksini	aminoglikozidi	kinoloni
	cefalosporini		tetraciklini	rifampicini
	monobaktami		makrolidi	metronidazol
	karbapenemi		kloramfenikol	sulfonamidi
bacitracin			linkozamidi	trimetoprim
glikopeptidni antibiotici			streptogramini	nitrofurantoin

Ono na što treba obratiti pažnju prilikom uzimanja antibiotika je njihov međusobni utjecaj jer se nerijetko prepisuju dva ili više antibiotika. Oni jedan na drugog mogu djelovati indiferentno, sinergistički ili antagonistički. Sinergističko djelovanje znači da jedan drugom pojačavaju djelovanje, odnosno da su u zajedničkoj primjeni djelotvorniji nego pojedinačno. Antagonističko djelovanje je suprotno sinergističkom. (23)



Slika 14. Mehanizmi rezistencije na antibiotike. Izvor: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/2/37>, prevedeno.



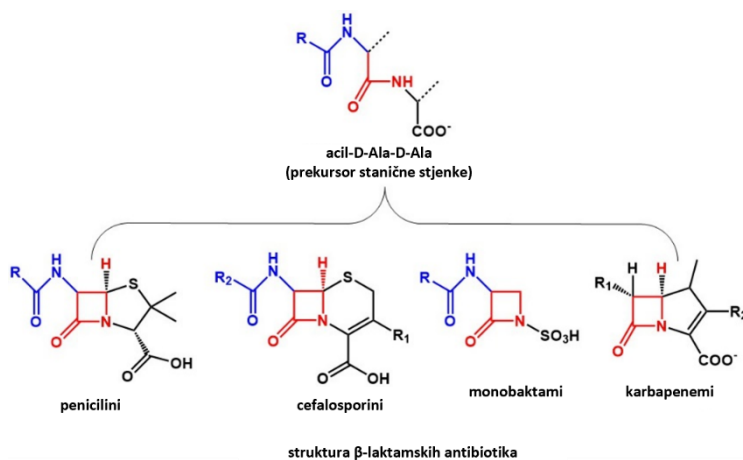
Slika 15. Mjesta djelovanja i mehanizmi rezistencije na antibiotike. Izvor: 10.1503/cmaj.080239, prevedeno.

Na slikama 14. i 15. prikazana su mjesta djelovanja i mogući mehanizmi rezistencije na antibiotike. Osim efluksnih pumpi i PBP-a, β -laktamaze i aminoglikozid modificirajući enzimi ističu se kao jedan od mehanizama stvaranja rezistencije na antibiotike. Iduće poglavlje posvećeno je β -laktamazama i β -laktamskim antibioticima.

1.4.2.1. β -laktamski antibiotici

β -laktamski antibiotici su skupina antibiotika koji sprječavaju sintezu bakterijske stanične stjenke. U ovu skupinu spadaju penicilini, karbapenemi, monobaktami i cefalosporini. Oni u svojoj strukturi posjeduju β -laktamski prsten. (23)

β -laktamski prsten je ciklični amid kojemu je dušikov atom vezan za ugljik na β -položaju u odnosu na karbonilnu skupinu (23). β -laktamski prsten u β -laktamskim antibioticima na donjoj slici prikazan je crvenom bojom.



Slika 16. Struktura β -laktamskih antibiotika s prikazanim β -laktamskim prstenom. Izvor: https://ringbio.com/sites/default/files/styles/img_responsive/public/2018-12/beta_lactam_2.jpg?itok=IQeGwCff, prevedeno.

Budući da β -laktamski antibiotici djeluju na sintezu stanične stjenke, oni zapravo interferiraju s njenom glavnom komponentom, peptidoglikanom. Peptidoglikan stjenki daje čvrstoću i otpornost. Poprečno umrežavanje i ispreplitanje struktura peptidoglikana katalizirano je specifičnim regulatornim enzimima koji se nazivaju penicilin-vezujući proteini (eng. *penicillin-binding protein*, PBP), a djeluju kao ciljna mjesta za β -laktamske antibiotike. Prilikom vezanja PBP-a i nekog od β -laktamskih antibiotika dolazi do inhibicije sinteze peptidoglikana što dovodi do smrti bakterije. (23)

1.4.2.2. Klasifikacija karbapenemaza

Karbapenemi su dio skupine β -laktamskih antibiotika kojima β -laktamski prsten u strukturi pruža zaštitu od većine enzima β -laktamaza. Sve značajniji problem postaje otpornost na karbapeneme te se pojavljuje se uglavnom među gram negativnim bakterijama kao što je to *K. pneumoniae* koje proizvode različite klase enzima karbapenemaza. Karbapenemaze su skupina enzima koje hidroliziraju veze u karbapenemima te tako blokiraju njihovo djelovanje. Karbapenemaze se dijele u nekoliko razreda koji su prikazani u Tablici 3. (23,44)

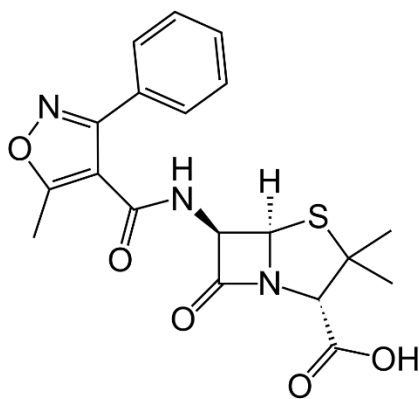
Tablica 3. Podjela karbapenemaza u razrede s primjerima prema (45).

Razred klasifikacije	Primjer karbapenemaze
klasa A	KPC, IMI
klasa B (metalo- β -laktamaze)	NDM, IMP, VIM
klasa D (oksacilinaze)	OXA-48

Karbapenemaze klase A inhibirane su klavulanskom kiselinom, a mogu biti kodirane kromosomski ili plazmidno kao što je to slučaj s KPC u *K. pneumoniae*. Najveće kliničko značenje imaju KPC β -laktamaze koje se pojavljuju u *Klebsiella* spp. Enzimi ove grupe hidroliziraju peniciline, prvu i drugu generaciju cefalosporina, aztreonam i karbapeneme. (46)

Klasi B karbapenemaza potreban je metal cink kao kofaktor da bi uspješno razorili veze u β -laktamskom prstenu. Što se epidemiologije tiče, VIM metalo- β -laktamaze rasprostranjene su na području mediteranskih zemalja europskog kontinenta. Generalno se metalo- β -laktamaze pojavljuju u nefermentativnih bakterija kao što je to *Acinetobacter baumannii*, ali je njihova pojavnost opisana i u enterobakterija kao što je to *K. pneumoniae*. (46)

U treći kategoriju, klasu D, spadaju takozvane oksacilinaze, enzimi koji djeluju na oksacilin. Oksacilin je β -laktamski antibiotik uskog spektra koji se kovalentno veže na PBP čime inhibira sintezu peptidoglikana. Rezistencija na ovaj antibiotik je vrlo česta, posebno među gram negativnim bacilima (46). Na Slici 17. shematski je prikazana struktura oksacilina.



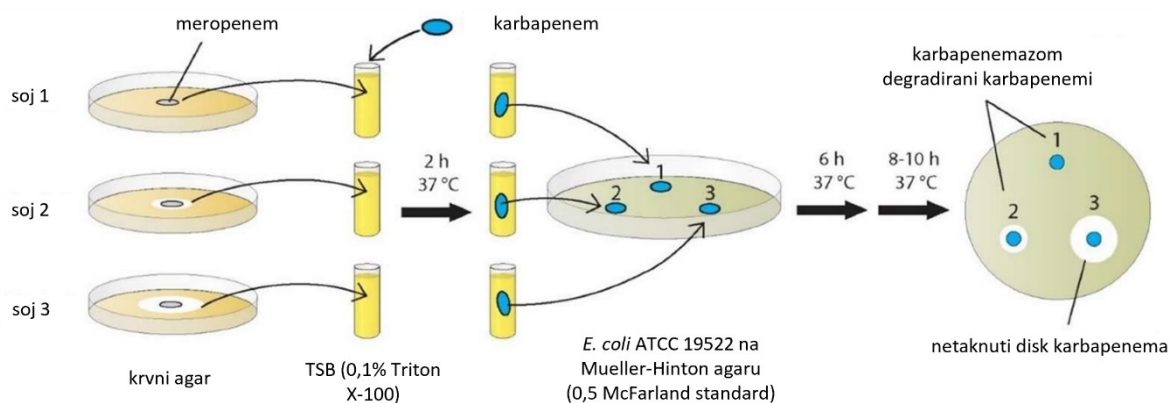
Slika 17. Kemijska struktura oksacilina. Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Oxacillin_skeletal.svg.

Karbapenemaze ove grupe karakteristične su za *A. baumannii*. Navodno, naziv *OXA* dobiven je jer hidroliziraju izoksazolilpeniciline puno brže od penicilina. *OXA* enzimi podijeljeni su u 12 podgrupa: *OXA*-23, *OXA*-24/40, *OXA*-48, *OXA*-51, *OXA*-58, *OXA*-143, *OXA*-253, *OXA*-211, *OXA*-213, *OXA*-214, *OXA*-229 i *OXA*-235. Najzanimljivija od navedenih podgrupa su *OXA*-48 enzimi koji su originalno opisani na primjeru izolata *K. pneumoniae* 2001. godine u Istanbulu. Turska, Indija, Bliski Istok i države Sjeverne Afrike najvažniji su rezervoari *OXA*-48 producirajućih karbapenemaza. Za globalno širenje *OXA*-48 producirajućih karbapenemaza zaslužan je samokonjugirajući *bla_{OXA-48}* gen smješten na *pOXA-48a* plazmidu. *OXA*-48 hidroliziraju karbapeneme s niskom razinom efikasnosti, pokazuju vrlo slabu aktivnost protiv cefalosporina proširenog spektra djelovanja i ne hidroliziraju značajno ceftazidim i cefepim, ali u kombinaciji s nepropusnošću mogu dovesti do visoke razine otpornosti na karbapeneme. *OXA*-48 značajno hidroliziraju samo peniciline i cefalosporine uskog spektra i poput drugih enzima klase D nije inhibiran klavulanskom kiselinom, sulbaktamom ili tazobaktamom. (46)

Kako detektirati o kojem je karbapenemu riječ, postavlja se kao ozbiljnije pitanje. Primjerice, kod mikroorganizama koji proizvode *OXA*-48, minimalne inhibitorne koncentracije karbapenema (eng. *minimal inhibitory concentration*, MIC) mogu biti vrlo niske. Uobičajeno je da se određivanje temelji na smanjenju zone inhibicije oko ertapenemskog diska. Institut za kliničke i laboratorijske standarde (eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) preporučuje modificirani Hodgeov test za fenotipsku detekciju, no test nije dovoljno osjetljiv niti specifičan. Također postoji nekoliko testova koji koriste različite inhibitore u kombinaciji s karbapenemom ili cefalosporinom u različitim formatima kao što su disk-difuzija, razrjeđivanje bujona ili E-test. Ono što predstavlja problem je činjenica da ne postoji specifičan

inhibitor koji bi se mogao koristiti u detekciji karbapenemaza klase D. Nadalje, postoji jednostavan biokemijski Carba NP test koji se temelji na hidrolizi imipenema koji se može detektirati promjenom boje indikatora zbog pada pH. (46)

Karbapenem inaktivirajuća metoda (eng. *carbapenem inactivation method*, CIM) relativno je nova metoda za detekciju karbapenemaza koja se temelji na razgradnji meropenema pomoću karbapenemaze. Vodena suspenzija mikroorganizama otpornih na karbapenem inkubira se 2 h s diskom od 10 µg meropenema. Nakon inkubacije, disk se izvadi iz suspenzije i stavi na Mueller-Hinton agar prethodno inokuliran mikroorganizmom osjetljivim na karbapenem (obično je to *Escherichia coli*). Ako mikroorganizam otporan na karbapenem proizvodi karbapenemazu, meropenem će se hidrolizirati i mikroorganizam indikator (osjetljiv na karbapenem) rast će blizu diska. (46)



Slika 18. Shematski prikaz CIM metode. Izvor: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/4/482>, prevedeno.

Instrumentalna metoda kvantifikacije MALDI-TOF masena spektrofotometrija omogućuje brzo otkrivanje KPC karbapenemaze za 45 minuta na temelju analize razgradnje molekule karbapenema. Naravno, prisutna je i PCR metoda kojom bi mogli značajno poboljšati detekciju gena karbapenemaze u kliničkim laboratorijima zaobilazeći probleme osjetljivosti i specifičnosti s fenotipskim testovima. (46)

2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je uspostaviti biofilm bakterije *Klebsiella pneumoniae* na jednom standardnom soju i pet kliničkih sojeva na keramičkim pločicama dimenzija 2,5 cm x 2,5 cm *in vitro* te kvantificirati količinu stvorenog biofilma pomoću tri metode detekcije: brojanjem poraslih kolonija (CFU/cm²), mjerenjem ATP bioluminiscencije te mjerenjem apsorbancije nakon bojenja kristal violetom. Cilj je bio i utvrditi učinkovitost plinovitog ozona na redukciju broja bakterija u biofilmu *Klebsiella pneumoniae* tijekom 60-minutne izloženosti ozonu koristeći sve tri metode detekcije.

Hipoteze ovog istraživanja bile su:

- a. svi sojevi *K. pneumoniae* će na keramičkim pločicama stvarati biofilm, što se vidi u broju bakterija, biološkoj aktivnosti i ukupnoj biomasi;
- b. tretman plinovitim ozonom djelovati će dezinfekcijski te će uzrokovati smanjenje broja bakterija, biološke aktivnosti i ukupne biomase.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Laboratorijski pribor, kemikalije i uređaji

- 3M Clean-Trace™ uređaj za očitavanje brzog ATP Surface testa – luminometar
- Analitička vaga (Nimbus, Adam, Kingston, UK)
- Brisni štapići 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100
- Fiziološka otopina
- Gram Kristal violet 1% otopina (BioGnost, Zagreb, Hrvatska)
- Inkubator (BD-S Binder, Binder GmbH, Tuttlingen, Njemačka)
- Keramičke pločice dimenzija 2,5 cm x 2,5 cm
- Krvni agar
- Mikrotitarske pločice s okruglim dnom (96 well, ROLL Piove di Sacco, Italija)
- Müller – Hinton agar (Biolife, Italija)
- Müller – Hinton bujon (Biolife, Italija)
- Multikanalna pipeta 0,5 – 200 µL (Transferpette S-8, Njemačka)
- Nastavci za pipete (Gilson, SAD)
- Pinceta
- Pipeta
- Plastična sterilna epruveta s čepom na navoj volumena 50 mL (Falcon)
- Plastična šprica volumena 10 mL
- Plastične i staklene Petrijeve zdjelice
- Plastične kivete za spektrofotometriju
- Plastične mikrobiološke ušice („eze“)
- Spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- Staklene epruvete volumena 15 mL s čepom
- Štoperica
- Tresilica (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (BactoSonic, Bandelin, Berlin, Njemačka)
- Vortex (TK3S, TechnoKartell, Noviglio, Italija)

3.2. Korišteni mikroorganizmi

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su idući sojevi bakterija: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 kao standardni soj iz kulture stanica s Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te pet kliničkih sojeva *Klebsiella pneumoniae* nabavljenih iz Opće bolnice „Dr. Ivo Pedišić“ iz Siska, Hrvatska. Sojevi bakterija su skladišteni na -80 °C u glicerol bujonu. Netom prije korištenja u eksperimentima, bakterije su nasađene na Müller – Hinton agar i kultivirane na 37 °C tijekom 24 sata. Sojevi produciraju OXA-48 što je određeno brzim *in vitro* dijagnostičkim testovima Coris BioConcept RESIST-5 O.O.K.N.V., model K-15R9. U Tablici 4. prikazani su za svaki soj godina uzorkovanja, uvjeti uzorkovanja te mjesta odakle je uzorak izoliran.

Tablica 4. Osnovni podaci o korištenim sojevima *K. pneumoniae*.

soj	godina uzorkovanja	uvjet	uzorak
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-		
<i>Kp 14</i>		bakteriološki	urin
<i>Kp 15</i>		aerobno	(srednji mlaz)
<i>Kp 16</i>	2021.		
<i>Kp 17</i>			
<i>Kp 18</i>			

3.2.1. Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike korištenih *K. pneumoniae* sojeva

Ispitivanje korištenih sojeva *K. pneumoniae* na osjetljivost prema antibioticima odrađeno je standardnom metodom disk difuzije. Rezultati su interpretirani prema EUCAST Breakpoint Tables verziji 12.0 T. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za kolistin određena je pomoću karakterizacije prema uputama proizvođača (AB Biodisk, Solna, Švedska). Ispitivanje je provedeno za iduće antibiotike: amoksicilin, amoksicilin u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, amikacin, piperacilin u kombinaciji s tazobaktamom, cefuroksim, ceftriakson, ceftazidim, cefpodoxim, cefiksim, cefepim, imipenem, meropenem, ertapenem, gentamicin, norfloksacin, ciprofloksacin, sulfametoksazol u kombinaciji s trimetoprimom, kolistin i

cefaleksin. Korištene diskove za ispitivanje osjetljivosti proizveo je Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, Francuska).

3.2.2. Priprema keramičkih pločica

Za potrebe izvođenja eksperimenta, korištene su keramičke pločice dimenzija 2,5 cm x 2,5 cm. Pločice su prije korištenja u eksperimentima detaljno oprane i iščetkane kako bi se uklonile sve nečistoće. Potom su pločice autoklavirane na 160 °C kroz 1,5 h u suhom sterilizatoru. Sterilne pločice su zatim stavljene u staklenu Petrijevu zdjelicu i prelivene tekućih agarom (2%, v/v) na način da gornja strana pločice ostane izložena zraku. Tekući agar se stajanjem na sobnoj temperaturi skrutne te na taj način drži pločice fiksirane na istom mjestu u Petrijevoj zdjelici.

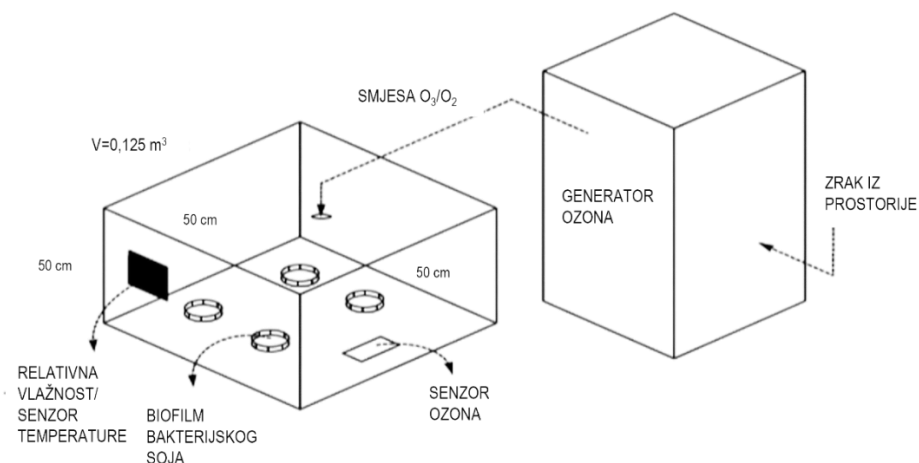
3.2.3. Priprema bakterijskih suspenzija

Za svaki od testiranih sojeva bakterije *K. pneumoniae* je pripremljena bakterijska suspenzija od 10^5 CFU/mL u Mueller-Hinton bujonu. Gornje strane pločica koje su ostale izložene zraku su zatim prelivene pripremljenim bakterijskim suspenzijama ($V = 10$ mL) te inkubirane uz miješanje u vremenu od 24 sata. Po završetku inkubacije i miješanja, pločice su pomoću sterilne pincete izvađene iz staklenih Petrijevih zdjelica, isprane s 10 mL sterilne fiziološke otopine te su se koristile različite metode detekcije biofilma.

3.2.4. Tretman plinovitim ozonom

Nakon pripreme biofilma na keramičkim pločicama, uslijedio je tretman plinovitim ozonom. Pločice predviđene za tretman plinovitim ozonom prenijete se u plastičnim Petrijevim zdjelicama u kutiju ozonatora. Za vrijeme trajanja tretmana, Petrijeve zdjelice bile su otvorene, odnosno keramičke pločice su direktno bile izložene plinovitom ozonu.

Izlaganje keramičkih pločica tretmanu plinovitim ozonom vršeno je prema „modelu zatvorene kutije“. Na Slici 19. prikazan je korišteni model. Model zatvorene kutije sastoji se od dva dijela, samog generatora ozona te zatvorene kutije.



Slika 19. Shema "modela zatvorene kutije". Izvor: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/10/6177>, prevedeno.

Generator ozona radi na način da s jedne strane uzima zrak iz prostorije te stvara smjesu ozona i kisika (O_3/O_2) koju ispušta kroz gumenu cijev. Gumena cijev promjera 6 mm stavi se u kutiju kroz mali otvor na poklopcu. Na taj način smjesa O_3/O_2 biva upuhana u zatvorenu kutiju. Poklopac i dno kutije izrađeni su od iverice, dok su bočne stranice od prozirnog polistirena. Kutija je ukupnog volumena 125 L, odnosno $0,125 \text{ m}^3$. Poklopac kutije nije fiksiran nego se može stavljati i skidati radi lakšeg pristupa pločicama.



Slika 20. Kutija za ozonizaciju izbliza. Izvor: autor.



Slika 21. Generator ozona i kutija za ozonizaciju. Izvor: autor.

3.2.5. Metode detekcije i kvantifikacije biofilma

Kako bi se odredio ukupan broj kultivabilnih bakterija, biološka aktivnost i ukupna biomasa prije i nakon tretmana plinovitim ozonom, korištene su različite metode detekcije, odnosno kvantifikacije. Svaka od korištenih metoda, zasebno je opisana u nastavku.

3.2.5.1. Određivanje ukupnog broja kultivabilnih bakterija

Neovisno o tome jesu li keramičke pločice sa stvorenim biofilmom bile na tretmanu ili ne, postupak određivanja ukupnog broja kultivabilnih bakterija je jednak. Pločice su sterilnom pincetom prebačene iz plastičnih Petrijevih zdjelica u sterilne epruvete u koje je prethodno stavljeno 10 mL sterilne fiziološke otopine. Epruvete su zatim stavljene u ultrazvučnu kupelj na 1 minutu na frekvenciju od 40 kHz kako bi se bakterije odvojile od površine.



Slika 22. Ultrazvučna kupelj (BactoSonic, Bandelin, Berlin, Njemačka). Izvor: autor.

Nakon toga, epruvete su još vorteksirane kako bi se dodatno pospješilo odvajanje bakterija s površine. Iz tako pripremljenih uzoraka pipetom je uzeto 200 μL i prebačeno u mikrotitarsku pločicu s jažicama s okruglim dnom. Napravljena je serija deseterostrukih razrjeđenja na način da su pomoću multikanalne pipete ostale jažice napunjene sa 180 μL sterilne fiziološke otopine. Nakon toga je iz prve jažice, gdje je bio izvorni uzorak, uzeto 20 μL te prebačeno u 180 μL sterilne fiziološke otopine stupac do i tako je napravljeno šest razrjeđenja za netretirane pločice, te četiri razrjeđenja za tretirane pločice. Zatim je iz svake od jažica u kojima su napravljena razrjeđenja pipetom uzimano po 10 μL uzorka te prebačeno na Mueller-Hinton agar u obliku kapi (po 6 kapi) te ostavljeno 24 h u inkubatoru na 35 ± 2 °C kako bi kolonije porasle. Drugi dan očitani su porast kolonija te izražen kao CFU/cm². Postotci inhibicije izračunani su pomoću formule:

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

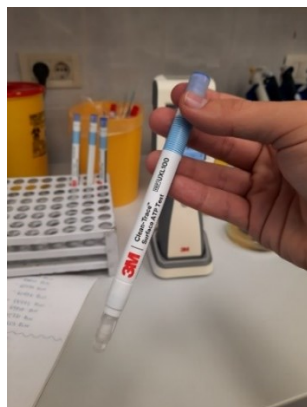
gdje je N_{tretman} predstavljao srednju vrijednost svih vrijednosti nakon tretmana, a N_{kontrola} predstavljala je srednju vrijednost svih vrijednosti bez tretmana plinovitim ozonom. Pokus je ponovljen tri puta u triplikatu.

3.2.5.2. Mjerenje biološke aktivnosti prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

Biološka aktivnost izmjerena je metodom ATP bioluminiscencije koja se temelji na reakciji ATP-a iz mikroorganizama na površini s luciferinom i luciferazom kao reagensima u reagens otopini brisnog štapića. Uz pomoć brisnog štapića 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100 površina keramičke pločice (6,25 cm²) je dobro prebrisana te je brisni štapić miješan lijevo-desno jednu minutu. Po isteku jedne minute, brisni štapić stavljen je u komoru 3M Clean-Trace™ luminometra. Softverskim programom luminometra ATP Surface Test u roku od nekoliko sekundi uređaj je pokazao RLU vrijednost. Mjerenje je za svaku pločicu vršeno deset puta, nakon svake minute jedno. Postotci inhibicije izračunani su pomoću prethodno navedene formule. Pokus je ponovljen tri puta u triplicatu.



Slika 23. 3M Clean-Trace™ luminometar. Izvor: autor.



Slika 24. Brisni štapić 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100. Izvor: autor.

3.2.5.3. Ukupna biomasa prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

Bojanjem keramičkih pločica 0,1% kristal violetom određena je ukupna biomasa prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Postupak je slijedeći. Keramičke pločice izvučene su iz agara sterilnom pincetom, isprane s 10 mL sterilne fiziološke otopine, prebačene u staklene Petrijeve zdjelice te fiksirane 30 minuta na 80 °C. Nakon fiksacije, keramičke pločice prebačene su u nove Petrijeve zdjelice s gornjom stranom okrenutom prema dolje kako bi ta strana bila uronjena u 300 – 500 µL 0,1%-tnog kristal violeta u periodu od 30 minuta. Nakon toga, keramičke pločice su isprane s 20 mL fiziološke otopine te odbojavane s 3 mL 95%-tnog etilnog alkohola u vremenu od 15 minuta. Konačno, mjerena je apsorbancija na valnoj duljini 600 nm za svaku pločicu u odnosu na slijepu probu. Postotci inhibicije izračunani su pomoću prethodno navedene formule. Pokus je ponovljen tri puta u triplicatu. Dodatno, nakon mjerenja apsorbancija, kako bi se utvrdile promjene u morfologiji biofilma nakon tretmana plinovitim ozonom, učinjena je svjetlosna mikroskopija.

3.2.5.4. Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM)

Analiza bakterijskih biofilma na keramičkim pločicama provedena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa s emisijom polja - SEM (Jeol JSM-7800F) s naponom ubrzanja snopa od 7 kV i radnom udaljenosti od 10 mm. Prije SEM analize, biofilmovi su isprani u sterilnom PBS-u i osušeni na zraku u sterilnoj komori. Zatim su fiksirani s 4% glutaraldehydom i 0,5% paraformaldehidom (Sigma-Aldrich) pripremljenim na 4 °C u 0,1 M fosfatnom puferu (Sigma-Aldrich) pri pH 7,2 i zatim dehidrirani uranjanjem u niz rastućih koncentracija etanola (50%, 70%, 80%, 90% i 100%, Sigma-Aldrich). Uzorci koji su ispitivani bili su pričvršćeni na držač uzorka vodljivom karbonskom trakom. Kako bi se spriječilo površinsko elektriziranje tijekom ozračivanja elektronskim snopom, uzorci su obloženi s 5 nm tankim slojem Au-Pt korištenjem sustava za precizno premazivanje PECS II (Gatan Inc., Pleasanton, CA, SAD).

3.2.6. Statistička obrada podataka

Na temelju izvršenog eksperimenta, dobiveni rezultati analizirani su u MS Excel programu Microsoft Office paketa i u programskoj podršci TIBCO Statistica 14.0.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Program Statistica korišten je za provođenje statističkih testova (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis H test, Wilcoxon matched pair test), odnosno za dobivanje statističke značajnosti ili neznačajnosti tretmana stvorenih biofilmova plinovitim ozonom. Dobiveni rezultati prikazani su grafički za svaku pojedinu metodu zajedno sa statističkom značajnošću. Grafički prikaz podataka napravljen je u Microsoft Excel 11.00 (Microsoft Home Office, 2021). Konačno, tablično su prikazani postotci inhibicije nakon tretmana.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike

Svih pet kliničkih sojeva *K. pneumoniae* su sojevi koji produciraju OXA-48. Rezultate ispitivanja osjetljivosti na antibiotike proveo je Zavod za mikrobiologiju Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak, Hrvatska, a prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike korištenih *K. pneumoniae* sojeva.

Antibiotik	OXA-48-producirajuće karbapenemaze <i>K. pneumoniae</i>					
	<i>Kp</i> ATCC 700603	<i>Kp</i> 14	<i>Kp</i> 15	<i>Kp</i> 16	<i>Kp</i> 17	<i>Kp</i> 18
AMX	R	R	R	R	R	R
AMC	R	R	R	R	R	R
TZP	S	R	R	R	R	R
CPN	R	R	R	R	R	R
CXM	R	R	R	R	R	R
CRO	R	*ND	*ND	*ND	R	*ND
CAZ	R	*ND	R	R	R	*ND
CPD	R	R	R	R	R	R
CFM*	R	R	R	R	R	R
CEF	R	R	R	R	R	R
IPM	S	R	S	I	S	S
MEM	I	R	I	R	S	S
ETP	S	R	R	R	R	S
GM	R	R	S	R	S	S
AMK	S	R	S	S	S	S
NOR	S	R	R	R	R	S
CIP	I	R	R	R	R	S
SXT	R	R	R	R	R	R
CST	S	S	S	R	R	*ND

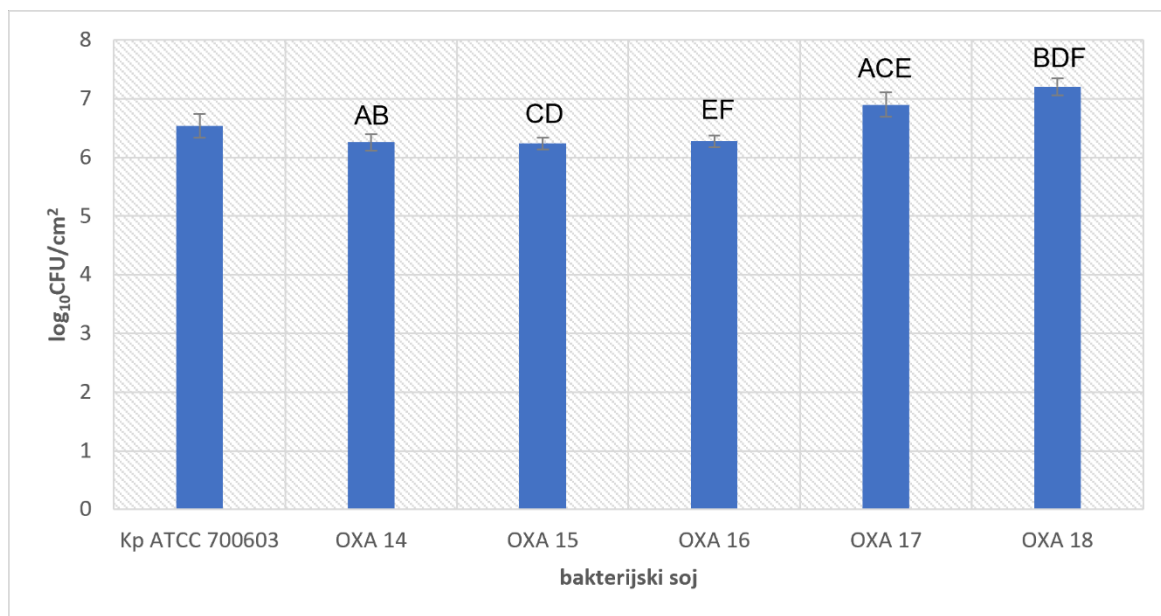
Kratice navedenih antibiotika: AMX—amoksicilin, AMC—amoksicilin u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, AMK—amikacin, TZP—piperacilin u kombinaciji s tazobaktamom, CXM—cefuroksim, CRO—ceftriakson, CAZ—ceftazidim, CPD—cefpodoksim, CFM*—

cefiksim, CEF —cefepim, IPM—imipenem, MEM—meropenem, ETP—ertapenem, GM—gentamicin, NOR—norfloksacin, CIP—ciprofloksacin, SXT—sulfametoksazol u kombinaciji s trimetoprimom, CST—kolistin, CPN—cefaleksin. Slova R, S i *ND označavaju sljedeće: R—otporan, S—osjetljiv, I—osjetljiv uz povećanu izloženost, *ND—bez podataka.

Među ispitivanim sojevima, njih 6 (100%) otporno je na djelovanje amoksicilina, amoksicilina u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, piperacilina s tazobaktamom, cefaleksina, cefuroksima, cefpodoksima, cefiksima, cefepima i sulfametoksazola u kombinaciji s trimetoprimom. Ukoliko se izuzmu sojevi za koje nisu dostupni podaci o osjetljivosti na antibiotike, njih 2 (100%) prikazuje otpornost na ceftriakson te njih 4 (100%) na ceftazidim. Otpornost prema iripenemu i amikacinu pokazuje po jedan soj (16,67%), a prema ertapenemu, norfloksacinu i ciprofloksacinu po četiri soja (66,67%). Otpornost prema gentamicinu pokazuje tri soja (50%), a prema meropenemu dva soja (33,33%). Na kolistin su otporna dva soja (40%). Ukoliko se gleda svaki soj zasebno, *K. pneumoniae* 14 pokazuje najveću rezistenciju i to na 16 od 17 ispitanih antibiotika (94.11%) što ju čini najrezistentnijim sojem.

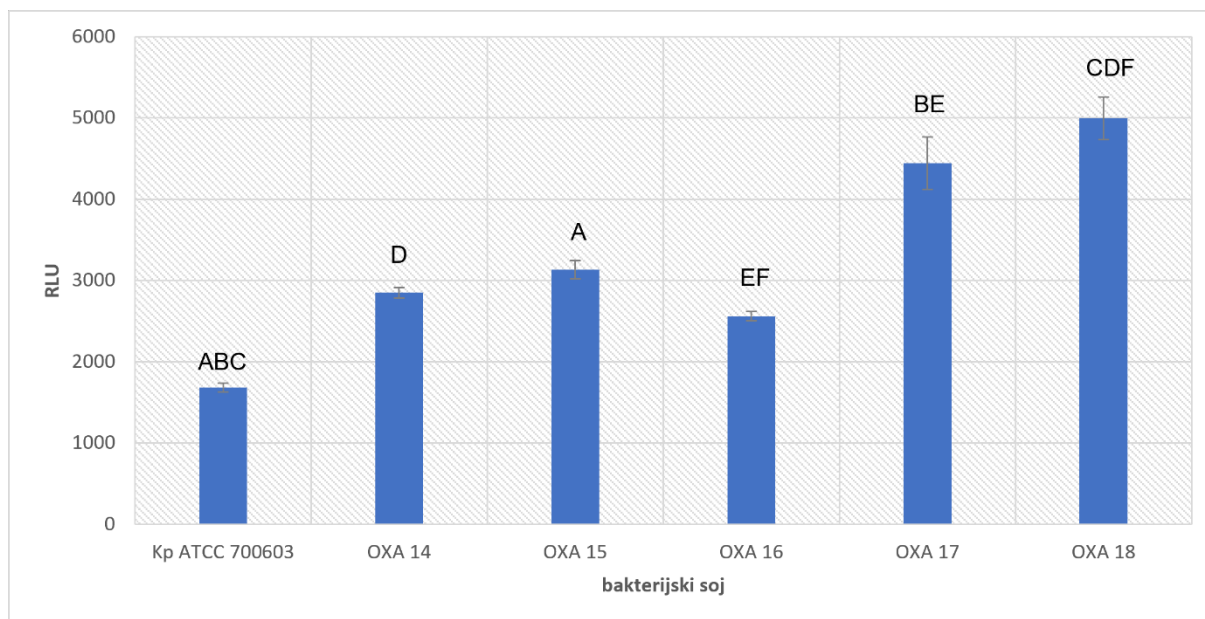
4.2. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma

Nakon završene inkubacije od 24 sata, primijećeno je da je svaki ispitivani soj na gornjim stranama keramičkih pločica počeo stvarati biofilm. Količina stvorenog biofilma ispitana je i brojčano određena trima metodama: brojanjem poraslih kultivabilnih bakterija na Mueller-Hinton agaru, mjerenjem biološke aktivnosti metodom ATP bioluminiscencije te mjerenjem apsorbancija nakon bojenja kristal-violetom za određivanje količine stvorene biomase.



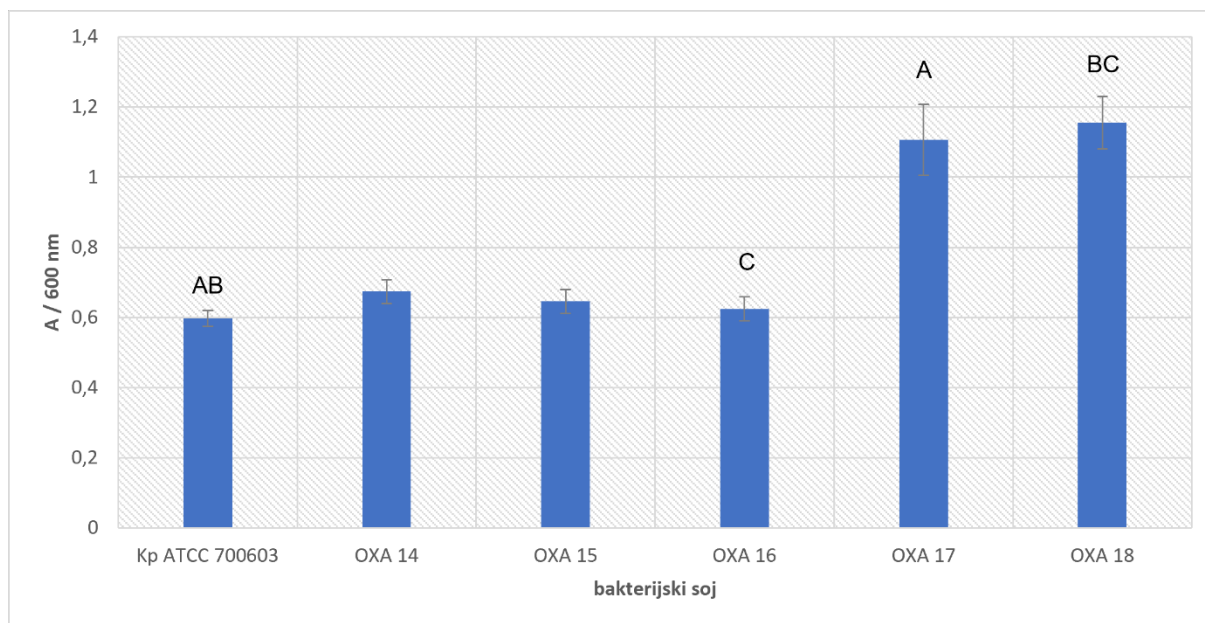
Grafikon 1. Porast broja kultivabilnih bakterija prije tretmana plinovitim ozonom za sve tretirane sojeve. Rezultati su prikazani kao logaritamske vrijednosti aritmetičkih sredina s pripadajućim standardnim devijacijama. Velika slova (A-F) označuju statistički značajnu razliku između pojedinih sojeva za kontrolnu netretiranu skupinu (Kruskal-Wallis H test, $p < 0,05$).

Na Grafikonu 1. prikazan je broj kultivabilnih bakterija svakog ispitivanog soja *K. pneumoniae*. Uočava se da nema prevelikih razlika u broju bakterija između ispitivanih sojeva, no ta razlika je među pojedinim sojevima statistički značajna, što je označeno velikim tiskanim slovima. Najviše bakterija zabilježeno je na primjeru soja *K. pneumoniae* 18, dok podjednako velika odstupanja od srednje vrijednosti prikazuju standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603 i soj *K. pneumoniae* 17.



Grafikon 2. Rezultati ATP bioluminiscencije prije tretmana plinovitim ozonom za sve testirane sojeve. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine s pripadajućim standardnim devijacijama. Velika slova (A-F) označuju statistički značajnu razliku između pojedinih sojeva za kontrolnu netretiranu skupinu (Kruskal-Wallis H test, $p < 0,05$).

Na Grafikonu 2. prikazane su RLU vrijednosti dobivene metodom ATP bioluminiscencije. Najmanju biološku aktivnost pokazuje standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603, dok najveće vrijednosti biološke aktivnosti pokazuju klinički izolati *K. pneumoniae* 17 i *K. pneumoniae* 18. Najveće odstupanje od aritmetičke sredine metodom ATP bioluminiscencije pokazao je soj *K. pneumoniae* 17.

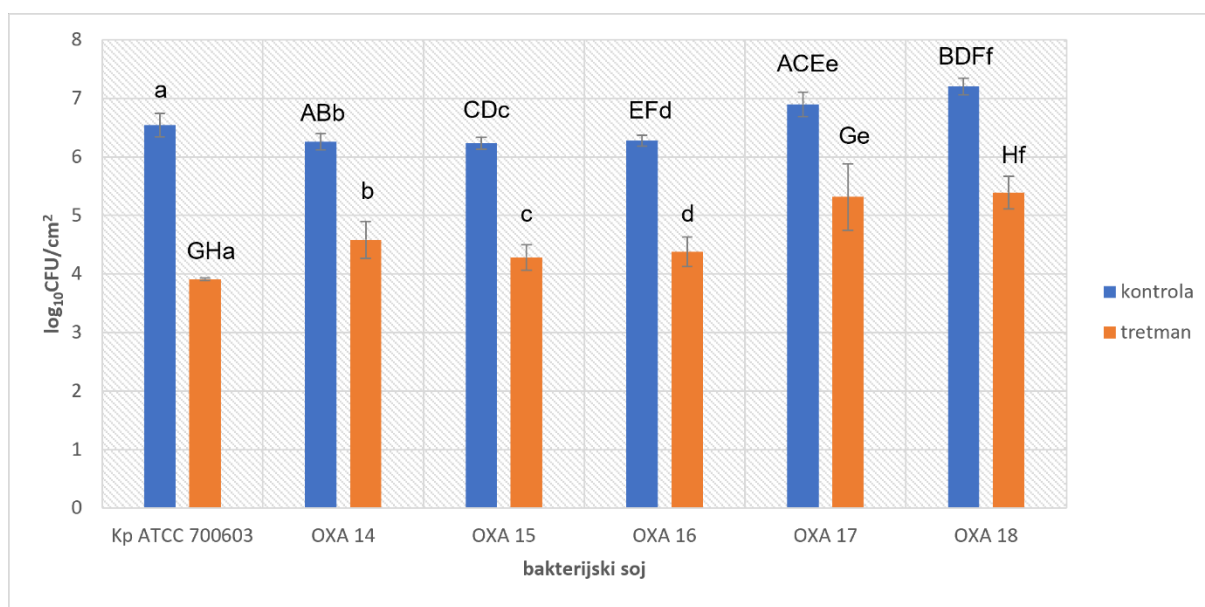


Grafikon 3. Prikaz vrijednosti apsorbancija prije tretmana plinovitim ozonom za sve tretirane sojeve. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine s pripadajućim standardnim devijacijama. Velika slova (A-C) označuju statistički značajnu razliku između pojedinih sojeva za kontrolu ili tretman (Kruskal-Wallis H test, $p < 0,05$).

Na Grafikonu 3. prikazane su vrijednosti apsorbancija na 600 nm nakon bojenja kristal-violetom. Vidljive su razlike u količini biomase na keramičkim pločicama između sojeva. Veća odstupanja i ovom metodom pokazala su dva klinička izolata, *K. pneumoniae* 17 i *K. pneumoniae* 18. Moguće objašnjenje većeg odstupanja ova dva klinička izolata je činjenica da su sojevi više sluzavi od ostalih ispitivanih, no svakako su potrebna daljnja istraživanja. Razlike u količinama biomase nisu toliko statistički značajno različite, kao što je to bilo slučaj u prethodne dvije metode.

4.3. Prikaz broja kultivabilnih bakterija prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

Nakon inkubacije od 24 sata, izbrojane su porasle kolonije na Mueller – Hinton agaru. Dobiveni rezultati prikazani su na Grafikonu 4.

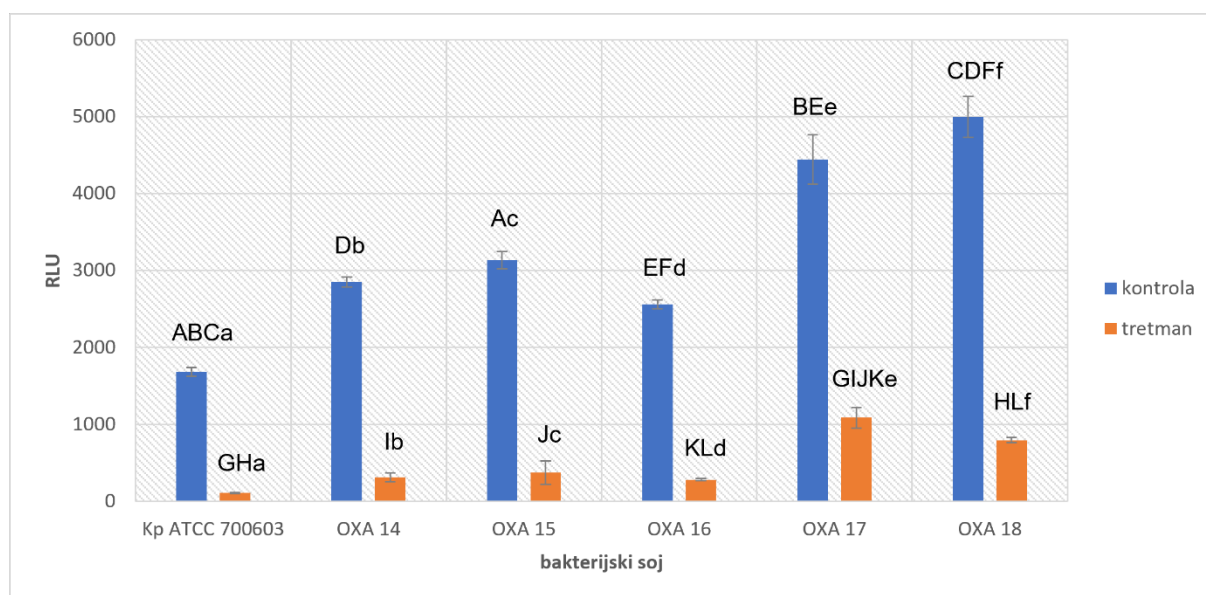


Grafikon 4. Prikaz broja kultivabilnih bakterija prije i nakon tretmana plinovitim ozonom za sve tretirane sojeve. Rezultati su prikazani kao logaritamske vrijednosti aritmetičkih sredina s pripadajućim standardnim devijacijama. Velika slova (A-H) označuju statistički značajnu razliku između pojedinih sojeva za kontrolu ili tretman (Kruskal-Wallis H test, $p < 0,05$). Mala slova (a-f) označuju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za isti soj (Wilcoxon signed rank test, $p < 0,05$).

Gornji grafikon prikazuje smanjivanje broja kultivabilnih bakterija nakon tretmana plinovitim ozonom za sve testirane sojeve *K. pneumoniae*. Iz grafikona je vidljivo da broj bakterija na netretiranim pločicama varira između 10^6 CFU/cm² i 10^7 CFU/cm². Primjenom ozona vidljivo je smanjenje u broju bakterija za, u prosjeku, do 2 log₁₀. Kao najosjetljiviji soj pokazao se standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603, a kao najrezistentniji *K. pneumoniae* soj 17.

4.4. Smanjenje biološke aktivnosti nakon tretmana plinovitim ozonom

Metodom ATP bioluminiscencije izmjerena je biološka aktivnost prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Dobiveni rezultati prikazani su na Grafikonu 5.

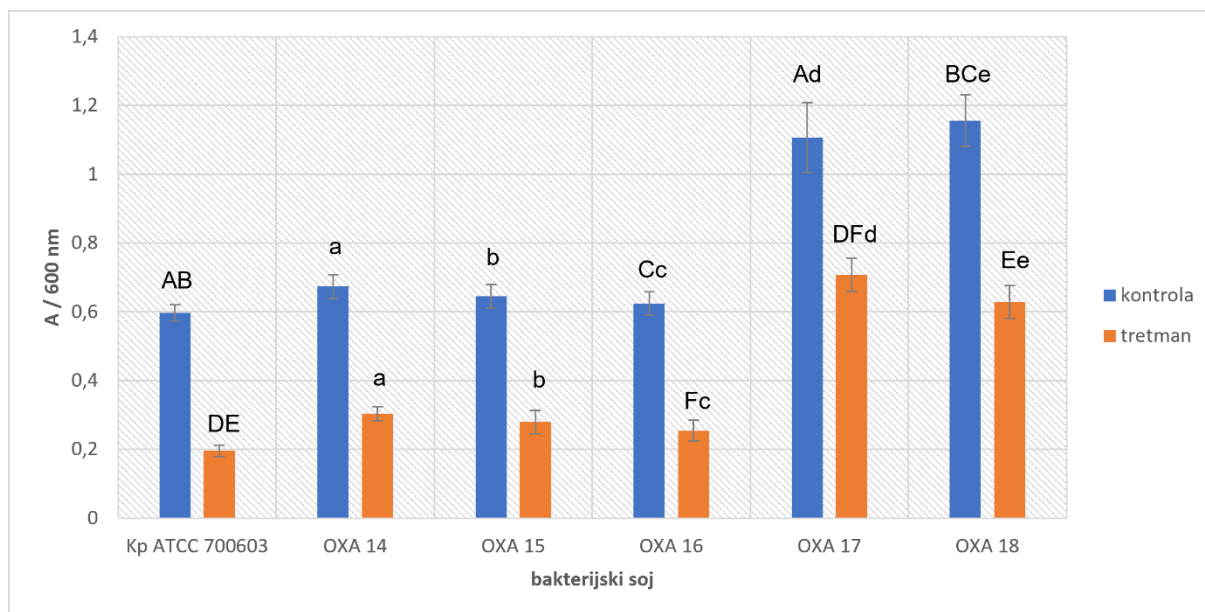


Grafikon 5. Rezultati ATP bioluminiscencije prije i nakon tretmana plinovitim ozonom za sve testirane sojeve. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine s pripadajućim standardnim devijacijama. Velika slova (A-L) označuju statistički značajnu razliku između pojedinih sojeva za kontrolu ili tretman (Kruskal-Wallis H test, $p < 0,05$). Mala slova (a-f) označuju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za isti soj (Wilcoxon signed rank test, $p < 0,05$).

Gornji grafikon prikazuje smanjenje biološke aktivnosti nakon jednosatne izloženosti plinovitom ozonu. Vrijednosti netretiranih pločica dosta variraju u ovisnosti od soja, od 1700 do 5000 RLU. Primjenom tretmana ozonom vrijednosti se smanjuju za svaki ispitivani soj. Vrijednosti tretiranih pločica kreću se u prosjeku do 500 RLU, dok u slučaju *K. pneumoniae* soj 17 postoji odstupanje do preko 1000 RLU. Kao najosjetljiviji soj pokazao se standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603, a kao najrezistentniji *K. pneumoniae* soj 17.

4.5. Redukcija biomase nakon tretmana plinovitim ozonom određena bojanjem kristal violetom

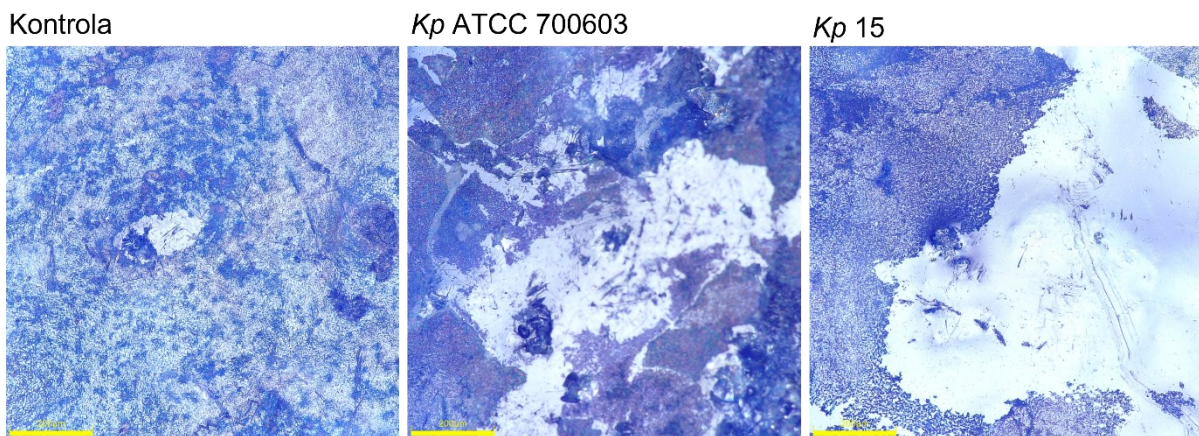
Promatrana je redukcija biomase na keramičkim pločicama nakon tretmana plinovitim ozonom za sve ispitivane sojeve. Dobiveni rezultati prikazani su na Grafikonu 6.



Grafikon 6. Prikaz vrijednosti apsorbancija prije i nakon tretmana plinovitim ozonom za sve tretirane sojeve. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine s pripadajućim standardnim devijacijama. Velika slova (A-F) označuju statistički značajnu razliku između pojedinih sojeva za kontrolu ili tretman (Kruskal-Wallis H test, $p < 0,05$). Mala slova (a-e) označuju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za isti soj (Wilcoxon signed rank test, $p < 0,05$).

Gornji grafikon prikazuje smanjenje biomase nakon jednosatne izloženosti plinovitom ozonu. Vrijednosti netretiranih pločica variraju između 0,6 i 1,2. Primjenom tretmana ozonom vrijednosti se smanjuju za svaki od ispitivanih sojeva. Vrijednosti tretiranih pločica kreću se od 0,2 do 0,7. Promatrajući grafikon, vidljivo je da malo veće odstupanje od preostalih sojeva pokazuju *K. pneumoniae* soj 17 i 18. Kao najosjetljiviji soj pokazao se standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603, a kao najrezistentniji *K. pneumoniae* soj 17.

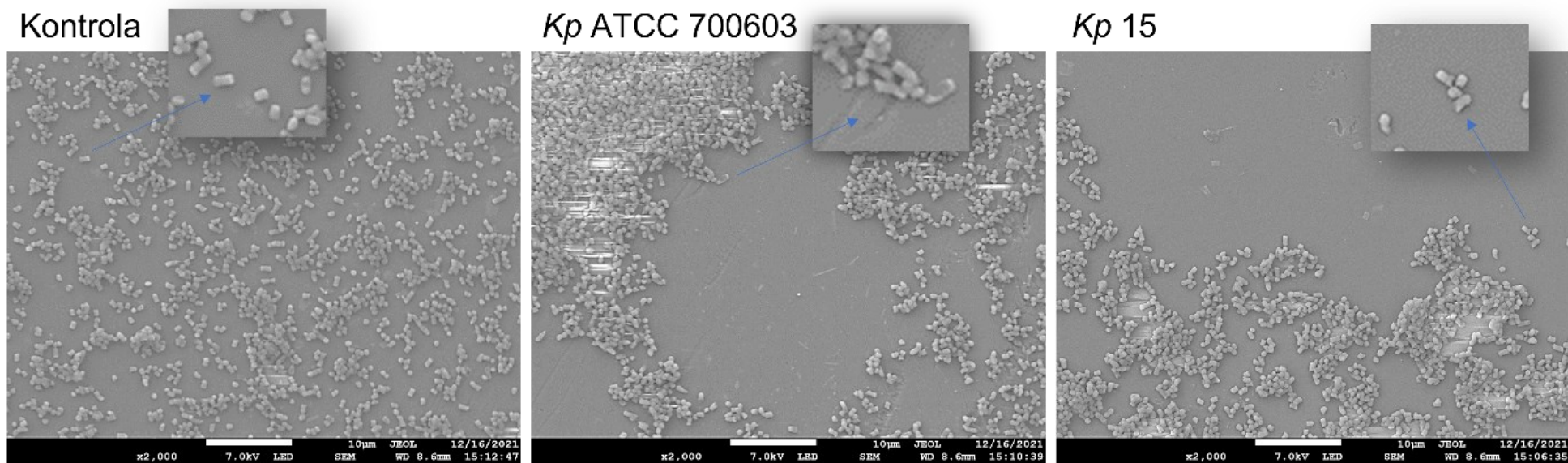
Promjene u topologiji biofilma praćene su digitalnom mikroskopijom. Na Slici 25. prikazani su primjeri slika dobiveni prije tretmana ozonom (kontrola) te nakon tretmana ozonom za standardni soj te jedan klinički izolat. Analiza je pokazala da su relativno grube i neravne površine pločica utjecale na prisutnost i raspodjelu bakterijskih stanica. Čini se da bakterije lakše rastu i da su prisutnije u šupljim područjima nego u ravnim područjima ili izbočinama. Usporedba područja prekrivenih bakterijama obojenim kristal-violetom dokazala je učinkovitost tretmana ozonom za smanjenje prisutnosti bakterija u biofilmu.



Slika 25. Primjeri slika dobiveni prije tretmana ozonom (kontrola) te nakon tretmana ozonom za standardni soj i jedan klinički izolat. Tamnoplave nakupine predstavljaju bakterije obojene kristal-violetom.

4.6. Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM)

Analiza keramičkih pločica pretražnim elektronskim mikroskopom pomogla je vizualizirati promjenu morfologije biofilma, odnosno bakterija u biofilmu prije i nakon tretmana ozonom. Plavim strelicama na Slici 26. prikazane su razorene bakterije biofilma gdje se lako uočava kako je kontrolna pločica krcata bakterijama, dok su na tretiranim pločicama vidljivi dijelovi površine pločice slobodni od bakterija, odnosno mjesta na koje je plinoviti ozon djelovao. Takve bakterije su izgledaju ispuhano i deformirano.



Slika 26. SEM mikrografovi 24 sata starog biofilma na keramičkim pločicama za netretiranu skupinu (kontrola) te za dva tretirana soja (standardni soj i jedan klinički izolat). Plava strelica prikazuje razorene bakterije biofilma.

4.7. Postotci inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom

Za svaki soj unutar svake metode izračunani su postotci inhibicije kako bi se dobio još točniji dojam o koliko jakoj inhibiciji plinovitog ozona se radi. Za izračun postotaka inhibicije uzete su srednje vrijednosti kontrola odnosno tretmana. Postotci su zaokruženi na dva decimalna mjesta.

Tablica 6. Postotci inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom za sve sojeve i sve metode. Rezultati su prikazani kao postotci (%) na dva decimalna mjesta.

Metoda	OXA-48-pozitivni sojevi					
	<i>Kp</i> ATCC	<i>Kp</i> 14	<i>Kp</i> 15	<i>Kp</i> 16	<i>Kp</i> 17	<i>Kp</i> 18
CFU/cm²	99,76	97,87	98,88	98,73	97,70	98,44
RLU	93,51	89,14	88,17	89,17	75,04	84,36
CV	67,17	55,69	58,37	59,81	36,61	45,50

5. RASPRAVA

Multi-rezistentni mikroorganizmi, njihova sposobnost stvaranja biofilмова, sve veća pojavnost infekcija povezanih s zdravstvenom skrbi kao i problemi u njihovom suzbijanju i držanju pod kontrolom te bakterijska antimikrobna rezistencija predstavljaju globalne probleme 21. stoljeća. S ciljem što boljeg pristupa rješenjima tih problema, istražuju se nove moderne tehnologije dezinfekcije prostora i površina kako bi mikrobiološka čistoća bila što veća. Kao jedna od učinkovitih metoda pokazala se primjena plinovitog ozona budući da ozon posjeduje jaka antimikrobna svojstva i visoki oksidacijski potencijal (21,22,25,27). Podaci i istraživanja utjecaja ozona na primjeru biofilma su vrlo oskudni. Stoga je cilj ovog rada bio detektirati biofilm bakterije *Klebsiella pneumoniae* na jednom standardnom soju i pet kliničkih sojeva na keramičkim pločicama, kvantificirati količinu stvorenog biofilma pomoću tri metode detekcije te utvrditi učinkovitost plinovitog ozona na redukciju broja bakterija u biofilmu *K. pneumoniae* tijekom 60-minutne izloženosti ozonu.

Za određivanje broja bakterija u prisutnom biofilmu korištene su tri različite kvantifikacijske metode koje nisu jednako pouzdane, no ono što je bitno jest da su sve tri metode pokazale isti najrezistentniji i isti najosjetljiviji soj na tretman ozonom. Određivanje ukupnog broja kultivabilnih bakterija (CFU/cm²) pokazalo je najveće postotke inhibicije, mjerenjem biološke aktivnosti ATP bioluminiscencijom postotci inhibicije nešto su niži, dok su postotci inhibicije najniži u slučaju određivanja ukupne biomase mjerenjem apsorbancija nakon bojenja kristal-violetom. Analizirajući postotke inhibicije, vidljivo je da je najveće postotke inhibicije za sve tri metode pokazao standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603 što je bilo i logično za očekivati. Najmanje postotke inhibicije kroz sve tri metode pokazao je klinički izolat OXA-48-producirajuća *K. pneumoniae* 17. No, ukoliko se promatraju rezultati ispitivanja osjetljivosti svakog pojedinog soja na antibiotike, najrezistentniji soj trebao bi biti OXA-48-producirajuća *K. pneumoniae* 14 budući da je dokazana rezistencija na 16 od 17 ispitivanih antibiotika (94,11%), dok bi se kao najosjetljiviji soj trebao istaknuti OXA-48-producirajuća *K. pneumoniae* 18 koji pokazuje rezistenciju na 9 od 16 ispitivanih antibiotika (56,25%). Odstupanje od očekivanih rezultata može se objasniti prednostima i nedostacima pojedine korištene metode.

Određivanje CFU (eng. *colony forming unit*) smatra se i koristi kao zlatni standard jer se njime broje i računaju samo žive, kultivabilne bakterije koje imaju sposobnost rasta na agaru, dok mrtve bakterije i ostaci bivaju isključene. Naknadno se CFU lako preračuna i izrazi kao CFU/mL ili CFU/cm². Nedostatak ove metode je taj što se ponekad nakupine bakterija mogu pogrešno prebrojati kao pojedinačne kolonije i rezultati mogu biti pogrešni i krivo protumačeni (47).

Mjerenje biološke aktivnosti učinjeno je metodom ATP bioluminiscencije. ATP bioluminiscencija je brza i vrlo osjetljiva metoda koja se može koristiti kao orijentacijska reakcija za određivanje mikrobiološke čistoće površina. Temelji se na reakciji ATP-a iz mikroorganizama na površini s reagens smjesom luciferina i luciferaze. Dolazi do produkcije energije koje se očituje kao svjetlo te od tuda i naziv samoj metodi. Osim brzine i osjetljivosti metode, kao prednost se ističe lakoća rukovanja odnosno njeno izvođenje. Kako je opisano u metodama ovog diplomskog rada, ali i u istraživanju utjecaja različitih koncentracija klornog preparata kao dezinfekcijskog sredstva na biofilm *food-borne* patogena (24,48), za dobivanje rezultata biološke aktivnosti mikroorganizama na nekoj površini potrebno je prebrisati tu površinu brisnim štapićem, uroniti štapić u reagens smjesu te takav uzorak staviti u komoru luminometra i kroz par sekundi uređaj na ekranu ispisuje vrijednost RLU. Osim ATP-a iz mikroorganizama, mjeri se i ATP iz ostataka proizvoda na površini. Negativna strana ove metode je što ne postoje utvrđeni standardi, odnosno referentne vrijednosti, posebno za mikrobiološku usklađenost hrane, hrane za životinje i mikrobiološke standarde čistoće površina. Dodatni nedostatak je mogućnost dobivanja lažno pozitivnog rezultata ukoliko se prilikom uzimanja brisa prebriše površina koja nije od interesa, a pojedini mikroorganizmi s te površine mogu reagirati s luciferinom i luciferazom te dati rezultat koji nije relevantan za istraživanje (21,24,25,27,49).

Treća metoda koja je korištena je bojenje pločica kristal-violetom. Ovo je najčešće korištena metoda za kvantifikaciju biomase biofilma, ali ima neka ograničenja, kao što je nespecifično vezanje na negativno nabijene molekule i niska ponovljivost zbog neravnomjerne ekstrakcije, disperzije i vezanja boje ili različitog uklanjanja biomase biofilma tijekom ispiranja. Zbog toga neka istraživanja umjesto kristal-violeta predlažu korištenje fluorescentnog bojenja (24,25,50).

Preostale dvije metode su vizualizacijske metode te su i svjetlosna mikroskopija i pretražna elektronska mikroskopija pokazale i potvrdile destrukciju biofilma nakon tretmana plinovitim ozonom u odnosu na kontrolu. Osim destrukcije biofilma, vidljiv je manji broj bakterija kao i veće praznine na pločicama što dodatno govori o sposobnosti ozona da razori bakterije u prisutnom biofilmu. Pomoću pretražne elektronske mikroskopije dokazana je destrukcija biofilma *K. pneumoniae* NCTC 13442 također nakon tretmana plinovitim ozonom gdje je ozon oštetio bakterijske stanice te uzrokovao invaginaciju njihove membrane, ali bez curenja staničnih materijala (21). Slična zapažanja dokazana su i u ranijim istraživanjima na primjeru *Listeria monocytogenes* (51).

Više puta je u ovom radu spomenuta i opisana produkcija ROS-ova (eng. *reactive oxygen species*). Njihova produkcija uzrokuje oksidativni stres koji posljedično uzrokuje oštećenje membrane i DNA. Dokazana je za 182% veća prisutnost ROS-ova nakon tretmana plinovitim ozonom na primjeru standardnog soja *K. pneumoniae* NCTC 13442 (21). Neka istraživanja ističu činjenicu da sve veća produkcija ROS-ova uzrokuje prekomjerno stvaranje izvanstaničnih polimernih supstanci (EPS) (52,53), dok neka istraživanja to negiraju (54). Veća količina EPS-a može biti objašnjena većom sluzavošću određenih sojeva, kao što su u ovome radu *K. pneumoniae* 17 i *K. pneumoniae* 18, što se vidi iz količine stvorene biomase. Standardni laboratorijski soj *K. pneumoniae* ATCC 700603 pokazao je najmanje vrijednosti gledajući sve tri metode jer je možda izgubio jačinu i virulentnost zbog čestog presađivanja s iskorištene (iscrpljene) hranjive podloge na novu hranjivu podlogu.

Učinkovitost ozona kao i njegovo vrijeme poluraspada ovisi o dosta faktora, od početne koncentracije ozona, temperature, relativne vlažnosti do brzine protoka odnosno cirkulacije zraka. Ukoliko pretpostavimo da su uvjeti u laboratoriju bili standardni ($t = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost = 60%, brzina protoka zraka u zatvorenoj kutiji = $0\text{ m}^3/\text{s}$, početna koncentracija ozona = 25 ppm) te ih uvrstimo u jednadžbu za računanje vremena poluraspada, dobivamo vrijednost od 481 minute. Literaturne vrijednosti poluraspada ozona su puno više te čak prelaze 1500 minuta, a sve to ovisi o stvorenim uvjetima kojima biva izložen (37).

Budući da ozon tako dobro djeluje na uništavanje bakterijskog biofilma, nije na odmet napomenuti kako je toksičan za ljude, no točna koncentracija i trajanje izloženosti koji su potrebni za izazivanje toksičnosti još nisu poznati. Povrh svega treba napomenuti kako organizam svakog pojedinca reagira drugačije te nije svaka osoba isto osjetljiva na istu razinu i trajanje izloženosti ozonu. Ističu se astmatičari kao ugroženija skupina osjetljivija na određene onečišćivače zraka kao ozon (21,27,55).

Zaključno, tretman plinovitim ozonom uspio je statistički značajno smanjiti broj bakterija u biofilmu na keramičkim pločicama, no ne u potpunosti uništiti stvorene biofilme. Preporuka je kombinirati tretman ozonom s nekim klasičnim metodama čišćenja i dezinfekcije te tako osigurati veću mikrobiološku čistoću, barem dok se ne razviju i ne zažive nove moderne tehnologije koje će biti efikasnije. Tako je ispitan kombinirani učinak plinovitog ozona s 15%-tnom limunskom kiselinom na biofilm standardnih sojeva *Acinetobacter baumannii* kroz pet različitih protokola i na dvije različite površine. Dokazano je da predtretman i/ili posttretman 15%-tnom limunskom kiselinom povećava logaritme redukcije u broju bakterija, smanjuje biološku aktivnost i ukupnu biomasu u odnosu na samostalni tretman ozonom (27).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja, analizom dobivenih rezultata i pregledom dosadašnjih spoznaja o dezinfekcijskom učinku ozona na biofilm, doneseni su sljedeći zaključci:

1. svi ispitivani sojevi *K. pneumoniae* stvorili su biofilm na keramičkim pločicama, najviše biofilma i najveću biomasu stvorio je klinički izolat *K. pneumoniae* 18, dok je najmanju biološku aktivnost pokazao i najmanje biomase stvorio standardni soj *K. pneumoniae* ATCC 700603;
2. tretman plinovitim ozonom uspio je statistički značajno smanjiti broj bakterija prisutnih u biofilmu;
3. primjenom plinovitog ozona kroz sat vremena smanjuje se prisutnost mikroorganizama na površinama za do 99,76%;
4. plinoviti ozon najučinkovitijim se pokazao na primjeru standardnog soja *K. pneumoniae* ATCC 700603, dok se najmanje učinkovitim pokazao na primjeru kliničkog izolata OXA-48-producirajuće *K. pneumoniae* 17;
5. primjena samo ozona nije dovoljna za potpuno uklanjanje stvorenih biofilмова na površinama te ga se preporučuje kombinirati s klasičnim metodama dezinfekcije i primijeniti mehaničko čišćenje površina prije postupka dezinfekcije;
6. plinoviti ozon ima potencijal za praktičnu primjenu u industriji jer je jeftin, jednostavan za dobivanje i relativno brzo se razgrađuje u kisik te su stoga potrebna daljnja istraživanja s različitim biocidnim aktivnim tvarima.

7. LITERATURA

1. Almatroudi A, Gosbell IB, Hu H, Jensen SO, Espedido BA, Tahir S, et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *J Hosp Infect.* 2016 Jul;93(3):263–70.
2. Dukarić S. Učestalost bolničkih infekcija i primjena antimikrobnih lijekova [Internet] [Diplomski rad]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2018 [citirano 20.05.2023.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:362330>
3. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2006 Jan 15;42 Suppl 2:S82-89.
4. Pittet D, Allegranzi B, Sax H, Dharan S, Pessoa-Silva CL, Donaldson L, et al. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis.* 2006 Oct;6(10):641–52.
5. Widmer AF, Conzelmann M, Tomic M, Frei R, Stranden AM. Introducing Alcohol-Based Hand Rub for Hand Hygiene The Critical Need for Training. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Jan;28(1):50–4.
6. Felebam O, St. John W, Shaban RZ. Hand hygiene practices of home visiting community nurses: Perceptions, Compliance, Techniques, and Contextual Factors of Practice Using the World Health Organization’s “Five Moments for Hand Hygiene.” *Home Healthc Nurse.* 2012 Mar;30(3):152–60.
7. Centar za kontrolu i prevenciju bolesti. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). [Internet] [citirano 20.05.2023.]. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/hicpac/index.html>
8. Santana SL, Furtado GHC, Coutinho AP, Medeiros EAS. Assessment of Healthcare Professionals’ Adherence to Hand Hygiene After Alcohol-Based Hand Rub Introduction at an Intensive Care Unit in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Mar;28(3):365–7.
9. Babady NE. Hospital-Associated Infections. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3).

10. Abram M, Škrobonja I, Ambrožić D, Repac-Antić D, Bubonja Šonje M. ESKAPE – bacteria that alert the world. *Med Flum*. 2018 Sep 1;54(3):242–53.
11. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Kudva IT, Zhang Q, editors. *Microbiol Spectr*. 2016 Mar 25;4(2):4.2.15.
12. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Oct;12(10):1221–36.
13. Panda SK, Buroni S, Swain SS, Bonacorsi A, Da Fonseca Amorim EA, Kulshrestha M, et al. Recent advances to combat ESKAPE pathogens with special reference to essential oils. *Front Microbiol*. 2022 Dec 6;13:1029098.
14. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268–81.
15. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6–7):287–92.
16. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *J Med Microbiol*. 2001 May 1;50(5):396–406.
17. Rangel K, Cabral FO, Lechuga GC, Carvalho JPRS, Villas-Bôas MHS, Midlej V, et al. Potent Activity of a High Concentration of Chemical Ozone against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Molecules*. 2022 Jun 22;27(13):3998.
18. Dancer SJ. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):665–90.
19. Bayarri B, Cruz-Alcalde A, López-Vinent N, Micó MM, Sans C. Can ozone inactivate SARS-CoV-2? A review of mechanisms and performance on viruses. *J Hazard Mater*. 2021 Aug;415:125658.
20. Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Jan;13(1):5–18.

21. Piletić K, Kovač B, Perčić M, Žigon J, Broznić D, Karleuša L, et al. 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.
22. Boyce JM. Modern technologies for improving cleaning and disinfection of environmental surfaces in hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016 Dec;5(1):10.
23. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: *Medicinska naklada*; 2013.
24. Kovač B, Piletić K, Kovačević Ganić N, Gobin I. The Effectiveness of Benzalkonium Chloride as an Active Compound on Selected Foodborne Pathogens Biofilm. *Hygiene*. 2022 Nov 28;2(4):226–35.
25. Kovač B, Planinić A, Planinić M, Piletić K, Gobin I. Treatment with Gaseous Ozone Significantly Reduced the Number of Bacteria in Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Biofilm. *Hygiene*. 2023 Apr 17;3(2):125–35.
26. Huang L, Jin Y, Zhou D, Liu L, Huang S, Zhao Y, et al. A Review of the Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Wastewater Treatment Systems. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Sep 26;19(19):12191.
27. Piletić K, Kovač B, Planinić M, Vasiljev V, Karačonji IB, Žigon J, et al. 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. *Processes*. 2022 Sep 5;10(9):1788.
28. Naseri T, Pourhossein F, Mousavi SM, Kaksonen AH, Kuchta K. Manganese bioleaching: an emerging approach for manganese recovery from spent batteries. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2022 Jun;21(2):447–68.
29. Giuliani G, Ricevuti G, Galoforo A, Franzini M. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. *Ozone Ther* [Internet] [citirano 20.05.2023.];3(3). Dostupno na: <https://pagepressjournals.org/index.php/ozone/article/view/7971>
30. Mohammadi Z, Shalavi S, Soltani MK, Asgary S. A review of the properties and applications of ozone in endodontics: an update. *Iran Endod J*. 2013;8(2):40–3.

31. Merhi Z, Moseley-LaRue R, Moseley AR, Smith AH, Zhang J. Ozone and pulsed electromagnetic field therapies improve endometrial lining thickness in frozen embryo transfer cycles: Three case reports. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Aug;98(34):e16865.
32. Sarron E, Gadonna-Widehem P, Aussenac T. Ozone Treatments for Preserving Fresh Vegetables Quality: A Critical Review. *Foods*. 2021 Mar 12;10(3):605.
33. Brodowska AJ, Nowak A, Śmigielski K. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018 Sep 2;58(13):2176–201.
34. Langematz U. Stratospheric ozone: down and up through the anthropocene. *ChemTexts*. 2019 Jun;5(2):8.
35. Greene AK, Güzel-Seydim ZB, Seydim AC. Chemical and Physical Properties of Ozone. In: O'Donnell C, Tiwari BK, Cullen PJ, Rice RG, editors. *Ozone in Food Processing* [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012 [citirano 21.05.2023.]. p. 19–32. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118307472.ch3>
36. Rowland FS. Stratospheric ozone depletion. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2006 May 29;361(1469):769–90.
37. McClurkin JD, Maier DE, Ileleji KE. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. *J Stored Prod Res*. 2013 Oct;55:41–7.
38. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jun 19;32(3):e00001-19.
39. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. Jass J, editor. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Oct;363(20):fnw219.
40. Young TM, Bray AS, Nagpal RK, Caudell DL, Yadav H, Zafar MA. Animal Model To Study *Klebsiella pneumoniae* Gastrointestinal Colonization and Host-to-Host Transmission. Monack D, editor. *Infect Immun*. 2020 Oct 19;88(11):e00071-20.
41. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):107–18.

42. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Aug 28;17(17):6278.
43. Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med*. 2018 Dec;10(1):77.
44. Lai YC, Lu MC, Hsueh PR. Hypervirulence and carbapenem resistance: two distinct evolutionary directions that led high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones to epidemic success. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019 Sep 2;19(9):825–37.
45. Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: History, Evolution, and Microbiology Concerns. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 2012 May;32(5):399–407.
46. Bedenić B, Sardelić S. Carbapenemases. In: Mishra M, editor. Growing and Handling of Bacterial Cultures [Internet]. *IntechOpen*; 2019 [citirano 21.05.2023.]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/growing-and-handling-of-bacterial-cultures/carbapenemases>
47. Hazan R, Que YA, Maura D, Rahme LG. A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiol*. 2012 Dec;12(1):259.
48. Kovač B. Detekcija biofilma na keramičkim pločicama pomoću ATP bioluminiscencije [Internet] [Završni rad]. [Rijeka]: Sveučilište u Rijeci; 2021. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:210711>
49. Griffith C. Surface Sampling and the Detection of Contamination. In: Handbook of Hygiene Control in the Food Industry [Internet]. *Elsevier*; 2016 [citirano 21.05.2023.]. p. 673–96. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081001554000443>
50. Amador CI, Stannius RO, Røder HL, Burmølle M. High-throughput screening alternative to crystal violet biofilm assay combining fluorescence quantification and imaging. *J Microbiol Methods*. 2021 Nov;190:106343.

51. Nicholas R, Dunton P, Tatham A, Fielding L. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*. 2013 Aug;115(2):555–64.
52. Gambino M, Cappitelli F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*. 2016 Feb 7;32(2):167–78.
53. Ionescu M, Belkin S. Overproduction of Exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 *rpoS* Mutant in Response to Osmotic Stress. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Jan 15;75(2):483–92.
54. Panebianco F, Rubiola S, Chiesa F, Civera T, Di Ciccio PA. Effect of Gaseous Ozone on *Listeria monocytogenes* Planktonic Cells and Biofilm: An In Vitro Study. *Foods*. 2021 Jun 26;10(7):1484.
55. Pratt JR, Gan RW, Ford B, Brey S, Pierce JR, Fischer EV, et al. A national burden assessment of estimated pediatric asthma emergency department visits that may be attributed to elevated ozone levels associated with the presence of smoke. *Environ Monit Assess*. 2019 Jun;191(S2):269.

8. ŽIVOTOPIS

Bruno Kovač rođen je 09.01.1999. godine u Rijeci. Dolazi iz Delnica gdje 2013. godine završava osnovnu školu, a 2017. godine prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Srednjoj školi Delnice. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, sveučilišni prijediplomski studij Sanitarnog inženjerstva završava u akademskoj godini 2020./2021., a na jesen 2021. godine upisuje sveučilišni diplomski studij Sanitarnog inženjerstva. Član je Studentskog zbora, Fakultetskog vijeća i FOSS-a pri Medicinskom fakultetu. Predstavnik je diplomskog studija Sanitarnog inženjerstva te predsjednik Studentskog kongresa zaštite zdravlja - Sanitas. Član je Povjerenstva za izborne predmete na spomenutom fakultetu. Od studentskih poslova, radi od 2018. do danas na Katedri za medicinsku fiziku i biofiziku kao demonstrator, od 2021. do danas na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju kao demonstrator te od 4. do 8. mjeseca 2021. godine na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije poslove vezane uz sprječavanje COVID-19 bolesti. Dobitnik je Dekanove nagrade za studentski aktivizam u akademskoj godini 2021./2022. te Nagrade rektorice za studentski znanstveni rad u akademskoj godini 2022./2023. Također je bio student na međunarodnoj razmjeni Erasmus+ za obavljanje stručne prakse. Aktivno se snalazi i koristi programima MS Office paketa. Od jezika se služi engleskim.