Utjecaj ozona na vrste Klebsiella pneumoniae rezistentne na karbapenem i kolistin

Repinec, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:901676

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ OZONA NA VRSTE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* REZISTENTNE NA KARBAPENEM I KOLISTIN

DIPLOMSKI RAD

Doris Repinec

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

UTJECAJ OZONA NA VRSTE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* REZISTENTNE NA KARBAPENEM I KOLISTIN

DIPLOMSKI RAD

Doris Repinec

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Doris Repinec**, JMBAG 0178110638, rođena 23.7.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj ozona na vrste *Klebsiella pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Doris Repinec**, JMBAG 0178110638, naslova

Utjecaj ozona na vrste *Klebsiella pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka	mentor	_____
2.	doc. dr. sc. Darija Lemić	član	_____
3.	izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković	član	_____

Zahvala

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuki koja mi je omogućila pisanje diplomskog rada pod svojim vodstvom. Hvala joj na pomoći, suradnji i korisnim savjetima koje mi je ustupila tijekom izrade ovog rada.

Neopisivo zahvaljujem mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaja na konstantnoj pomoći, na svim savjetima i sugestijama, na iznimno velikom strpljenju i susretljivosti tijekom laboratorijskog istraživanja i kasnije tijekom izrade samog rada.

Ovime želim zahvaliti Sandri Matijević na velikoj pomoći tijekom laboratorijskog istraživanja, kao i djelatnicima Zavoda za opće stočarstvo koji su mi omogućili da u potpunosti odradim ovo istraživanje.

Hvala mojim prijateljima koji su svojim prisutstvom uljepšali moje studentske dane i učinili ih danima za pamćenje. Posebno moram zahvaliti svojoj najboljoj prijateljici Valentini koja je sve studentske muke prolazila zajedno sa mnom.

Veliko hvala cijeloj mojoj obitelji što je uvijek bila uz mene, posebice želim zahvaliti tati koji mi je omogućio bezbrižno studiranje, zatim mojoj sestri i mom Filipu što su mi pružali bezuvjetnu podršku i neizmjernu vjeru u moj uspjeh.

Sadržaj

1. Uvod 1
   1.1. Hipoteze i ciljevi rada 2
2. Pregled literature 3
   2.1. Ozon 3
      2.1.1. Karakteristike 3
      2.1.2. Utjecaj ozona na mikroorganizme 4
      2.1.3. Primjena ozona 6
   2.2. Opće karakteristike vrste *Klebsiella pneumoniae* 8
      2.2.1. Antibiotička rezistencija 9
      2.2.2. Antibiotički rezistentne *K. pneumoniae* u okolišu i bolničkom okruženju 16
3. Materijali i metode 18
   3.1. Materijali 18
      3.1.1. Instrumenti, laboratorijsko posuđe i pribor 18
      3.1.2. Osnovne kemikalije 18
      3.1.3. Otopine 19
      3.1.4. Hranjive podloge 19
      3.1.5. Komplet za DNA izolaciju 19
      3.1.6. Molekularni reagensi, enzimi, markeri i početnice 19
      3.1.7. Bakterijske kulture 20
   3.2. Metode 21
      3.2.1. Izolacija genomske DNA Gram-negativnih bakterija *Klebsiella pneumoniae* 21
      3.2.2. Genotipizacija vrsta *K. pneumoniae* rep-PCR metodom 22
      3.2.3. Određivanje utjecaja ozona na odabrane izolate *Klebsiella spp.* 24
      3.2.4. Statistička analiza 27
4. Rezultati 28
   4.1. Grupiranje sojeva *K. pneumoniae* rep-PCR metodom 28
   4.2. Utjecaj različitih načina aplikacije i različitih koncentracija ozona na izolate *Klebsiella pneumoniae* 30
5. Rasprava 41
6. Zaključak 43
7. Popis literature 44
8. Prilog 53

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Doris Repinec**, naslova

Utjecaj ozona na vrste *Klebsiella pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin

Rastuća prevalencija multirezistentnih sojeva *Klebsiella pneumoniae* otpornih na karbapeneme i kolistin, antibiotike posljednje linije obrane u liječenju infekcija izazvanih enterobakterijama, predstavlja alarmantan problem na globalnoj razini. Stoga je nužno pronaći alternativne načine kako kontrolirati širenje ovakvih bakterija u otpadnim vodama i bolničkom okruženju. Ozon, kao jaki antimikrobni agens, predstavlja jedan od potencijalnih načina kontrole. Stoga je cilj ovog istraživanja ispitati baktericidan učinak ozona otopljenog u vodi, apliciranog s dvije koncentracije (2 i 4 ppm) te u obliku kapljica ili maglice, na reprezentativne multirezistentne sojeve *K. pneumoniae* (n=12). Utvrđeno je da ozon otopljen u vodi pokazuje značajan antimikrobni učinak. Efikasnost djelovanja, u pravilu, značajno ovisi o koncentraciji ozona, a samo kod četiri soja *K. pneumoniae* i o načinu aplikacije. Iako su svi ispitivani sojevi *K. pneumoniae* osjetljivi na obje koncentracije i načine aplikacije, postotak preživljavanja ovisi o kombinaciji tretmana. Ozon koncentracije 4 ppm, apliciran u obliku kapljica, pokazao se kao najefikasniji u suzbijanju rasta sojeva *K. pneumoniae*. Stopa preživljavanja reprezentativnih sojeva tretiranih koncentracijom ozona od 4 ppm u obliku kapljica iznosila je 0,19 do 1,85%. Koncentracija ozona 2 ppm apliciranog u obliku maglice, pokazala se najmanje efikasnom sa stopom preživljavanja testnih izolata od 1,30 do 86,98%.

Ključne riječi: ozon, kapljica, maglica, *Klebsiella pneumoniae,* multirezistentni sojevi

Summary

Of the master's thesis – student **Doris Repinec,** entitled

The effect of ozone on carbapenem and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* species

The growing prevalence of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and colistin, a last-line antibiotic defense in the treatment of enterobacterial infections, is an alarming and global problem. It is, therefore, necessary to find alternative ways to control the spread of such bacteria in wastewater and the hospital environment. Ozone, as a strong antimicrobial agent, is one such potential way of control. This study aims to examine the bactericidal effect of ozone dissolved in water. The effect of two concentrations of aqueous ozone, 2 and 4 ppm, applied in the form of droplets or fog, on representative multiresistant strains of *K. pneumoniae* (n=12) was examined. Ozone dissolved in water showed a significant antimicorbial effect. Ozone efficiency, in general, depends significantly on concentration, whereas ozone efficiency towards four strains of *K. pneumoniae* depended on both concentration and application method. Although all tested *K. pneumoniae* strains are sensitive to both concentrations and type of application, the survival rate depends on the combination of treatments. The concentration of ozone of 4 ppm applied as droplets proved to be most effective in controlling the growth of *K. pneumoniae* strains (0.19 to 1.85%). Ozone concentration of 2 ppm in the form of fog was the least effective as the survival rate of tested bacteria varies from 1.30 up to 86.98%.

Keywords: ozone, droplets, fog, *Klebsiella pneumoniae,* multiresistant strains

1. Uvod

Klebsiella pneumoniae je sveprisutna bakterija koja uzrokuje velik broj humanih, ali i životinjskih infekcija. Može se naći u gastrointestinalnom traktu (GI) pacijenata koji su primili mnogo antibiotika tijekom života ili su dugo boravili u bolnici te prošli invazivno liječenje. Uzrokuje mnoge infekcije vezane uz intenzivnu skrb i dugotrajno liječenje poput sepse, infekciju kirurških rana, upalu pluća vezanu uz primjenu respiratora te infekcije mokraćnog sustava.

Ozon (O_3) je bezbojni plin čiji se miris najčešće opisuje kao miris zraka nakon proljetne oluje. Izuzetno je postojan te se smatra jednim od najjačih oksidansa. Nastaje visokim unosom energije koja dijeli molekulu kisika (O_2), a isto tako se vrlo brzo kombinira s dostupnim kisikom kako bi stvorio reaktivni O_3 (Baysan i Beghton, 2007). Povišene koncentracije troposferskog (prizemnog) ozona mogu naštetiti zdravlju ljudi, životinja i biljaka, a uzrokuju štete i na različitim materijalima. Zbog toga je praćenje koncentracije prizemnog ozona sastavni dio praćenja kvalitete zraka.

Ozon ima široku primjenu te se stvara iz kisika što eliminira potrebu za korištenjem kemikalija ili drugih opasnih proizvoda. Puno je sigurniji za upotrebu od jakih nagrizajućih kemikalija te ima izvrsnu učinkovitost. Njegova primjena danas je široko rasprostranjena u razne svrhe, medicinske, prehrambene, poljoprivredne i dr. Štetan učinak ozona na patogene mikroorganizme koristi se u postrojenjima za odvođenje otpadnih voda, konzerviranje mesa i dr.

Ozon je snažan oksidirajući agens kojeg karakterizira sposobnost uništavanja velikog broja mikroorganizama, ali njegova terapijska primjena kao i oblik primjene je kontroverzna (Benoit i sur., 1995). Zabilježeno je kako ozon značajno smanjuje broj bakterija u zaraženom dentinu (Baysan i Beighton, 2007). Prilikom ozoniranja patogenih bakterija poput *K. pneumoniae* dolazi do znatnog smanjenja broja stanica. Prabakaran i sur. (2012) smatraju da liječenje ozonom u trajanju od samo nekoliko minuta ima snažan utjecaj na inaktivaciju patogenih mikroorganizama. On inhibira njihov rast uništavajući njihovu staničnu stijenku i membranu zbog čega mikroorganizam ne može preživjeti. Koncentracija ozona koja može ubiti bakterije iznosi 0,04 do 0,1 ppm. Toksičan je za male životinje u rasponu od 3 do 12 ppm (Stockinger, 1959), a ljudi osjećaju miris već pri 0,02 do 0,04 ppm te se pritom može pojaviti glavobolja.

Danas sve veći problem u svijetu postaju infekcije uzrokovane *Klebsiellom pneumoniae* koja je rezistentna na više klase antibiotika (multirezistentna). Zabilježen je sve veći broj sojeva *K. pneumoniae* otpornih na beta-laktamske antibiotike koji se najčešće koriste u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama iz reda *Enterobacterales*. Međutim, naročito velik problem predstavljaju karbapenem producirajući sojevi *K. pneumoniae* (KPC; engl. *carbapenem-producing*) koji su otporni na karbapeneme i kolistin kao antibiotike posljednje linije obrane u liječenju infekcija izazvanih ESBL-producirajućim enterobakterijama. Takvi sojevi *K. pneumoniae* vrlo se lako mogu proširiti u bolničkoj sredini i izazvati infekcije, osobito kod ljudi

s oslabljenim imunološkim sustavom. Time *K. pneumoniae,* otporna na ova dva antibiotika, postaje sve veći problem na globalnoj razini. Zbog toga je od izuzetne važnosti kontrolirati njeno daljnje širenje u bolničkom okruženju i otpadnim vodama u kojima čini značajan udio populacija mikroorganizama.

Budući da je ozon izuzetno snažno antimikrobno sredstvo, smatra se da će efikasno inhibirati rast višestruko rezistentnih bakterija *K. pneumoniae*. Međutim, efekt će ovisiti o koncentraciji i načinu na koji je ozon apliciran.

1.1. Hipoteze i ciljevi rada

Opći cilj ovog rada je odrediti utjecaj različitih koncentracija ozona (4 ppm i 2 ppm) apliciranog u obliku kapljica ili u obliku maglice na karbapenem i kolistin rezistentne sojeve *Klebsiella pneumoniae* izolirane iz komunalnih i bolničkih otpadnih voda.

Hipoteza ovog istraživanja je da će ozon pri koncentracijama od 2 i 4 ppm pokazati baktericidno djelovanje prema odabranim multirezistentnim sojevima *K. pneumoniae*, da će način aplikacije utjecati na njegovu efikasnost i da će se pokazati kao korisno sredstvo za kontrolu širenja ovih bakterija.

Specifični ciljevi rada:

1. Genotipizirati multirezistentne sojeve *K. pneumoniae* izolirane iz komunalnih i bolničkih otpadnih voda.
2. Odrediti i usporediti baktericidan učinak dviju koncentracija ozona otopljenog u vodovodnoj vodi (2 i 4 ppm).
3. Odrediti i usporediti baktericidan učinak ozona apliciranog u obliku kapljica i maglice.

2. Pregled literature

2.1. Ozon

2.1.1. Karakteristike

Ozon je plin blijedo plave boje i karakterističnog jakog mirisa koji podsjeća na svježi zrak. Sastavljen je od tri atoma kisika, a prisutan je na zemlji i sudjeluje u prirodnom ciklusu. Prvi ga je otkrio Christian Friedrich Schonbein 1840. godine. Postoji nekoliko metoda za stvaranje ozona u industriji: pomoću ultraljubičastog i termalnog zračenja te kemijskom, elektrolitičkom i kemijsko nuklearnom metodom. Ozon se može proizvesti u generatorima upotrebom UV zračenja ili ionizatorom plazma polja, takozvanim korona efektom. Takvi generatori sadrže reaktore koji isušeni zrak ili kisik koriste kao izvorni plin i pretvaraju ga u ozon. Dodavanjem visokog napona molekula kisika se dijeli na dva atoma kisika. Atomi se potom mogu kombinirati s drugim molekulama kisika koje čine molekulu s tri atoma kisika odnosno ozon. Ozon se stvara i u prirodi prilikom grmljavine kada električni izboj stvara ugodan miris čistog i svježeg zraka.

Najčešće se nalazi u plinovitom obliku, iako može biti prisutan u sva tri agregatna stanja. Poluživot (engl. *half-life*) ozona je puno kraći u vodi nego u zraku. Povišena temperatura mu smanjuje postojanost, neovisno u kojem otapalu se nalazi. Objavljeno istraživanje McClurkina i Maiera (2010) pokazuje poluživot ozona od 20 minuta za ozon otopljen u vodi na 20 °C, a 25 sati za ozon na suhom zraku pri 24 °C. U mnogim situacijama, uz kretanje zraka, više temperature i normalnu relativnu vlažnost, poluživot ozona u zraku je oko 30 minuta do jednog sata ili čak i manje. U zatvorenom prostoru ventilacija će raspršiti ozon, što znači da se razina koncentracije vrlo brzo može smanjiti.

O_3 veoma je nestabilna molekula, što znači da čim naiđe na drugu molekulu, sudara se s njom i time se razgrađuje. Pri tom oslobođeni atomi ponovno formiraju kisik zajedno sa slobodnim atomima druge molekule. Ozon je vrlo reaktivna molekula koja ima izuzetno jaka oksidacijska svojstva (Varga i Szigeti, 2016). Sposobnost oksidacije čini ga moćnim dezinficijensom jer može uništiti većinu bakterija u vodi i zraku. U različitim uvjetima može ulaziti u interakcije s gotovo svim tvarima i kemijskim elementima i tako smanjiti njihovu toksičnost pretvarajući ih u manje opasne. Na primjer, cijanidi prelaze u cijanite koji su puno sigurniji za žive organizme. Također, snažan oksidacijski potencijal ozona omogućuje mu da lako reagira s drugim molekulama te ih rastvara odnosno transformira. Ozon u potpunosti dezinficira vodu, inaktivira viruse, oksidira i razgrađuje organske tvari u vodi te oksidira mangan i željezo. Brzog je baktericidnog učinka već pri koncentracijama od 2 do 4 mg/L uz vrijeme kontakta od 4 do 10 minuta. Njegovi nedostaci očituju se u velikim pogonskim ili investicijskim troškovima (tri puta je skuplji od primjene elementarnog klora) te velika korozivnost i opasnost pri rukovanju.

Na sobnoj temperaturi gotovo je bezbojan plin. Pri niskim temperaturama (-112 °C) kondenzira se u tamnoplavu tekućinu, a pri atmosferskom tlaku i temperaturi 0 °C gustoća

ozona je nešto veća od gustoće zraka. Kod nagle promjene temperature ili tlaka može doći do eksplozije ozona s električnim iskrama.

Ozon je važan sastavni dio atmosfere koja ga sadrži u količini od 0.01 ppm – 0.04 ppm i tako regulira razinu bakterija i plijesni u prirodi. Količina ozona u zraku iznosi svega 0.001%, što je relativno malo s obzirom na njegovu ulogu u Zemljinoj atmosferi. Ozon se nalazi u dva sloja zemljine atmosfere, stratosferi i troposferi. Veći dio ozona (oko 90%) nalazi se u stratosferskom sloju ili takozvanoj ozonosferi na 20 do 50 kilometara nadmorske visine, a poznat je i pod nazivom „ozonski omotač". Ozonski omotač omogućava život na Zemlji. Drugi, manji dio ozona (oko 10%) nalazi se u troposferi, nižem dijelu atmosfere do otprilike 10 kilometara od Zemljine površine. U zadnjih 50 godina udvostručila se količina ozona u stratosferi kao posljedica onečišćenja izazvanih prometom i industrijom. Tako ozon dolazi u kontakt sa živim organizmima te u većim koncentracijama može biti visoko toksičan i oštetiti površinsko tkivo biljaka i životinja. Također, štetno djeluje i na prinos usjeva, rast šuma, pa i ljudsko zdravlje. Stratosferski sloj ozona upija veći dio (oko 77%) štetnog biološki aktivnog djelovanja sunčevih ultraljubičastih UV-B zraka što može loše djelovati na žive organizme na Zemlji i sva materijalna dobra. Izloženost UV-B zrakama za ljude predstavlja opasnost od raka kože, oštećenja oka te oslabljenja imunološkog sustava (Longstreth i sur., 1998). Problem s količinom ozona utječe i na globalno zagrijavanje. Ozonski omotač je područje u atmosferi koje se naziva i „Zemljin prirodni zaštitni filter od Sunca" jer ima sposobnost eliminirati ultraljubičaste zrake prije nego one dođu do površine Zemlje. Smanjenjem koncentracije ozona u ozonskom omotaču dolazi do formiranja ozonskih rupa. One predstavljaju područja izrazito prorijeđenog stratosferskog ozona, a kroz njih dio ultraljubičastog zračenja prodire do Zemljine površine i stvara velike probleme za okoliš i zdravlje ljudi.

2.1.2. Utjecaj ozona na mikroorganizme

Oksidacijska sposobnost ozona, alotropnog oblika kisika, odavno je poznato da je učinkovita u inaktivaciji patogenih mikroorganizama (Ohlmuller, 1892). Osim antimikrobnog svojstva, ozon je adekvatan za primjenu zbog svoje izuzetne nestabilnosti uslijed koje se brzo raspada na bezopasni molekularni kisik (O_2). Ozon ima razarajuće djelovanje na bakterije što rezultira oštećenjem membrane stanica, citoplazmatske membrane i DNA te time bakterije gube sposobnost odupiranja ozonskom napadu.

Poznata su dva moguća mehanizma inaktivacije mikroorganizama. Prvi je oksidacija sulfhidrilnih skupina i aminokiselinskih ostataka enzima, peptida i proteina. Drugi mehanizam uključuje oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina do peroksida. Tijekom faze inicijacije zbog aktivnosti ozona, molekula vodika (H_2) oslobađa se od ostatka molekule nezasićene masne kiseline. Time slobodni radikali s nesparenim elektronom u atomu ugljika ostaju bez vodika. Sljedeća faza obuhvaća preuređenje dvostrukih veza što dovodi do stvaranja konjugiranih veza. Nakon faze inicijacije koja je praćena nizom kemijskih reakcija, lipidi su potpuno peroksidirani. Produkti peroksidacije mijenjaju fizička svojstva staničnih membrana izazivajući njihovu depolarizaciju i inhibiranje aktivnosti enzima i transportnih proteina. Reakcija s jakim

oksidacijskim sredstvom kao što je ozon može dovesti do oksidacije aminokiselina, proteina i nukleinskih kiselina (Greene i sur., 2012). Smatra se da je uništavanje stanične membrane glavni uzrok koji dovodi do sekundarnog oštećenja DNA i na kraju smrti stanice (Antoszewski i Madej, 1997; Antoszewski i sur., 2004).

Brojna istraživanja potvrdila su bakteriocidno djelovanje ozona na različite mikroorganizme uključujući Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (Brodowska i sur. 2014). Poznato je da su Gram-pozitivne bakterije, koje imaju veći sadržaj peptidoglikana u staničnoj stjenci, osjetljivije na djelovanje ozona u vodenoj fazi od Gram-negativnih. Isto tako, bakterijske spore znatno su otpornije na učinak ozona od vegetativnih stanica (Greene i sur., 2012). Glavni razlog inaktivacije bakterijskih spora je gubitak sposobnosti klijanja, a ne oštećenje DNA.

Rickloff (1987) je proveo istraživanje kako bi se utvrdila izvedivost sterilizacije površina vodom zasićenom ozonom. U istraživanje su bile uključene spore *Bacillus subtilis* i *Clostridium sporogenes* koje nisu pokazivale značajne razlike u otpornosti na ozon. Obje vrste su deaktivirane 10-minutnim izlaganjem tretmanu ozonom na sobnoj temperaturi.

Bakterije, uključujući *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri* i *Vibrio kolere* osjetljive su na ozoniranu vodu pod raznim uvjetima (Broadwater i sur., 1973). Povedeni tim informacijama Restaino i sur. (1995) utvrdili su antimikrobni učinak ozonirane vode na četiri Gram-negativne i četiri Gram-pozitivne bakterije te dva kvasca i spore *Aspergillus niger.* Antimikrobni učinak nastojali su utvrditi na dva načina, ozoniranom vodom s i bez dodatka organskog materijala. Time je utvrđeno da su *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* trenutno inaktivirane pri doticaju s ozoniranom vodom, neovisno o dodatku organskog materijala. Stopa smrtnosti među Gram-negativnim bakterijama nije bila značajno različita (p>0,05). Gram-pozitivne bakterije bile su značajno više osjetljivije na utjecaj ozonirane vode. Ispitivani kvasci, *Candida albicans* i *Zygosaccharomyces bailii* inaktivirani su trenutno u ozoniranoj vodi, dok su spore *Aspergillus niger* inaktivirane tek nakon 5-minutne izloženosti ozoniranoj vodi. Stanice komenzalne gljive *Candida albicans* nakon izlaganja ozoniranoj vodi tijekom jedne minute gotovo da nisu postojale (Arita i sur., 2005). Elektronsko mikroskopskom analizom ipak je utvrđena mala količina *C. albicans* na ploči nakon izlaganja ozoniranoj vodi.

Fungicidno djelovanje ozona slično je baktericidnom zbog mehanizma oštećenja stanične membrane (Freitas-Silva i Venacio, 2010). Utjecaj ozona na kvasce i plijesni različit je ovisno o kojoj se vrsti radi. Učinkovitost plinovitog ozona na inaktivaciju mikroorganizama pokazala je jednake rezultate kao i učinak ozonirane vode. Jedina razlika je vrijeme tretiranja mikroorganizama kako bi se postigao željeni učinak, to jest njihova inaktivacija. Tretman plinovitim ozonom pokazao je manji vremenski period za potpuno uništenje patogenih bakterija, npr. *E. coli* u potpunosti je uništena za 7,5 minuta, isto kao i kvasci. Drugi tretman, ozoniranom vodom, trajao je nešto duže, 15 minuta, kako bi se postigao identičan učinak s istim mikroorganizmima (Zorgulenc i sur., 2008). Istoimeno istraživanje dokazalo je veću osjetljivost kvasaca na ozon od plijesni.

Ozon se smatra učinkovitim sredstvom za inaktivaciju virusa jer virusi mogu reagirati direktno s ozonom ili indirektno putem njihovih radikala nakon raspada ozona. Ozon reagira s aminokiselinama, proteinima i nukleinskim kiselinama što dovodi do inaktivacije virusa. Virusi povezani sa stanicama puno su otporniji na djelovanje ozona od slobodnih virusa (Emerson i sur.,1982). Dovoljna je mala koncentracija ozona (1 mg/L) tijekom 1 minute kako bi se smanjio broj virusnih čestica. Ozon uništava viruse difuzijom kroz proteinski omotač u jezgru nukleinske kiseline što rezultira oštećenjem virusne RNA. U višim koncentracijama, ozon oksidacijom uništava vanjsku proteinsku ovojnicu.

Postoje saznanja kako ozon djeluje na protozoe, jednostanične eukariotske organizme. Protozoe mogu biti u potpunosti bezopasne, ali mogu i uzrokovati različite bolesti te ih kao takve karakteriziramo kao parazite. Djelovanje ozona na protozoe nije smrtonosno već samo onemogućuje njihovo razmnožavanje te tako ne mogu nanijeti štetu ljudskom organizmu. Inače, one u ljudsko tijelo ulaze konzumacijom zaražene hrane ili vode i uzrokuju različite bolesti i tegobe te ih je potrebno ukloniti. Djelovanjem ozona može se uništiti oko 90% parazita u hrani (Korich i sur., 1990).

2.1.3. Primjena ozona

Ozon je snažno antimikrobno sredstvo s brojnim potencijalnim primjenama u širokom spektru djelatnosti u plinovitom ili tekućem agregatnom stanju. Visoka reaktivnost, probojnost i spontano razlaganje na netoksični proizvod (O_2) čine ga održivim dezinficijensom za osiguravanje mikrobiološke sigurnosti. Postupci dezinfekcije poput naprednih tehnologija oksidacije i mikrobnog tretmana UV zrakama redovito se koriste u kombinaciji s ozonom za postizanje učinkovite dezinfekcije. Ozon se desetljećima koristi u mnogim zemljama, a nedavno je u SAD-u dobio status sigurnog plina. U plinovitoj ili vodenoj fazi učinkovit je protiv većine mikroorganizama. Relativno niske koncentracije ozona i kratko vrijeme kontakta dovoljni su za inaktivaciju bakterija, plijesni, kvasaca, parazita i virusa. Osjetljivost mikroorganizama na ozon razlikuje se ovisno o fiziološkom stanju kulture, pH, temperaturi, vlažnosti i prisutnosti aditiva (kiselina, šećera).

Primjena ozona u prehrambenoj industriji uglavnom se odnosi na dekontaminaciju površine proizvoda i obradu vode. Može se koristiti za inaktivaciju mikrobiote na prehrambenim namirnicama poput mesa, povrća, peradi, jaja, ribe, voća i suhe hrane. Ozon snažno i izravno oksidira citoplazmatsku membranu i staničnu stijenku bakterija te smanjuje broj mikroorganizama i patogena čime produljuje rok trajanja prehrambenih proizvoda. Korištenje ozona u prehrambenoj industriji smatra se ekološki prihvatljivom metodom obrade hrane jer ne ostavlja opasne spojeve u njoj s obziromna to da brzo reagira i raspada se na molekulu kisika. Također, koristan je u detoksikaciji te uklanjanju mikotoksina i ostataka pesticida iz nekih poljoprivrednih proizvoda. Međutim, pretjerana upotreba ozona može uzrokovati oksidaciju nekih sastojaka na površini hrane. To obično rezultira promjenom boje i pogoršanjem ukusa određenog proizvoda (Kim i sur., 1999). Voda tretirana ozonom je

učinkovito sredstvo za uklanjanje *Enterococcus faecalis*, *E.coli* te drugih patogena koji se prenose hranom (Khadre i sur., 2001).

Ozonirana voda je učinkovito baktericidno sredstvo i može poboljšati kvalitetu i sigurnost očišćenog mesa škampa. Rok trajanja škampa pohranjenih u ledu malo je produžen poslije namakanja u 3 ppm O_3 nakon 60 sekundi (Chawla, 2006). Nije utvrđeno da se tretmanom smanjuje proizvodnja bioamina, ali potrošački senzorni rezultati ukazali su na veću prihvatljivost škampa tretiranih ozoniranom vodom. Komercijalni postupci obrade hrane pridonose većoj brojnosti bakterija na škampima. Time se dokazuje učinkovitost tretmana ozoniranom vodom jer uzrokuje veliko početno smanjenje broja bakterija.

Mogućnost korištenja ozona otkrivena je i u medicini. Prvi zubar koji je u svojoj ordinaciji koristio ozoniranu vodu je E. A. Fisch, a potom ju je predstavio njemačkom kirurgu dr. Erwinu Payru koji ju je od tada koristio u kirurgiji (Azarpazhooh i Limeback, 2007). Ordinacije dentalne medicine danas ozon navode kao jednu od najboljih tehnologija za bezbolno liječenje zuba bez bušenja, što uvelike smanjuje strah od zubara kod male djece. Primjenjuje se za liječenje osjetljivosti zuba, upale desni, oboljelih zuba i liječenja korijena zuba. Ozon je najmoćniji oksidirajući agens i uništava 99% bakterija u zubnom karijesu, a tretirana površina postaje otpornija na ponovni nastanak karijesa.

Posljednjih godina ozonirana voda postala je inovativan, ekološki prihvatljiv alat za kontrolu razvoja gljivičnih bolesti u vinogradu ili tijekom postupka konzerviranja grožđa. Campayo i sur. (2021) dokazali su da je odgovor na ozon ovisan o organima vinove loze i njenoj razvojnoj fazi. Ozon je imao najveći utjecaj na proteine toplinskog šoka i proteinske molekule šaperone. Međutim, geni povezani s razvojem stanične stijenke i sekunardnih metabolita pokazali su slabiju reakciju nakon tretmana ozonom, uglavnom u ranoj fazi sazrijevanja ploda.

Široka primjena ozona omogućila je njegovo korištenje i u poljoprivredne svrhe. Istraživanje Flores i sur. (2019) procijenilo je utjecaj primjene ozonirane vode na izboje, korijenje te kombiniranu primjenu na oba djela istovremeno kako bi se procijenilo hoće li utjecati na vizualnu i hranjivu kvalitetu brokule. Niti jedan od tretmana nije prouzročio vizualna oštećenja niti utjecao na fizičku kvalitetu brokule. Primjena tretmana na izboju smanjila je učestalost pojave alternarije s 18% na 2-3%. Uz to, smanjen je sadržaj glukorafanina i povećan sadržaj glukobrasicina, bez promjene ukupne koncentracije glukozinolata ili vitamina C i fenolnih spojeva. Primjena na korijenje povećala je sadržaj svih glukozinolata i glavnih fenolnih spojeva. Kombinirana primjena na oba biljna dijela imala je istu reakciju na kvalitetu izboja kao i tretman samo s korijenjem. Rezultati daju velik potencijal korištenja ozonirane vode za poboljšanje komercijalne i prehrambene kvalitete brokule.

Svježe rezano povrće postalo je sve popularnije zbog zdravih prehrambenih navika, uz glavni problem mikrobiološke sigurnosti proizvoda u vidu mogućnosti kvarenja, kao i zbog promjene vizualne i prehrambene kvalitete proizvoda. Ozon može djelovati kao sredstvo za dezinfekciju, međutim, zbog njegove jake oksidacijske aktivnosti potrebna je pažnja jer se u nekim slučajevima, odnosno pri korištenju previsokih doza ozona, kvaliteta proizvoda može smanjiti (Papachristodoulou i sur., 2017). Primjena ozonirane vode (0,8 mg/L tijekom 30 s)

prije pakiranja smanjuje žutljivost i zadržava karakteristike sastava svježe rezanog lišća špinata, osiguravajući produljenje roka trajanja do 3 dana. Štoviše, tijekom prvih 5 dana skladištenja zabilježen je pozitivan učinak na kontrolu populacije mikroorganizama (Papachristodoulou i sur., 2017).

U poljoprivredi vrlo je poznato suzbijanje štetnika insekticidima kako kod ratarskih biljaka tako i kod ostalih biljnih vrsta. Obično se koriste insekticidi širokog spektra, a problem su velike koncentracije zaostalih pesticida na povrću nakon berbe. Četiri vrste pesticida (metil-paration, paration, diazinon i cipermetrin) korištene su kako bi se dokazala učinkovitost oksidacije pesticida u vodenoj otopini s niskom koncentracijom otopljenog ozona korištenjem mikro-ekstrakcije u čvrstoj fazi (SPME) i GC-MS. Otopljeni ozon (1,4 mg/L) bio je učinkovit za oksidaciju 60–99% metil-parationa, cipermetrina, parationa i diazinona u vodenoj otopini za 30 minuta, a razgradnja je uglavnom završena u prvih 5 minuta (Wu i sur., 2007). Testirana je i mogućnost korištenja niske koncentracije otopljenog ozona (1,4–2,0 mg/L) za uklanjanje ostatka istoimenih pesticida s površine povrća (*Brassica rapa*). Ozon je uglavnom bio učinkovit u uklanjanju cipermetrina (> 60%), a učinkovitost uklanjanja uvelike je ovisila o razini otopljenog ozona i temperaturi. Istraživanje je potvrdilo da je ozoniranje siguran i perspektivan postupak uklanjanja ispitivanih pesticida iz vodene otopine i s površine povrća u domaćim uvjetima (Wu i sur. 2007).

Ozonirana voda dokazano je učinkovita u smanjenju brojnosti bakterija. Kako se ozon može koristiti u vodenoj i plinovitoj fazi, tako je i plinoviti ozon učinkovit za istu namjenu. Ozonizacija je metoda često korištena za obradu otpadnih voda i vode za piće zbog sposobnosti ozona da oksidira složene molekule, fenole i kemikalije (Kim i Tanaka, 2010). U kombinaciji s mikrobiološkom dezinfekcijom, ozoniranje se smatra atraktivnom metodom za napredno pročišćavanje otpadnih voda (Wert i sur., 2009). Organske tvari podliježu transformaciji u biorazgradive organske tvari koje se lako mogu ukloniti postupkom biorazgradnje. Primjena ozonizacije za pročišćavanje otpadnih voda je prihvatljivija metoda od ostalih metoda pročišćavanja poput kloriranja zato što ne dolazi do proizvodnje nusprodukata dezinfekcije, trihalometana (THMS) ili drugih kloriranih nusproizvoda DBPS i sličnih (Wei i sur., 2010).

Kemijski spoj bisfenol A (BPA) upotrebljava se u plastičnoj industriji i sve je više prisutan u vodenom okolišu te tako predstavlja zabrinutost za zaštitu okoliša i zdravlje organizama. Pokazalo se da razni napredni procesi oksidacije, uključujući ozoniranje učinkovito razgrađuju BPA u vodi (Umar i sur., 2012).

2.2. Opće karakteristike vrste *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella spp. je rod bakterija sveprisutan u prirodi. Obitava u okolišu, točnije u površinskim vodama, kanalizaciji i tlu te na vegetaciji (Bagley i sur., 1978), a može se naći i na sluznim površinama sisavaca kao što su ljudi, konji ili svinje. To su štapićaste, Gram-negativne bakterije iz reda *Enterobacterales*. Dobro preživljavaju u nepovoljnim okolišnim uvjetima iako ne stvaraju endospore i mikrociste jer su obavijene kapsulom, sluzavom opnom koja im

omogućuje kolonizaciju abiotskih i biotskih površina (Brenner i sur., 2015). Nepokretne su i fakultativno anaerobne što znači da mogu rasti u uvjetima s kisikom, a i bez njega. Oko 30% sojeva može fiksirati dušik u anaerobnim uvjetima. Kemoorganotrofi su, a energiju dobivaju oksidacijsko-redukcijskim reakcijama. Posjeduju sposobnost fermentacije laktoze uz proizvodnju kiseline i plina, ali postoje i sojevi koji uopće ne stvaraju plinove ili ih proizvode u vrlo malim koncentracijama.

K. pneumoniae izolirana je 1882. godine od strane njemačkog patologa i mikrobiologa Carla Friedlandera koji je sudjelovao u otkriću bakterijskog uzročnika upale pluća. Međutim, ime je dobila po Edwinu Klebsu koji je prvi uočio prisutnost bakterija u dišnim putovima osoba umrlih od upale pluća. U laboratoriju se provodi inkubacija kulture bakterija *K. pneumoniae* u temperaturnom rasponu od 35 do 45 °C. Svi sojevi rastu na svim vrstama medija koji se koriste za izolaciju i uzgoj enterobakterija poput hranjivog agara, Mac Conkey agar, BTB agar i dr. (Brenner i sur., 2015).

Bakterija *K. pneumoniae* se rutinski nalazi na sluznici nosa, u ustima, gastrointestinalnom traktu, ali se može ponašati kao oportunistički ljudski patogen. Stoga se može naći u urinu, grlu, na koži, oku i dr. Oportunističke infekcije su bolesti koje se javljaju kada je značajno oslabljen imunitet, a uzrokuju ih uzročnici poput bakterija, virusa, parazita koji kod osoba sa zdravim imunološkim sustavom većinom ne uzrokuju bolesti.

U ljudi je *K. pneumoniae* prisutna i kao saprofit u nazofarinksu i crijevnom traktu. U uzorcima stolice detektirana je u rasponu od 5 do 38%, dok je u nazofarinksu raspon od 1 do 6 % (Davis i Matsen, 1974). Uzročnik je raznih infekcija poput upale pluća, infekcije krvotoka, rana ili mjesta kirurškog zahvata. Bakterije mogu biti stečene, endogene (iz vlastite crijevne mikrobiote pacijenta) ili egzogene, iz bolničkog okruženja.

Visok postotak ovih bakterija, naročito porijeklom iz bolničke sredine nosi plazmide za rezistentnost (otpornost) na brojne antibiotike zbog čega je potrebno ispitati osjetljivost svakog uzorka u cilju odabiranja najefikasnije terapije. Svi sojevi posjeduju kromosomski ili plazmidski uvjetovanu rezistenciju na ampicilin, karbenicilin i tikarcilin. S obzirom na široku rasprostranjenost ove bakterije u prirodi i nepostojanje specifične profilakse, vrlo je važno spriječiti prenošenje uzročnika pranjem ruku te primjenom dezinfekcije i sterilizacije u bolničkom okruženju.

K. pneumoniae ima debelu polisaharidnu kapsulu što joj omogućuje zaštitu od procesa fagocitoze odnosno od obrambenih mehanizama domaćina. Lipopolisaharidi koji oblažu vanjsku površinu bakterije, fimbrije, siderofori koje uzimaju željezo od domaćina te omogućuju širenje upale smatraju se značajnim čimbenicima zaštite (Duvančić, 2019).

2.2.1. Antibiotička rezistencija

Klebsiella pneumoniae jedna je od klinički najvažnijih vrsta, kod imuno kompromitiranih osoba, odgovornih za stečene bolničke infekcije , uključujući upalu pluća, infekcije mokraćnog sustava, bakterijemije i apscese jetre. Antibiotici su lijekovi koji

sprječavaju rast bakterija i primjenjuju se za liječenje bakterijskih infekcija. Antibiotička rezistencija je globalni javnozdravstveni problem. Rezistencija se smatra prirodnim fenomenom odnosno evolucijskom prilagodbom bakterije. Može se pojaviti kao posljedica interakcija između lijeka, mikroorganizama i okoliša. Infekcije mogu biti uzrokovane konvencionalnim bakterijama ili multirezistentnim bakterijama (MDR) koje pokazuju višu stopu smrtnosti i zahtijevaju dulje bolničko liječenje. Više od 70% bakterija rezistentno je na najmanje jedan antibiotik. U Europskoj uniji više od 25 000 pacijenata godišnje umire od infekcija uzrokovanih s nekoliko tipova rezistentnih bakterija. Takve infekcije uzrokuju povećanje troškova u zdravstvu te gubitke od oko 1,5 milijardi eura godišnje (Hogberg i sur., 2010).

Gram-negativne bakterije vrlo su učinkovite u izbjegavaju antibiotika. Vanjska membrana im predstavlja barijeru za amfipatske molekule, a većina lijekova je amfipatska jer moraju biti topivi i sposobni proći vanjsku membranu. Unutarnja membrana spriječava ulazak hidrofilnih molekula, što ju čini odličnom preprekom. Porini u vanjskoj membrani i transporteri u unutarnjoj omogućuju unos hranjivih tvari (Lewis, 2013).

Rezistencija može biti posredovana samim mikroorganizmom te se kao takva dijeli na urođenu (primarnu) i stečenu (sekundarnu). Urođena potječe od normalnog genetičkog stanja organizma, a stečena nastaje kao posljedica mutacija u njihovim genima i ne može se predvidjeti. *K. pnemoniae* posjeduje sposobnost stjecanja i prenošenja gena za rezistenciju, odnosno pokazuje stečenu rezistenciju nastalu kao posljedica prirodnog odabira. Njeni okolišni izolati predstavljaju rezervoar gena koji se mogu prenijeti i na druge bakterijske vrste.

Pojam "superbugs" odnosi se na mikrobe s povećanim morbiditetom i smrtnošću zbog višestrukih mutacija koje daju visoku razinu otpornosti na klase antibiotika posebno preporučene za njihovo liječenje. Terapijske mogućnosti za ove mikrobe se smanjuju, a razdoblja bolničke njege produžuju i poskupljuju. U nekim su slučajevima super otporni sojevi također stekli povećanu virulenciju i pojačanu prenosivost. Realno, rezistencija na antibiotike može se smatrati čimbenikom virulencije.

Molekularni mehanizmi rezistencije na antibiotike opsežno su proučavani i uključuju istraživanja genetike i biokemije mnogih različitih aspekata bakterijske stanične funkcije (Alekshun i Levy, 2007). Činjenica je da je istraživanje djelovanja i rezistencije na antibiotike značajno pridonijelo znanju o strukturi i funkciji stanica. Procesi otpornosti su široko rasprostranjeni u mikrobnom svijetu i dobro su opisani za razne komenzale i patogene (Marshall i sur., 2009). Većina se gena za antibiotičku rezistenciju može diseminirati jednim ili više različitih mehanizama prijenosa gena. Najpoznatiji su geni enzima-laktamaze koji su detektirani i distribuirani po cijelom svijetu. Slučajne mutacije gena koji kodiraju enzime dovele su do formiranja modificiranih katalizatora sa sve većim spektrom otpornosti. Sve se češće susreću mutanti ciljanih gena bakterijske giraze i efekti fluorokinolona (FQ) iz stanice (Piddock, 2006). Još neočekivanije pojavio se transmisivni mehanizam inaktivacije FQ-a. Ovaj mehanizam nastaje jer jedna od mnogih aminoglikozidnih N-acetiltransferaza ima sposobnost modificiranja sekundarnog amina na FQ-ima, što dovodi do smanjene aktivnosti (Depardieu i

sur., 2007). Drugi nepredviđeni mehanizam rezistencije na FQ- ima poznat je kao Qnr, raširena porodica proteina koji vežu DNA.

Unutarnja (intrizična) rezistencija odnosi se na postojanje gena u bakterijskim genomima koji bi mogli generirati fenotipske rezistencije, tj. proto- ili kvazi rezistenciju. Od početka ovog tisućljeća, dostupnost tehnika mutageneze i brzog bakterijskog sekvenciranja genoma otkrile su mnoge potencijalne funkcije gena u bakterijama koje u kliničkim situacijama mogu dovesti do već spomenute, fenotipske rezistencije. Fenotipske analize djelomičnih ili „cjelovitih“ biblioteka gena, zasićenom mutagenezom genoma bakterija, omogućuju identifikaciju specifičnih mutanata koji izražavaju preosjetljivost kao odgovor na antibiotike. Pretpostavljeno je da će ekspresija odgovarajućeg gena divljeg tipa generirati fenotipsku rezistenciju. Mnogi identificirani pretpostavljeni geni "osjetljivosti", poput gena koji su genetski recesivni, možda neće dovesti do fenotip rezistencije. Unatoč tome, takvi pristupi identificiraju potencijalne R gene i pružaju informacije o sistemskoj biologiji rezistencije (Davies i Davies, 2010). Unutarnji regulator RamA *K. pneumoniae* igra značajnu ulogu u ukupnom odgovoru na antimikrobna sredstva tako što regulira gene koji su povezani s barijerama propusnosti i stoga mogu biti uključeni u smanjenu osjetljivost na antibiotike. Nedavno je dokazano da su povećane razine ovog regulatora uzrokovale promjene lipopolisaharida i posljedično smanjile osjetljivost na polimiksine (De Majumdar i sur., 2015).

Dok stečenu (ekstrizičnu) rezistenciju karakteriziraju stečeni genetski elementi (plazmidi, sekvence umetanja, transpozoni) koji mobiliziraju gene za antimikrobnu rezistenciju i mogu pružiti rezistenciju na antimikrobna sredstva među različitim vrstama bakterija. Otpornost na stresore iz okoline pokreće se kontaktom između sustava za osjetljivost bakterije i neposrednog vanjskog okruženja. Interakcija između osjetnih sustava unutar bakterija i vanjskog okruženja dovodi do prilagodljivih fizioloških promjena te time dolazi do modulacije ekspresija gena (Bhagirath i sur., 2019). Stečena rezistencija na polimiksine identificirana je u nekoliko rodova enterobakterija poput *Klebsiella, Escherichia, Enterobacter i Salmonella.* Mehanizmi rezistencije na kolistin ostaju nepoznati za neke bakterijske vrste, ali općenito je identificirano nekoliko molekularnih mehanizama. Najčešća je modifikacija lipopolisaharida putem kationske supstancije, slična onoj uočenoj kod bakterija s unutarnjom rezistencijom na polimiksine. Do sada je identificiran jedan prenosivi mehanizam rezistencije, pri čemu je većina mehanizama kodirana kromosomski. Dodavanje kationskih skupina u lipopolisaharide odgovorno je za stjecanje rezistencije na kolistin kod *Enterobacteriacea.* Veliki panel gena i operona uključen je u kvalitativnu modifikaciju lipopolisaharida, uključujući gene i operone koji kodiraju enzime koji su izravno uključeni u modifikacije lipopolisaharida (geni odgovorni za sintezu kationskih skupina i/ili njihovo dodavanje u lipopolisahride) tj. gen *pmrC*, *pmrE* i operon *pmrHFIJKLM*; regulatorni geni poput onih koji kodiraju proteine koju su uključeni u dvokomponentni sustav PmrAB i PhoPQ; i regulatori tih dvokomponetnih sustava odnosno gen *mgrB* koji negativno regulira sustav PhoPQ i novoopisani CrrAB dvokomponentni regulatorni sustav koji regulira sustav PmrAB (Poirel i sur. 2017).

Dugo se pretpostavljalo da stjecanje rezistencije uzrokuje ozbiljne energetske troškove za mikroorganizam i zaista, mnogi rezistentni mutanti mogu biti ograničeni rastom u

laboratorijskim uvjetima. Kao rezultat, smatralo se da će sojevi otporni na više lijekova biti nestabilni i kratkotrajni u nedostatku selekcije (Andersson, 2006). Međutim, kako se često pokazuje, laboratorijski uvjeti (posebno mediji za kulturu) ne mogu u potpunosti simulirati prirodni okoliš. Dostupni dokazi sugeriraju da patogeni s višestrukim mutacijama i kombinacijama *r* gena evoluiraju i uspješno opstaju *in vivo* (Davis i Davis, 2010).

Postoje sličnosti, ali i jasne razlike između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija; unatoč tome, plazmidno posredovani prijenos je daleko najčešći mehanizam horizontalnog prijenosa gena (Norman i sur.,2009). Iznenađujuće je da su bakteriofagi koji nose gene za antibiotike rijetko otkriveni u okolišu ili u bolničkim izolatima rezistentnih bakterija. Međutim, ne dolazi u pitanje povezanost faga s ugrađenim mehanizmima potrebnim za stvaranje pokretnih otpornih elemenata i s funkcijama kromosomski povezanih *r* gena. Često ih se smatra genima koji animiraju fagove "otiske prstiju", a koji kodiraju rezistenciju ili virulenciju na različitim vektorima. Prijenos gena konjugacijom opsežno je proučavan u laboratoriju i u mikrokozmosima koji se približavaju uvjetima okoliša. Kod streptokoka, meningokoka i srodnih rodova, razmjena gena virulencije i patogenosti vrlo je promiskuitetna. Kao glavni mehanizam prijenosa gena navodi se transformacija (Gillings, 2009).

Laboratorijske studije karakterizirale su brojne genetske mehanizme uključene u evoluciju populacija otpornih na antibiotike. Uloge plazmida, faga i transformacije dobro su utvrđene, ali mogu postojati i drugi procesi. Na primjer, spajanje bakterijskih stanica može se preferirati u složenim miješanim mikrobnim zajednicama, poput onih koje se nalaze u biofilmovima (Gillings, 2009). Biofilmovi se sastoje od matrice egzopolisaharida koja okružuje bakterijske zajednice s dobro uspostavljenim kanalima za dotok hranjivih tvari i vode, kao i odljev otpada (O'Toole, 2000). Matriks egzopolisaharida ograničava prodor antibiotika, dok blizina omogućuje horizontalni prijenos gena iz postojanih stanica (Stewart, 2002). Postojane stanice su one podskupine koje su preživjele antimikrobnu izloženost i mogu stvoriti rezistentne kolonije (Mah i O'Toole,2001). Stanice unutar biofilmova rastu relativno sporo i imaju nisku metaboličku aktivnost koja je štetna za aktivnost većine trenutno dostupnih antibiotika. Membranski podržani biofilmovi privlačni su kao *in vitro* sustavi za ispitivanje otpornosti jer se mnoštvo uzoraka može uzgajati istovremeno. Posebna prednost ovog sustava je mogućnost fizičkog pristupa objema stranama biofima što je omogućilo izravno mjerenje prodiranja otopljenih tvari kroz model biofilma (Anderl i sur., 2000). Iako nisu namijenjeni simulaciji određene bolesti, biofilmovi u koloniji mogu se smatrati primitivnim modelima nekih infekcija. Takav jednostavan modelni sustav, iako zasigurno nesavršen prikaz stvarnog biofilma, bilježi karakterističnu otpornost biofilmskih bakterija na antibiotike.

Klebsiella pneumoniae, kao poznati bolnički patogen, posljednjih godina bilježi veliki porast otpornosti na sve veći broj antibiotika u svijetu. *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* i vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*, osobito *Klebsiella pneumoniae,* zajedno čine skupinu ESKAPE patogena čija je kratica izvedena iz njihove sposobnosti da „pobjegnu" od antimikrobne terapije. To su mikroorganizmi koji su izbjegli postupcima liječenja te su odgovorni za većinu teških nozokomijalnih infekcija širom svijeta.

Primarno, *K. pneumoniae*, otporna je na ampicilin, antibiotik iz skupine aminopenicilina te karbenicilin, antibiotik koji pripada karboksipenicilinskoj skupini, dok u bolnicama stječe rezistentnost na veći broj antibiotika koji se primjenjuju u svrhu liječenja pacijenata (Andrašević i sur., 2009). Posljednjih desetak godina javlja se sve veći broj sojeva *K. pneumoniae* rezistentnih na sve beta-laktamske antibiotike koji se najčešće koriste u liječenju bakterijskih upala zbog svoje niske toksičnosti, širokog spektra djelovanja te visoke baktericidnosti. U tu skupinu spadaju antibiotici penicilini, cefalosporini, monobaktami, karbapenemi te inhibitori beta-laktamaze.

Rezistencija *K. pneumoniae* na treću generaciju cefalosporina postaje veliki globalni problem. Rezistencija nastala stvaranjem beta-laktamaza proširenog spektra (ESBL) javlja se u bolničkim izolatima i ima značajan utjecaj na mortalitet i duljinu oporavka (Giske i sur., 2008). Geni koji kodiraju ESBL nalaze se na plazmidima koji sadrže gene za otpornost na aminoglikozide, tetracikline, kloramfenikol i sulfametoksazol te trimetoprim. Zaključno tome, ESBL-pozitivni sojevi su multirezistentni (Volar, 2017).

Karakteristike MDR fenotipova određenih sojeva *K. pneumoniae* koji proizvode ESBL dovele su do značajnog povećanja upotrebe karbapenema, koji je postao posljednje sredstvo za liječenje *K. pneumoniae* koja proizvodi ESBL (Livermore i Woodford, 2006). Devedesetih godina prošlog stoljeća opisane su prve bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* koje su stečeno rezistentne na karbapeneme, a njihova otpornost posredovana je kromosomski kodiranim beta-laktamazama nazvanim karbapenemazama koje se dijele u četiri Amblerova molekularna razreda: A, B, C i D (Bubonja-Šonje i sur., 2014). Opsežna upotreba karbapenema rezultirala je razvojem plazmida posredovanih karbapenemazama, tj. enzimima koji hidroliziraju sve β-laktame, uključujući karbapeneme posljednje linije obrane (Queenan i Bush, 2007). Njihova pojava u enterobakterijama dovela je do pojave karbapenem rezistentnih enterobakterija (CRE).

Prema Amblerovoj podjeli na molekularne razrede, skupina A smatra se veoma rijetkom, a u nju spadaju karbapenemaze inhibirane klavulanskom kiselinom i tazobaktamom. Među njima najznačajnija je KPC beta-laktamaza prisutna u *K. pneumoniae.* Nakon prve izolacije KPC producirajućeg soja *K. pneumoniae*, došlo je opasnog širenja KPC sojeva svih enterobakterija. Takvi sojevi uglavnom uzrokuju sustavne bolesti, posebice bolničke infekcije. Enzim KPC-a nosi smanjenu otpornost na sve beta-laktamske antibiotike. B skupina sastoji se od metalo-beta-laktamaza koje sadrže cink u aktivnom mjestu enzima. Kao takve, prisutne su u fermentirajućim i nefermentirajućim Gram-negativnim bakterijama. U Hrvatskoj je rezistencija na karbapeneme u *K. pneumoniae* uzrokovana proizvodnjom KPC-2 beta-laktamazama (Bubonja-Šonje i sur., 2014). U D skupinu ubrajaju se klasične oksacilinaze (OXA-1, OXA-2, OXA-10) koje posjeduju rezistenciju na karboksipenicilin te ureidopeniciline. Isto kao i karbapenemaze iz skupine A, oksicilinaze s aktivnošću karbapenemazama uzrokuju otpornost na kabapeneme tek u kombinaciji s drugim mehanizmima rezistencije.

Zbog velike raznolikosti karbapenemaza i velikog potencijala širenja sojeva koji ih proizvode, važna je brza i točna dijagnoza koja bi mogla omogućiti odgovarajuću primjenu antimikrobne terapije i epidemiološki nadzor nad širenjem sojeva. Gram-negativni

karbapenemaza producirajući bacili uzrokuju visoku stopu mortaliteta, pa se često nazivaju „superbakterijama“. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike ima četiri moguća mehanizma djelovanja, inaktivacija antibiotika beta-laktamazama, modifikacija ciljanog PBP-a, smanjeni prodor lijeka do ciljanog PBP-a te izbacivanje lijeka iz stanice. Najčešći mehanizam rezistencije na beta-laktamske antibiotike je stvaranje beta-laktamaza (Katzung i sur., 2011).

Kolistin ili polimiksin E, polipeptidni je baktericidni antibiotik širokog spektra djelovanja protiv Gram-negativnih bakterija, uključujući i *K. pneumoniae.* 1947. godine kolistin je prvi put izoliran iz bakterije tla *Paenibacilus polymyxa.* Mehanizam antimikrobne aktivnosti kolistina predstavlja njegovo vezanje na lipopolisaharide i fosfolipide u vanjskoj staničnoj membrani Gram-negativnih bakterija. Time kationski polipeptidi dolaze u interakcije s anionskim lipopolisahardima koji se nalaze u vanjskoj membrani bakterije. Oni tada kompetitivno istiskuju dvovalentne katione magnezija i kalcija iz fosfatnih skupina membranskih lipida te njihovim gubitkom dolazi do poremećaja u vanjskoj membrani odnosno propuštanja unutarstaničnih sadržaja i u konačnici do smrtnog ishoda bakterije (Bilić, 2015). Kolistin se za liječenje upala uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama počeo upotrebljavati 1959. godine. Nepredvidljive su nuspojave liječenja ovim antibiotikom. Sve veći problem predstavljaju bakterije rezistentne na kolistin jer se on koristi kao krajnji antibiotik za liječenje kritičnih infekcija uzrokovanih multirezistentnim patogenim Gram-negativnim bakterijama. Soj *K. pneumoniae* definira se kao rezistentan na kolistin ako je minimalna inhibitorna koncentracija kolistina veća od 2 mg/L (EUCAST 2019). Rezistencija na kolistin najčešće je posredovana kromosomskim genima, no sve češće javlja se i ona posredovana plazmidnim genima koja je od većeg kliničkog značaja. Od molekularnih mehanizama rezistencije na kolistin najčešće je riječ o modifikaciji lipopolisaharida vanjske membrane bakterije. Istoimena rezistencija može biti posredovana plazmidnim *mcr* genima. Proteini kodirani tim genima pripadaju obitelji fosfoetanolamin transferaza koje kataliziraju adiciju fosfoetanolamina lipidu A bakterijske membrane čime se mijenja njen ukupan naboj (Poirel i sur., 2017).

Studija je pokazala da polisaharidna kapsula (CPS) djeluje kao zaštitna barijera protiv polimiksina kod *K. pneumoniae* (Campos i sur., 2004). Povećana regulacija kapsularnih gena za biosintezu doista smanjuje interakcije polimiksina s površinom bakterija, što dovodi do rezistencije na polimiksin. *K. pneumoniae* sposobna je osloboditi anionske kapsularne polisaharide sa svoje površine što dovodi do hvatanja kationih antimikrobnih peptida, poput polimiksina, smanjujući tako količinu antibiotika koji dolazi do površine bakterija (Llobet i sur.,2008). CPS je povezan s površinom bakterija putem ionske interakcije s LPS-om, a interakcija je stabilizirana dvovalentnim kationima (Fresno i sur.2006). Kao posljedica toga dolazi do oslobađanja CPS-a u prisutnosti polimiksina zbog poremećaja mostova ovisnih o kationu između molekula LPS-a.

Od sredine 1980-ih, hipervirulentna *K. pneumoniae*, općenito povezana s fenotipom hiperviskoznosti, pojavila se kao klinički značajan patogen odgovoran za ozbiljno širenje infekcija u mlađoj i zdravijoj populaciji. Hipervirulentne infekcije *K. pneumoniae* (hvKP) primarno su pronađene u istočnoj Aziji i sada se sve češće pojavljuju diljem svijeta. Iako je većina hipervirulentnih izolata *K. pneumoniae* osjetljiva na antibiotike, sve se više otkrivaju

izolati s kombiniranom virulencijom i rezistencijom, poput hipervirulentnih izolata *K. pneumoniae* rezistentnih na karbapenem (Chang-Ro i sur., 2017). Kombinacija rezistencije na više lijekova i pojačane virulencije potencijalno može uzrokovati izuzetnu kliničku opasnost.

Osim unutarnje rezistencije na ampicilin, većina sojeva hvKP rijetko je otporna na antibiotike i općenito je osjetljiva na često korištene antimikrobne lijekove (Paczosa i Mecsas, 2016.). Međutim, posljednjih nekoliko godina počeli su se pojavljivati otporni izolati hvKP, uključujući karbapenemaznu *K. pneumoniae* (KPC) i oksacilinaze-48 (OXA-48) (Lee i sur., 2016).

Izvješće iz Kine pokazalo je da je 17% sojeva hvKP pokazalo ESBL, a nekoliko ih je pokazalo rezistenciju na sve testirane antimikrobne lijekove, osim karbapenema i amikacina (Li i sur., 2014b). Antimikrobna rezistencija sojeva hvKP povećavala se s vremenom (Li i sur., 2014b). Zabilježeno je nekoliko slučajeva hvKP rezistentnih na antibiotike u Europi i Americi (Surgers i sur., 2016). HvKP sojevi koji pripadaju klonskom kompleksu 23 stekli su veliki virulentni plazmid koji kodira različite čimbenike virulencije, uključujući siderofore (Struve i sur., 2015). Prikupljanje željeza putem siderofora presudno je za rast i virulenciju kod domaćina. Delecija gena koji kodira sideroforni aerobaktin smanjio je rast u serumu i virulenciju u modelu plućnih infekcija (Russo i sur., 2015). Kako bi kolonizirala domaćina, *K. pneumoniae* koristi pilije tipa I za prianjanje na različite površine (Murphy i sur., 2013.; Rosen i sur., 2015). Delecije gena uključenih u sintezu i regulaciju pila tipa I smanjuju virulenciju kod miševa. Nakon kolonizacije, *K. pneumoniae* može preživjeti, na primjer u alveolarnim makrofazima, izbjegavajući ubijanje u fagosomu (Cano i sur., 2015).

Poput mnogih drugih oportunističkih patogena, *K. pneumoniae* ima različite čimbenike virulencije koji pomažu bakteriji da preživi unutar domaćina (Podschun i Ullmann, 1998). Kao jedna od najočitijih zaštitnih struktura smatra se kapsula koja je dobro proučena kod *K. pneumoniae* (March i sur., 2013). Kapsula štiti od fagocitoze, antimikrobnih peptida i lize posredovane komplementom. Ona čini glavnu fizičku barijeru za membranski napadni kompleks, ali vanjska membrana *K. pneumoniae* čini glavnu metu za MAC (*Mycrobacterium avium* kompleks). Kao glavna komponenta stanične stijenke Gram-negativne bakterije, lipopolisaharid (LPS), igra važnu ulogu u stabilnosti vanjske membrane i zaštiti od vanjskih utjecaja. Za Gram-negativne bakterije lipopolisaharid je presudan za vitalnost, ali njegove modifikacije su uobičajene i potrebne za prilagodbu u različitim okruženjima (Needhami Trent, 2013). *K. pneumoniae* je razvila nekoliko mehanizama pomoću kojih može modificirati svoj lipid A tijekom kolonizacije i infekcije, što ukazuje da su modifikacije lipida A ključne za osiguravanje preživljavanja unutar domaćina (Llobet i sur., 2015). *K. pneumoniae* i druge Gram-negativne bakterije izlučuju vezikule vanjske membrane koji sadrže LPS koji mogu apsorbirati proteine komplementa čime inhibiraju taloženje komplementa na bakterijskoj površini. Inače, sustav komplemenata pripada prvoj liniji imunološke obrane i sastoji se od mreže plazma proteina koji pokreću proteolitičku kaskadu nakon prepoznavanja nekoliko mikrobnih obrazaca (Ricklin i sur., 2010.; Walport, 2001).

Osim modifikacije kapsularnih polisaharida i LPS struktura, *K. pneumoniae* također koristi proteine vanjske membrane kako bi izbjegla otkrivanje sustavom komplementa.

Gubitak proteina vanjske membrane OmpK36 pridonosi povećanoj rezistenciji na antibiotike i redovito se primjećuje u izolatima rezistentnim na antibiotike (Xuan i sur., 2009).

2.2.2. Antibiotički rezistentne *K. pneumoniae* u okolišu i bolničkom okruženju

Bakterije roda *Klebsiella* značajni su uzročnici bolničkih i izvanbolničkih infekcija ljudi. Smatra se oportunističkim patogenom, što znači da napada imuno kompromitirane osobe. Glavni uzročnik bolničkih infekcija uzrokuje vrsta *K. pneumoniae.* Procjenjuje se da rod *Klebsiella* uzrokuje oko 8% svih bolničkih infekcija u Europi i SAD-u (Podschun i Ullmann, 1998).

K. pneumoniae važna je multirezistentna bakterija (MDR) koja utječe na ljude i glavni je izvor bolničkih infekcija povezanih s visokim morbiditetom i smrtnošću zbog ograničenih mogućnosti liječenja. Rezistencija na antibiotike, posebice na cefalosporine i karbapeneme predstavlja veliku prijetnju zdravstvenom sustavu u cijelom svijetu. Donedavno je otpornost smatrana samo kliničkim problemom, ali su prirodni ekosustavi sve više prepoznati kao važan izvor gena za rezistenciju na antibiotike (Caltagirone i sur., 2017).

Pojava rezistencije na karbapenem u *K. pneumoniae* predstavlja značajan klinički problem koji se najčešće pripisuje proizvodnji karbapenemaza *Klebsiella pneumoniae* (KPC) (Nordmann i sur., 2009). Navedeni soj KPC uzrokuje značajne kliničke probleme jer je otporan na više lijekova, nema osjetljivost na β – laktamske antibiotike, fluorokinolone i aminoglikozide (Bratu i sur., 2005) što značajno otežava liječenje. Do 2011. godine enterobakterije koje proizvode karbapenemaze bile su jako rijetke u Hrvatskoj. 1996. godine pojavila se u Sjevernoj Karolini, a kasnije je došlo do širenja diljem Sjedinjenih Američkih Država (Bratu i sur., 2005). U veljači 2011. godine pojavio se prvi soj KPC *K. pneumoniae,* koji je iste godine izoliran u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (Bedenić i sur., 2012), dok je 2012. godine otkriveno 19 novih. Najnoviji podaci, iz 2019. godine, bilježe lošiju situaciju rezistentnosti *K. pneumoniae* na 3. generaciju cefalosporina i karbapeneme. Više od polovice prijavljenih izolata rezistentno je na 3. generaciju cefalosporina, točnije 51%. Također, značajan porast zabilježen je i kod rezistencije na karbapeneme u iznosu od 12% (Tambić Andrašević i sur., 2020).

U Europi se udio izolata *K. pneumoniae* s ESBL (engl. *extended spectrum betalactamases*) pojavljuje između <5% i >50%. Hrvatska bilježi udio od 56% u invazivnim (nebolničkim) izolatima i 34% u bolničkim izolatima (Tambić Andrašević i sur., 2012).

Tijekom posljednjeg desetljeća zabilježen je najveći broj infekcija karbapenem rezistentnom *K. pneumoniae* u svijetu. Brzo i globalno širenje takve vrste infekcije vrlo je zabrinjavajuće u zdravstvenim ustanovama. Vrlo lako se može proširiti u bolničkoj sredini te izazvati različite vrste infekcija, osobito kod imunološki oslabljenih ljudi. Među češćim infekcijama su primarna bakterijemija, infekcija mokraćnog sustava, abdominalne infekcije i infekcije rana. Problem predstavljaju i pacijenti koji mogu postati asimptomatski kliconoše, što može trajati dulje vrijeme. Stopa smrtnosti kreće se od 30 do 44%. U slučaju bakterijemije, prisutnosti bakterija u krvi, smrtnost se znatno povećava na 71,9% (Akturk i sur., 2016). Slučajevi infekcija karbapenem rezistentnom *K. pneumoniae* zahtijevaju brzu reakciju,

korištenje odgovarajuće antibiotske terapije koja je presudna za preživljavanje pacijenata. Moguća je kolonizacija navedenih bakterija što zahtijeva boravak pacijenta na odjelu intenzivne njege i dugotrajnu hospitalizaciju. Veće stope kolonizacije zabilježene su kod kroničnih alkoholičara, hospitaliziranih bolesnika, osoba s oslabljenim imunološkim sustavom i ljudi koji dolaze iz Kine. Velik problem s ovim tipom infekcije javlja se u pedijatriji zbog ograničenih odgovarajućih skupina antibiotika koji se smiju koristiti. Stoga su najveće štete nanesene djeci do prve godine života, ali i ljudima nakon pedesete godine života jer se tada češće javljaju problemi s urinarnim traktom.

Jedno od istraživanja provedeno je na 100 ispitanika kako bi se utvrdila postojanost bakterijskog soja *K. pneumoniae* u uzorcima urina. Pokazalo se da je u 65% uzoraka urina, *Klebsiella pneumoniae* uzročnik infekcije mokraćnog sustava. Također, utvrđena je rezistencija na cefoksitin u iznosu od 76% (76/100). Od toga kod 86% sojeva radilo se o bolničkim pacijentima, a 66% o izvanbolničkim pacijentima (Dujmić Ilić, 2015).

Vrlo je važno pridržavati se mjera za sprečavanje širenja KPC-a u zdravstvenim ustanovama (Siegel i sur., 2006). S obzirom na to da se *K. pneumoniae* KPC prenosi direktnim kontaktom, bilo izravno ili neizravno, važno je održavati higijenu ruku, osoblje je obavezno nositi zaštitne pregače, rukavice i maske, okolinu bolesnika potrebno je održavati čistom i suhom te je bolesnika potrebno izolirati u sobu sa zasebnim sanitarnim čvorom. Potrebna je velika odgovornost svih djelatnika u zdravstvenim ustanovama jer je moguć prijenos bakterija dodirom kontaminiranog područja (stol, krevet, vrata), ali i putem bolničke hrane što su dokazali Casewell i Phillips (1978).

Najveći problem *Klebsiella* stvara u bolničkom okruženju, međutim ni prirodni ekosustavi nisu izostavljeni. Štimac i sur. (2009) prikazuju preživljavanje i razmnožavanje *K. pneumoniae* Caroli (01:K2) u različitim vodama; morskoj, destiliranoj, izvorskoj vodi i vodi iz slavine. Dokazana je sposobnost bakterije da dugo preživi u većini uzoraka voda pri temperaturi od 24 °C. Dobiveni su iznenađujući rezultati s prirodnom izvorskom vodom koja se pokazala najnepovoljnija za ovu bakteriju budući da se broj bakterija postepeno smanjivao, a nakon 142 dana nisu ni bile prisutne u zraku. S druge strane, morska voda je veoma povoljno stanište za *K. pneumoniae* s obzirom na to da iznimno dugo preživljava u njoj uz neznatno smanjenje broja bakterija. Najveći broj bakterija preživljava u destiliranoj vodi, dok je u vodi iz slavine uočen pad njihove brojnosti (Štimac i sur., 2009).

U vodenom okruženju rasprostranjenost bakterija otpornih na antibiotike i onih koje potječu iz bolničkih i komunalnih otpadnih voda neprestano raste. Geni enzima beta-laktamaze identificirani su u bakterijama koje su izolirane iz površinskih voda i postrojenja za obradu otpadnih voda (Caltagirone i sur., 2017). Visoke koncentracije antibiotika ili njihovih metabolita ispuštenih zajedno s urinom i fekalijama u otpadne vode povećavaju selektivni pritisak u populacijama bakterija i tako omogućuju stvaranje generacija mikroorganizama otpornih na antibiotike.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Instrumenti, laboratorijsko posuđe i pribor

- Laboratorijska vaga TE3102S (Sartorius AG, Njemačka)
- Boca s pumpicom
- Centrifuga 54145R (Eppendorf AG, Njemačka)
- Denzitometar DEN-1 (Biosan, Latvija)
- Staklene epruvete
- Foger (3 bar, Gloria, Njemačka)
- Inkubator MIR-153 (Sanyo, Japan)
- Kadica za izradu gela (Thermo Scientific, SAD)
- Laboratorijske čaše, 400 mL (Ilmabor, Njemačka)
- Menzura, 250 mL (Normax, Portugal)
- Petrijeve zdjelice (Anicrin, Italija)
- Uređaj za PCR ProFlex PCR System (Applied Biosystem, Life Technologies, SAD)
- ClearLine® serološke pipete, 1 ml (Biosigma, Italija)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu Owl A1 (Thermo Scientific, SAD)
- Uređaj za generiranje i otapanje ozona u vodi, 8 g/L (SIHON, Hrvatska)
- Uređaj za vizualizaciju agaroznih gelova UVIDOC HD6 (Uvitec, Velika Britanija)
- Vodena kupelj NB9 (Nüve, Turska)
- Vodena kupelj WB7 (Memmert, Njemačka)
- Žličica

3.1.2. Osnovne kemikalije

- Agar (Biolife, Italija)
- SeaKem® agaroza (Lonza, SAD)
- Natrijev klorid, NaCl (VWR Chemicals, Belgija)
- Propan-2-ol (VWR Chemicals, Belgija)

3.1.3. Otopine

Etanol (70%)

70% otopina etanola pripremljena je miješanjem 729,2 mL 96% etanola (Gram-Mol, Hrvatska) i 270,8 mL sterilne destilirane vode.

Fiziološka otopina (0,85%)

Fiziološka otopina (0,85%) pripremljena je otapanjem 0,85 g natrijevog klorida (VWR Chemicals, Belgija) u 1 L destilirane vode i sterilizirana pri 121 °C kroz 15 min.

Ozonirana voda (2 i 4 ppm)

Priprema ozonirane vode opisana je u poglavlju 3.2.3.1.

3.1.4. Hranjive podloge

Luria-Bertani (LB) kruta hranjiva podloga

LB kruta hranjiva podloga pripremljena je otapanjem 10 g triptona (Biolife, Italija), 5 g ekstrakta kvasca (Biolife, Italija), 10 g NaCl (VWR Chemicals, Belgija) i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Ovako pripremljena otopina je sterilizana pri 121 °C kroz 15 min.

Luria-Bertani (LB) tekuća hranjiva podloga

LB tekuća hranjiva podloga pripremljena je otapanjem 10 g triptona (Biolife, Italija), 5 g ekstrakta kvasca (Biolife, Italija) i 10 g NaCl (VWR Chemicals, Belgija) u 1 L destilirane vode te je sterilizirana pri 121 °C kroz 15 min.

3.1.5. Komplet za DNA izolaciju

- Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega, SAD

3.1.6. Molekularni reagensi, enzimi, markeri i početnice

- Boja za gel elektroforezu 6x LD (Thermo Scientific, SAD)
- dNTP, 10 mM (Thermo Scientific, SAD)

- DreamTaq polimeraza, 5 U/µl (Thermo Scientific, SAD)
- Pufer za DreamTaq polimerazu s 20 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, SAD)
- Etidij bromid otopina (Promega, SAD)
- Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific, SAD)
- GTG_5, liofiliziran (Metabion, International AG, Njemačka)

3.1.7. Bakterijske kulture

Bakterijski izolati *K. pneumoniae* korišteni u ovom istraživanju, a prikupljeni iz komunalnih i bolničkih otpadnih voda na području grada Zagreba (n=48) prikazani su u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Izolati *K. pneumoniae* korišteni u ovom istraživanju.

Izolat	**Vrsta**	**Rezistencija na klase antibiotika**
SE_SC_COL_46	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_47	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_54	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_67	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_82	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_84	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_86	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_87	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_95	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_96	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_97	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_99	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_101	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_102	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_182	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_204	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
H2_SC_COL_60	*K. pneumoniae*	karbapenemi i kolistin
SE_SC_COL_21	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_30	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_51	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_52	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_59	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_61	*K. pneumoniae*	Karbapenemi

Nastavak tablice 3.1. Izolati *K. pneumoniae* korišteni u ovom istraživanju.

Izolat	Vrsta	Rezistencija na klase antibiotika
SE_SC_COL_68	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_69	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_71	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_72	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_78	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_118	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_137	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_148	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_152	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_164	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_173	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_189	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
SE_SC_COL_190	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
H1_SC_COL_35	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
H1_SC_COL_44	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
H1_SC_COL_63	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
H1_SC_COL_65	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
H2_SC_COL_47	*K. pneumoniae*	Karbapenemi
H2_SC_COL_48	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin
H2_SC_COL_49	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin
H2_SC_COL_57	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin
H2_SC_COL_59	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin
H2_SC_COL_64	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin
H2_COL_79	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin
H2_SC_COL_118	*K. pneumoniae*	karbapenemi i vankomicin

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA Gram-negativnih bakterija *Klebsiella pneumoniae*

Genomska DNA je ekstrahirana iz izolata *K. pneumoniae* prikupljenih iz komunalnih i bolničkih otpadnih voda (n=48) na području grada Zagreba. Izolati su čuvani u glicerolu (25%) pri -20 °C do analiza.

U svrhu izolacije genomske DNA izolati su prvo pročišćeni do monokulture na krutim LB podlogama. Pojedinačna kolonija svakog izolata sterilno je precijepljena u 1,5 ml tekuće LB podloge i inkubirana na 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije stanice su odvojene od hranjivog medija centrifugiranjem u trajanju od 3 min pri 16000 x*g* i genomska DNA je izolirana iz staničnog peleta pomoću kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega, SAD prema uputama proizvođača. S iznimkom izopropanola i 70% etanola, sve ostale korištene otopine sastavni su dio kompleta za izolaciju genomske DNA.

Staničnom peletu je dodano 600 µl pufera za lizu (engl. *Nuclei Lysis Solution*) i u potpunosti je resuspendiran laganim pipetiranjem. Stanična suspenzija je zatim inkubirana na

80 °C/5 min u vodenoj kupelji čime je postignuta potpuna liza bakterijskih stanica. Uzorak je zatim ohlađen na sobnu temperaturu, dodano mu je 3 µl RNase otopine, pažljivo promiješan preokretanjem tubice 2-5 puta i inkubiran na 37 °C/45 min. U ovom koraku uklonjena je RNA. Nakon inkubacije uzorak je ohlađen na sobnu temperaturu i dodano mu je 200 µl otopine za precipitaciju proteina (engl. *Protein Precipitation Solution*). Smjesa je homogenizirana kratkim vorteksiranjem i inkubirana na ledu 5 min kako bi se istaložili stanični proteini. Stanični detritus odvojen je od DNA centrifugiranjem na 16000 x*g* tijekom 3 min. Supernatant s genomskom DNA je prebačen u novu sterilnu tubicu s 600 µl izopropanola sobne temperature. Uzorak je lagano promiješan preokretanjem tubica do stvaranja vidljivih niti DNA. Izopropanol je uklonjen centrifugiranjem na 16000 x*g* tijekom 2 min. Preostali talog ispran je sa 600 µl etanola (70%) sobne temperature i odvojen od genomske DNA centrifugiranjem na 16000 x*g* tijekom 2 min. Etanol je pažljivo otpipetiran i višak je uklonjen filter papirom. Zaostali etanol je otparen sušenjem na zraku 10-15 min. Dobivena genomska DNA je rehidrirana u 50 µl rehidracijske otopine (engl. *DNA Rehydration solution*) preko noći na sobnoj temperaturi.

Koncentracija i čistoća izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer P300 (Implen, Njemačka) u Zavodu za opće stočarstvo Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kako bi se dobila radna koncentracija DNA od 20 ng/µl potrebno razrjeđenje je izračunato pomoću formule:

$$c_1V_1 = c_2V_2$$

gdje je:

c_1 – koncentracija izolirane genomske DNA

V_1 – volumen genomske DNA koncentracije c_1

c_2 – radna koncentracija DNA (20 ng/µl)

V_2 – volumen DNA koncentracije c_2

Izolirana DNA je razrijeđena na koncentraciju od 20 ng/µl u rehidracijskoj otopini (engl. *DNA Rehydration solution*, Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, WI, USA).

3.2.2. Genotipizacija vrsta *K. pneumoniae* rep-PCR metodom

Kako bi se smanjio broj izolata za daljnje analize prikupljeni izolati *K. pneumoniae* grupirani su pomoću rep-PCR metode (Domig i sur., 2014) i oligonukleotidne početnice GTG_5 (Švec i sur., 2005). Nukleotidni slijed korištene GTG_5 početnice je 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'. Za grupiranje bakterijskih kultura *K. pneumoniae* rep-PCR metodom pripremljena je

reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl (24 µl reakcijske smjese + 1 µl DNA). U tablici 3.2. prikazani su korišteni reagense, njihove početne i završne koncentracije i volumeni u reakcijskoj smjesi.

Tablica 3.2. Reagenski korišteni za pripremanje reakcijske smjese za rep-PCR

Reagens	**Početna koncentracija**	**Završna koncentracija**	**V [µl]**
DreamTaq Buffer s $MgCl_2$	10x pufer/20 mM $MgCl_2$	1x pufer/2mM $MgCl_2$	2,5
dNTP	10 mM	0,4 mM	1
GTG_5	100 pmol/µl	2 pmol/µl	0,5
DreamTaq polimeraza	5 U/µl	0,08 U/µl	0,4
DNA	20 ng/µl	0,8 ng/µl	1
H_2O			19,6
Ukupan volumen			25

Reakcija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD) pri uvjetima navedenim u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Temperaturni profili rep-PCR reakcije.

Dijelovi PCR reakcije	**Temperatura/vrijeme**	**Ciklusi**
Početna denaturacija	95°C/7 min	x1
Denaturacija	90°C/30 s	x30
Sparivanje početnica	40°C/1 min	
Sinteza komplementarnih lanaca DNA	65°C/8 min	
Završno produljivanje lanca	65°C/16 min	x1

Agaroznom gelu (2%) je dodano 5 µl rep-PCR produkta pomiješanih s 2 µl 6x LD boje i 5 µl molekularnog markera Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific, SAD). Rep-PCR produkti su razdvojeni horizontalnom elektroforezom (Owl A1, Thermo Scientific, SAD) na 90 V kroz 1 sat i 50 min. Nakon horizontalne elektroforeze gel je bojan u otopini etidij bromida koncentracije 0,5 µl/ml kroz 30 minuta i snimljen pomoću uređaja UVIDOC HD6 (Uvitec, Velika Britanija).

Dobiveni rep-PCR obrasci analizirani su uz pomoć programa BioNumerics 7.6.1. (Applied Maths, Belgija). Dice koeficijent korišten je za računanje sličnosti izolata *K. pneumoniae*, a UPGMA algoritam (engl. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) za grupiranje izolata. U konstrukciji dendrograma su korišteni sljedeći parametri: razina tolerancija od 1,0% i optimizacija od 0,5%. Izolati su grupirani na temelju 90% sličnosti. Za daljnje analize odabrani su reprezentativni predstavnici odabranih grupa (n=12).

3.2.3. Određivanje utjecaja ozona na odabrane izolate *Klebsiella spp.*

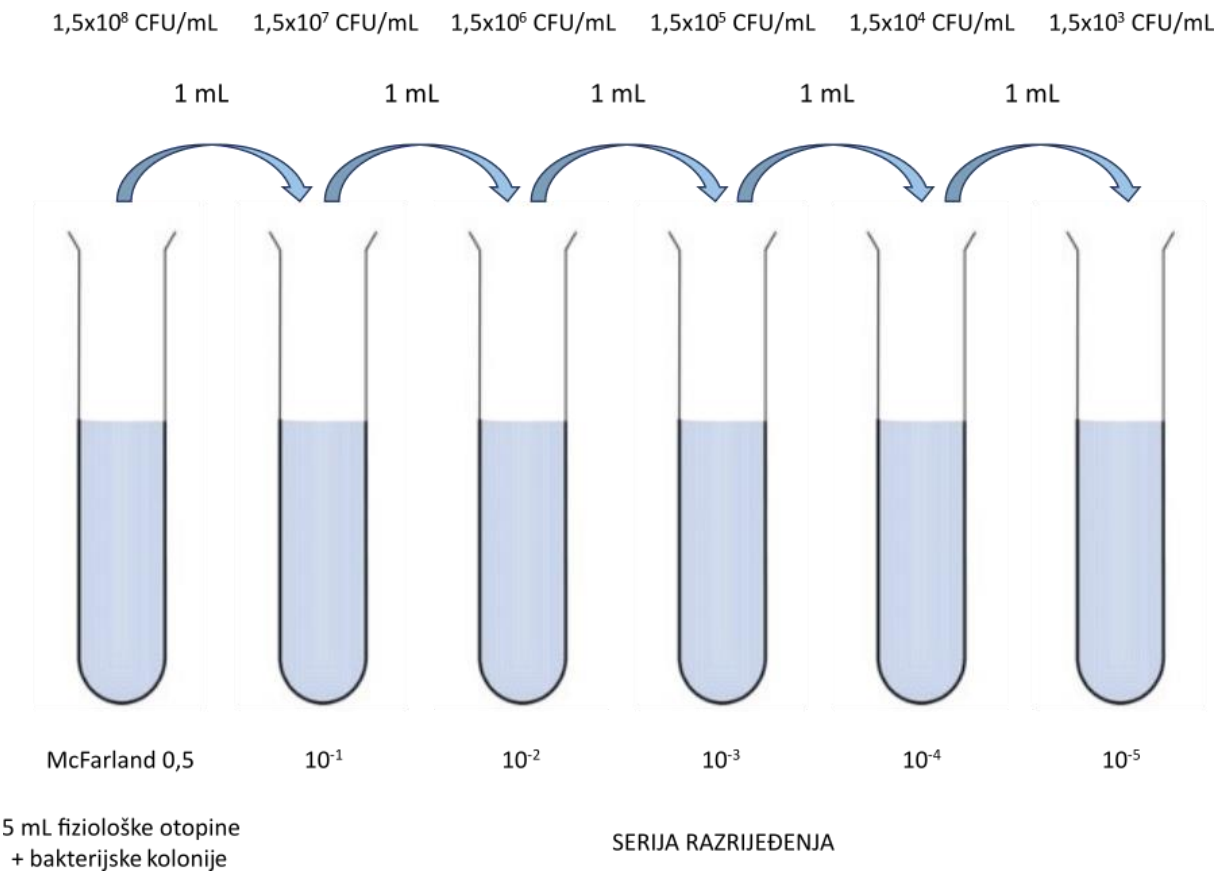
U ovom istraživanju određen je utjecaj dvije različite koncentracije (2 i 4 ppm) ozona otopljenog u vodi i dva načina primjene (u obliku kapljica i maglice) na odabrane izolate *K. pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin (n=12).

3.2.3.1. Otapanje ozona u vodovodnoj vodi

Ozon je otopljen u vodovodnoj vodi pomoću uređaja za otapanje ozona (SIHON, 8 g/L) pri 22 °C. Koncentracija ozona u vodi od 2 ppm, u pravilu je, postignuta unutar 10 min, a 4 ppm unutar 20 min pri 22 °C. Nakon otapanja, postignuta koncentracija ozona u vodi je izmjerena pomoću uređaja DOZ-30 Portable Dissolved Ozone Analyzer (Guangzhou Qili Environmental Equipment Co., Kina).

3.2.3.2. Priprema biomase izolata *K. pneumoniae*

Svi ispitivani izolati iscrpljeni su na krutim LB podlogama do monokulture i inkubirani na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije, pripremljena je biomasa svakog pojedinog izolata koja odgovara koncentraciji bakterija od 1,5 x 10^8 CFU/mL tako da je pojedinačna kolonija dodana u 5 ml sterilne fiziološke otopine do postizanja turbiditeta koji odgovara turbiditetu 0,5 McFarland standarda. Turbiditet je izmjeren pomoću aparata DEN-1 Densitometar (Biosan, Latvija). Nakon toga, pripremljene su radne bakterijske suspenzije koncentracije 1,5 x 10^6 CFU/mL do 1,5 x 10^3 CFU/mL, razrijeđivanjem u sterilnoj fiziološkoj otopini u omjeru 1:10 (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Priprema radnih bakterijskih suspenzija koncentracija 1,5 x 10^6 do 1,5 x 10^3 CFU/mL.

Ukratko, epruvete korištene za serijska razrjeđenja (označene na slici 3.1. 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} i 10^{-5}) prethodno su napunjene sa 9 mL sterilne fiziološke otopine. U epruvetu 10^{-1} dodan je 1 mL McFarland standarda 0,5 nakon čega je sadržaj epruvete dobro homogeniziran vorteksiranjem. Zatim je 1 ml bakterijske suspenzije u epruveti 10^{-1} sterilno prebačen u epruvetu 10^{-2} i homogeniziran vorteksiranjem. Postupak je ponovljen do razrjeđenja 10^{-5}.

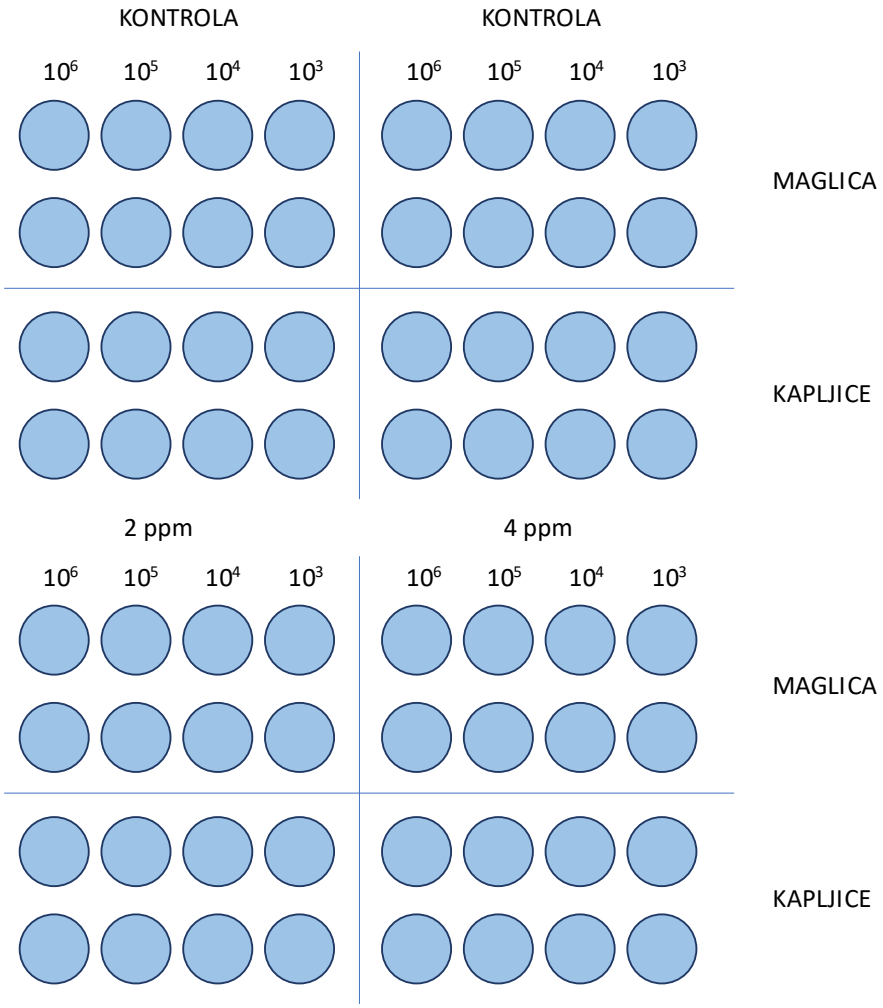
Za određivanje utjecaja ozonirane vode dviju različitih koncentracija, 2 ppm i 4 ppm te različitih načina aplikacije, u obliku maglice i kapljica na izolate *K. pneumoniae* korišten je raspon biomasa 1,5 x 10^6 CFU/mL do 1,5 x 10^3 CFU/mL.

3.2.3.3. Eksperimentalni dizajn

U ovom istraživanju ispitane su sljedeće kombinacije koncentracija i načina aplikacije: 2 ppm/maglica, 4 ppm/maglica, 2 ppm/kapljice i 4 ppm/kapljice.

Na odabranim reprezentativnim izolatima *K. pneumoniae* (n=12, biomasa 1,5 x 10^6 CFU/mL do 1,5 x 10^3 CFU/mL) ispitana je svaka kombinacija koncentracije i načina aplikacije otopljenog ozona u duplikatima.

U sterilne, prethodno označene i prazne Petrijeve zdjelice pipetira se po 1 mL odgovarajuće biomase. Ovako pripremljene bakterijske suspenzije tretirane su ozoniranom vodom (2 ili 4 ppm) pomoću boce s pumpicom (ozon u kapljicama) ili pomoću fogera (ozon u maglici). Kontrole su pripremljene na isti način, ali umjesto ozonirane vode na izolate *K. pneumoniae* aplicirana je sterilna vodovodna voda u obliku kapljica i maglice (Slika 3.2.).



Slika 3.2. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna za ispitivanje utjecaja različitih koncentracija ozona i načina aplikacije na odabrane izolate *K. pneumoniae*. 10^6 do 10^3 označava koncentraciju bakterijskih suspenzija u CFU/mL.

Ozonirana i sterilna vodovodna voda su ostavljene da djeluju na izolate *K. pneumoniae* kroz 5 min, nakon čega su preliveni s 12 mL otopljenog LB agara. Podloge su ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi, te su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 h.

Nakon inkubacije izbrojene su narasle kolonije i izračunat je broj preživjelih bakterija po formuli:

$$\text{Broj preživljelih bakterija [CFU/mL]} = \frac{\text{broj kolonija x faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka [mL]}}$$

Učinkovitost ozona je izražena kao postotak ubijenih bakterija, a izračunata je po formuli:

$$\text{Učinkovitost ozona [\%]} = 100 \text{ x } \left(1 - \frac{\text{broj preživjelih kolonija nakon tretmana [CFU/mL]}}{\text{broj kolonija u kontroli [CFU/mL]}}\right)$$

3.2.4. Statistička analiza

Signifikantne razlike između različitih koncentracija ozona i načina aplikacije određene su dvofaktorskom analizom varijance ANOVA, a srednje vrijednosti višestruko su uspoređene *post hoc* Tukey HSD testom. Razlike su smatrane statistički značajnima ako je $p<0,01$. Svi podaci su analizirani u računalnom programu Microsoft Excel pomoću dodatka Analysis Toolpak.

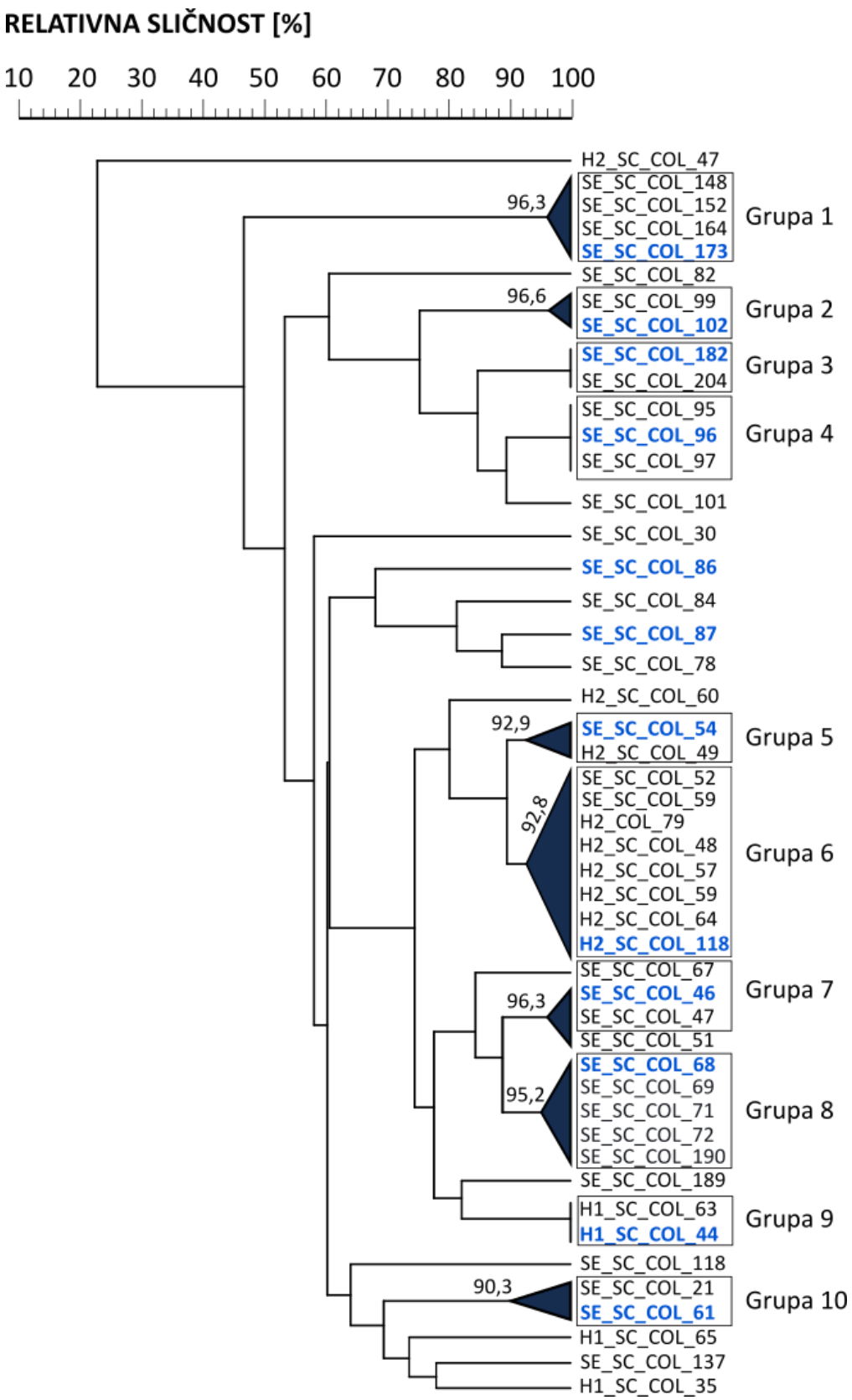
4. Rezultati

4.1. Grupiranje sojeva *K. pneumoniae* rep-PCR metodom

U ovom istraživanju korišteni su sojevi *K. pneumoniae* koji su grupirani na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s GTG_5 početnicom. Na temelju 90% sličnosti ispitivani sojevi grupirani su u 25 grupa. Od toga, samo 10 grupa sadrži više od jednog predstavnika, a u 15 grupa je svrstan samo jedan soj što pokazuje veliku varijabilnost sojeva unutar vrste *K. pneumoniae*.

Po 2 soja *K. pneumoniae* svrstana su u 5 grupa: grupa 2 (96,6% sličnosti), grupe 3 i 9 (100% sličnosti), grupa 5 (92,9% sličnosti) i grupa 10 (90,3% sličnosti). Dvije grupe sadrže 3 soja. Dvije grupe čine 3 soja: grupa 4 (100% sličnosti) i grupa 7 (96,3% sličnosti). Konačno, više od 3 soja sadrže grupa 1 (4 soja 96,3% sličnosti), grupa 8 (5 soja 95,2% sličnosti) i grupa 6 (8 soja 92,8% sličnosti).

Preostale grupe ne prikazuju visoku međusobnu sličnost, već sličnost varira od 22,3 do 89,7% (Slika 4.1.).



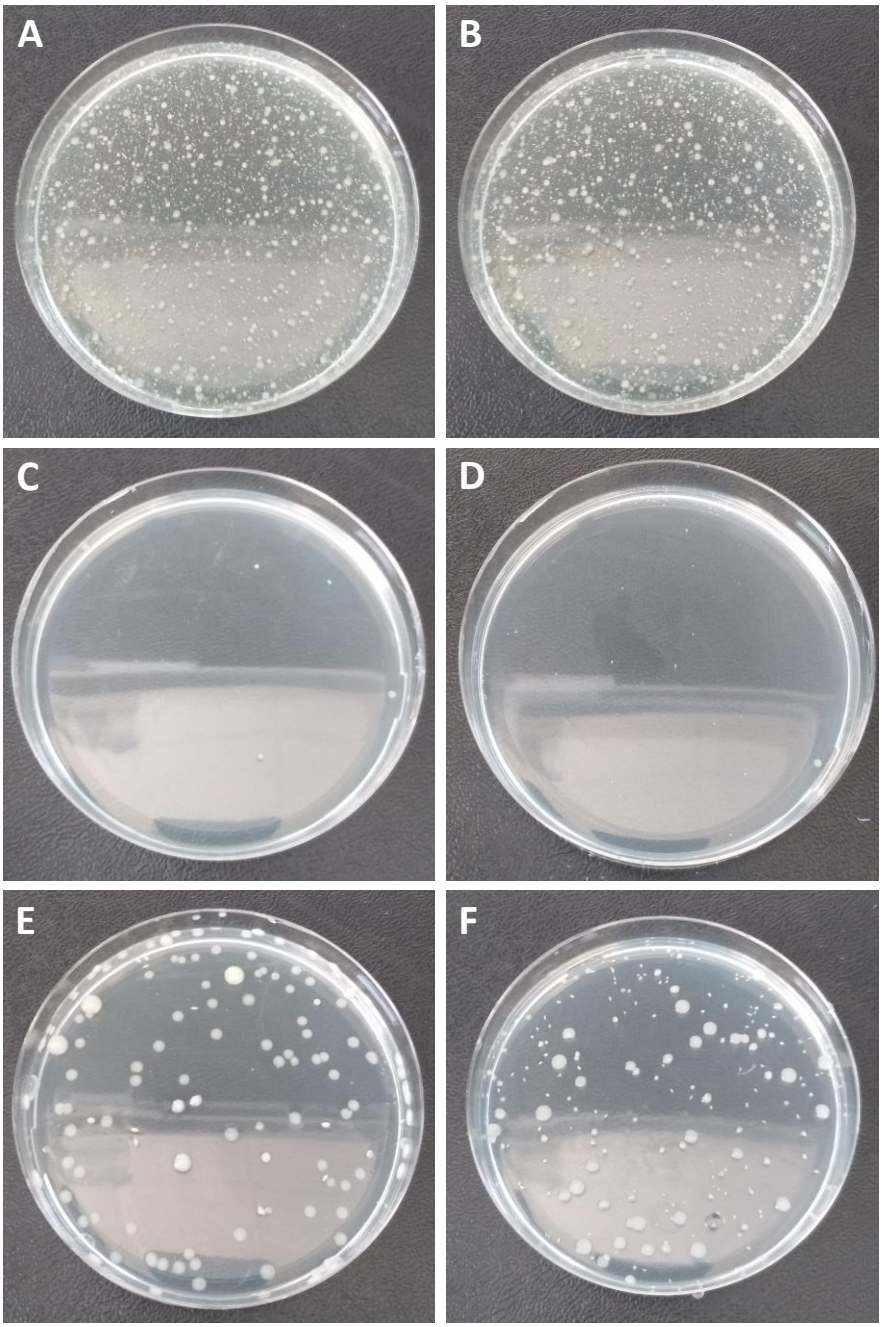
Slika 4.1. Dendrogram sojeva *K. pneumoniae* grupiranih na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s GTG_5 početnicom. Sojevi su grupirani na temelju 90% sličnosti. Velike grupe su uokvirene i označene 1-10, a reprezentativni sojevi su otisnuti deblje i plavo.

Na temelju ovih podataka, za daljnje analize odabran je po jedan reprezentativan soj za 10 najvećih grupa i 2 grupe s jednim sojem (n=12; slika 4.1.).

4.2. Utjecaj različitih načina aplikacije i različitih koncentracija ozona na izolate *Klebsiella pneumoniae*

U ovom istraživanju ispitan je učinak dviju koncentracija ozona otopljenog u vodi (2 i 4 ppm) i 2 načina aplikacije (u obliku kapljica i maglice). Tretmani su izvedeni 5-minutnim vremenom kontakta između ozonirane vode i bakterija.

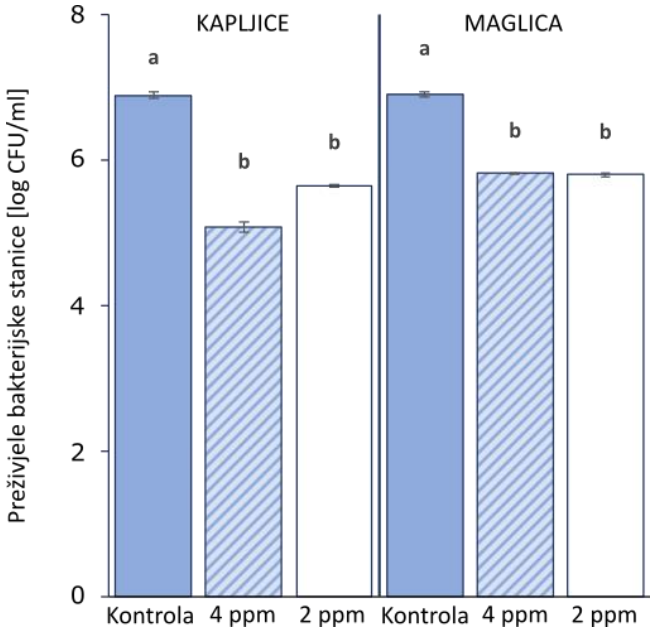
U pravilu, na učinkovitost ozona otopljenog u vodi značajno utječe koncentracija (p<0,01), ali ne i način primjene (p>0,05) (Slika 4.2.). Samo kod 4 reprezentativna soja *K. pneumoniae* (SE_SC_COL_87, SE_SC_COL_102, SE_SC_COL_182, H2_SC_COL_118) je na učinkovitost, uz koncentraciju (p<0,01), značajno utjecao i način primjene (p<0,01).



Slika 4.2. Utjecaj različitih koncentracija ozona i različitih načina aplikacije na primjeru soja *K. pneumoniae* H1_SC_COL_44. A – kontrola/kapljica, B – kontrola/maglica, C – 4 ppm/kapljica, D – 4 ppm/maglica, E – 2 ppm/kapljica; F – 2 ppm/maglica.

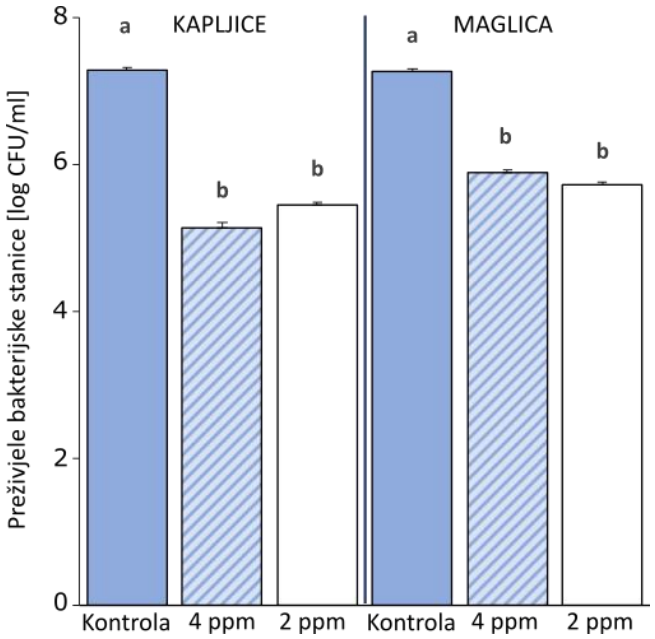
Ozonirana voda je pokazala značajnu imhibitornu aktivnost i efikasno reducirala brojnost sojeva *K. pneumoniae* SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_61, SE_SC_COL_86 i SE_SC_COL_96 (>90%; tablice P1, P3, P5 i P7). Obje koncentracije ozona i oba načina primjene značajno su reducirale brojnost prije navedenih sojeva u odnosu na kontrole, ali nije uočena značajna razlika u redukciji brojnosti bakterija s obzirom na koncentraciju ozona i način aplikacije (grafovi 4.1. – 4.4.).

Kod soja SE_SC_COL_46 tretiranje kapljicama pokazalo je neznačajno veću redukciju u brojnosti, neovisno o koncentraciji ozona, u usporedbi s tretmanom maglicom. Koncentracija ozona 4 ppm u obliku kapljica reducirala je brojnost bakterija za visokih 98,42%, a 2 ppm 94,19%. U obliku maglice redukcija je nešto manja, ali ne značajno, 4 ppm 91,75% te 2 ppm 92,15% (graf 4.1.; tablica P1).



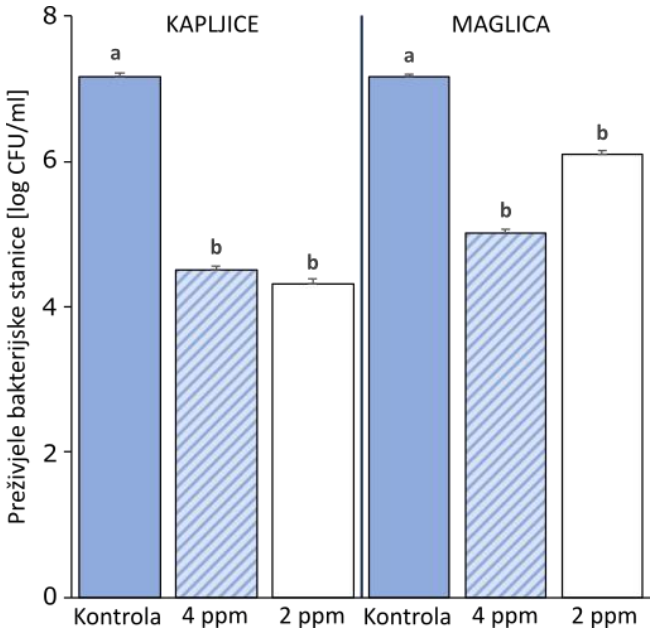
Graf 4.1. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_46 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Velika redukcija u brojnosti postignuta je kod soja SE_SC_COL_61, također u svim kombinacijama aplikacije i koncentracije ozona. Koncentracija ozona 4 ppm u obliku kapljica reducirala je brojnost ovog soja za čak 99,28%, dok je manja koncentracija od 2 ppm reducirala, neznačajno, manji broj bakterija, 98,48%. Ozonirana voda u obliku maglice u većoj koncentraciji (4 ppm) reducirala je 1,26% manje bakterija u odnosu na manju koncentraciju (2 ppm). Kod 4 ppm postignuta je redukcija od 95,86%, a kod 2 ppm 97,12% (graf 4.2.; tablica P3).



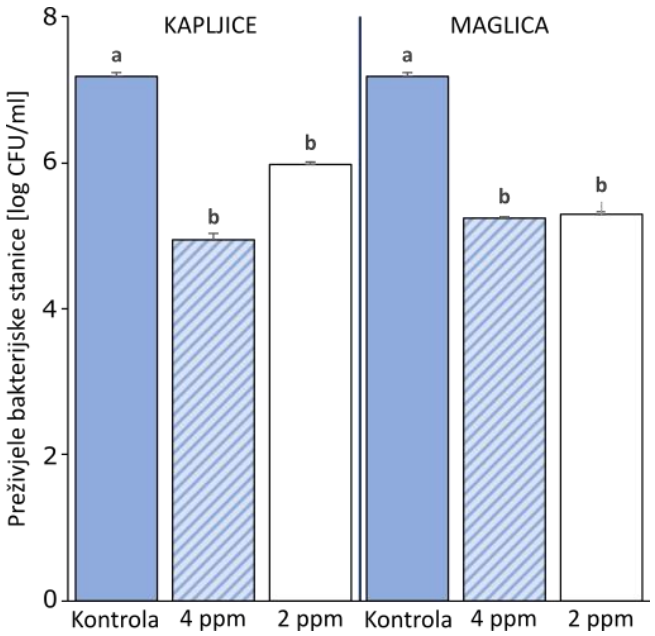
Graf 4.2. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_61 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

SE_SC_COL_86 u tri od četiri kombinacije aplikacije i koncentracije pokazuje redukciju veću od 99%. Kao i kod prethodnih sojeva nije uočena signifikantna razlika u redukciji brojnosti bakterija između svih mogućih kombinacija koncentracije ozona i njihove aplikacije uključujući usporedbu kontrola. Ozon u kapljicama koncentracije 4 ppm reducirale su brojnost SE_SC_COL_86 za 99,97%, a koncentracije 2 ppm za 99,86%. Ozonom koncentracije 4 ppm u obliku maglice postignuta je redukcija od 99,27%, dok je manja koncentracija ozona rezultirala redukcijom brojnosti od 91,41% (graf 4.3.; tablica P5).



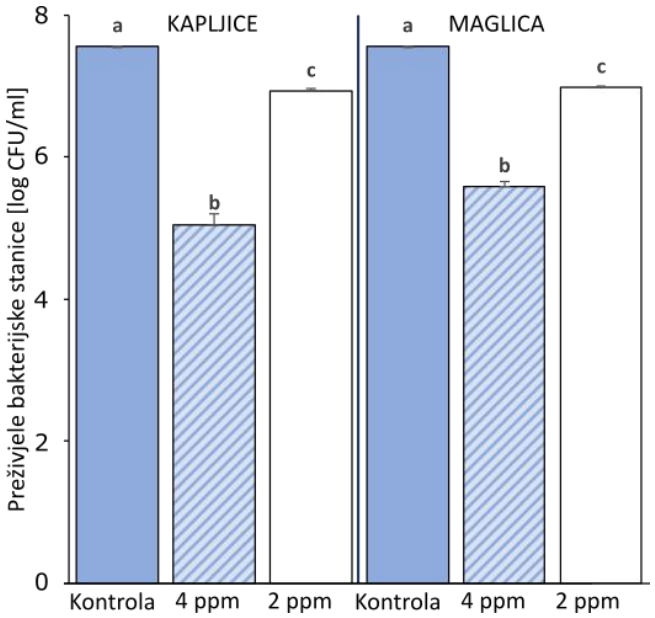
Graf 4.3. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_86 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Značajno inhibitorno djelovanje ozona, u odnosu na kontrolu, uočeno je i kod soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_96. Veća redukcija brojnosti uočena je kod tretmana maglicom u usporedbi s tretmanom kapljicama. Što se tiče koncentracija ozona, pokazalo se da je ozon u koncentraciji od 4 ppm bio djelotvorniji. Tretman kapljicama u koncentraciji od 4 ppm reducirao je broj bakterija za 99,41%, a tretman manjom koncentracijom 93,70%. Drugi korišteni tretman, maglicom, reducirao je 98,86% bakterija pod utjecajem veće koncentracije ozona te 98,71% pod utjecajem koncentracije ozona od 2 ppm (graf 4.4.; tablica P7).



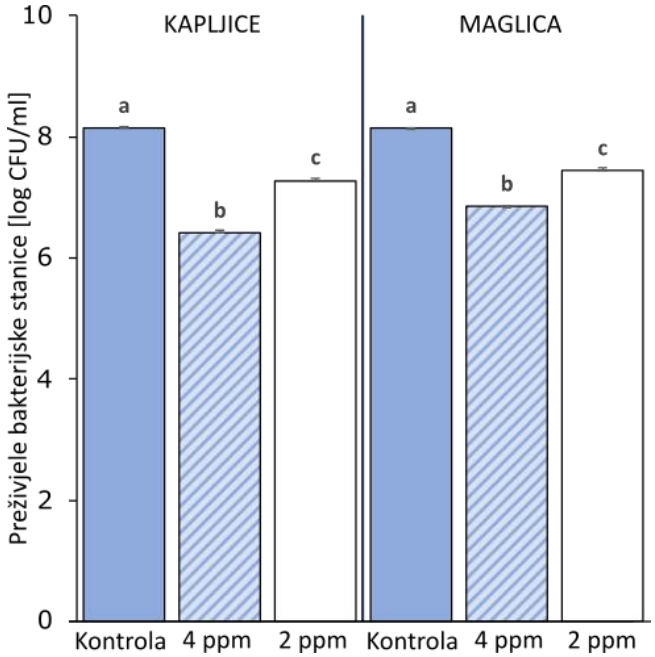
Graf 4.4. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_96 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Inhibitoran učinak na soj *K. pneumoniae* SE_SC_COL_173 značajno ovisi o koncentraciji ozona, a ne o načinu primjene. Redukcija broja bakterija koja je postignuta pri tretmanu kapljicama s 4 ppm ozona iznosi 99,69%, dok je ista koncentracija ozona u obliku maglice reducirala brojnost za 98,93%. Koncentracija ozona od 2 ppm u obliku kapljica djelovala je inhibitorno na 76,16% bakterija te na 73,08% bakterija tretmanom maglice iste koncentracije (graf 4.5.; tablica P9).



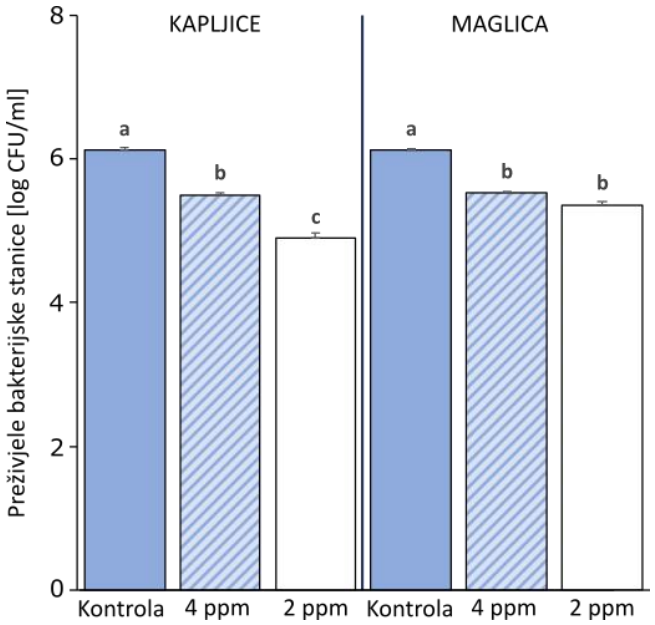
Graf 4.5. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_173 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Identičan slučaj kao kod soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_173 utvrđen je kod soja *K. pneumoniae* H1_SC_COL_44, tj. inhibitoran učinak značajno ovisi o koncentraciji ozona, a ne o načinu primjene. Tretmanom kapljicama ozoniranih na 4 ppm postignuta je redukcija brojnosti od 98,15%, a maglicom iste koncentracije 95,00% redukcija broja bakterija. Druga korištena koncentracija (2 ppm) bakteriocidno je djelovala na 86,34% bakterija tretiranih kapljicama te 80,20% bakterija tretiranih maglicom (graf 4.6.; tablica P12).



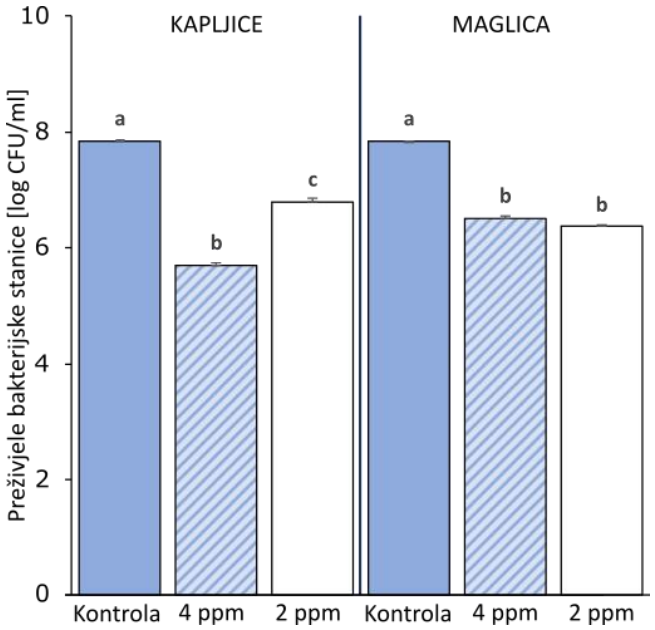
Graf 4.6. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* H1_SC_COL_44 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Kod soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_87 baktericidan učinak pri višoj koncentraciji (4 ppm) ne ovisi o načinu primjene, dok pri nižoj koncentraciji (2 ppm) bakteriocidnom učinku značajno pridonosi i način aplikacije. Ozon u obliku kapljica koncentracije 4 ppm bakteriocidno je djelovalo na 76,38% bakterija, a u koncentraciji 2 ppm na 94,12% bakterija. Tretman maglicom ozoniranom na 4 ppm pokazao je redukciju brojnosti od 75,00%, a isti tretman manjom koncentracijom (2 ppm) neznačajno više (82,67%) (graf 4.7.; tablica P6).



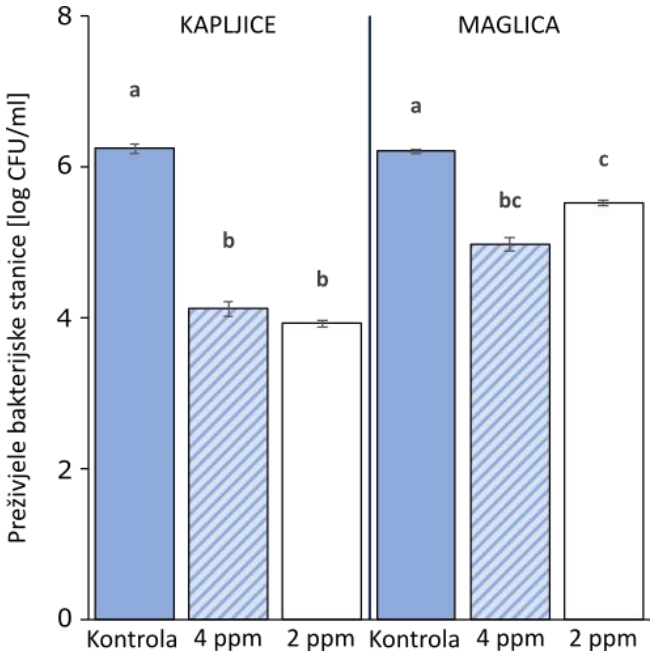
Graf 4.7. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_87 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Tretiranje soja *K. pneumoniae* H2_SC_COL_118 ozoniranom vodom različitih koncentracija i načina primjene pokazao je isti trend kao i soj SE_SC_COL_87 tj. baktericidan učinak pri višoj koncentraciji (4 ppm) ne ovisi o načinu primjene, a pri nižoj koncentraciji (2 ppm), uz koncentraciju, ovisi i o načinu aplikacije. Tretiranje kapljicama koncentracije ozona 4 ppm djelovalo je bakteriocidno na 99,28% bakterija, a tretman maglicom iste koncentracije na 95,37%. Tretman kapljicama koncentracije ozona 2 ppm djelovao je značajno manje bakteriocidno od svih ostalih ispitanih tretmana i rezultirao redukcijom brojnosti od 90,97%, dok je istom koncentracijom ozona u obliku maglice postignuta redukcija broja bakterija od 96,58% (graf 4.8.; tablica P11).



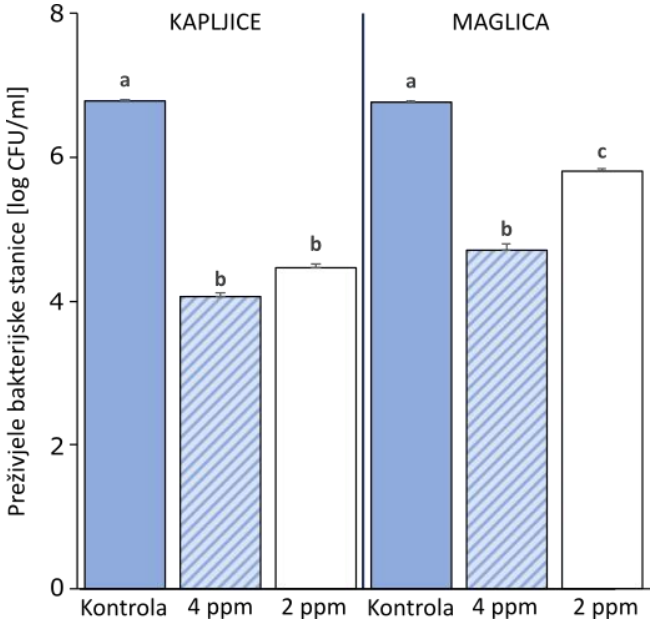
Graf 4.8. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* H2_SC_COL_118 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Brojnost soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_54 je značajno reducirana svim kombinacijama tretmana ozonom u usporedbi s kontrolama. Značajna redukcija brojnosti soja SE_SC_COL_54 tretiranog koncentracijom ozona od 4 ppm ne ovisi o načinu aplikacije. Tretmana ozonom koncentracije 2 ppm u obliku maglice pokazuje značajno manje bakteriocidno djelovanje u odnosu na ostale tretmane. Tretman kapljicama ozoniranih na 4 ppm reducirao je brojnost bakterija za 99,23%, a pri koncentraciji od 2 ppm za 99,52%. Maglica ozonirana na 4 ppm je djelovala bakteriocidno na 94,04% bakterija, a ozonirana na 2 ppm 79,07% bakterija (graf 4.9.; tablica P2).



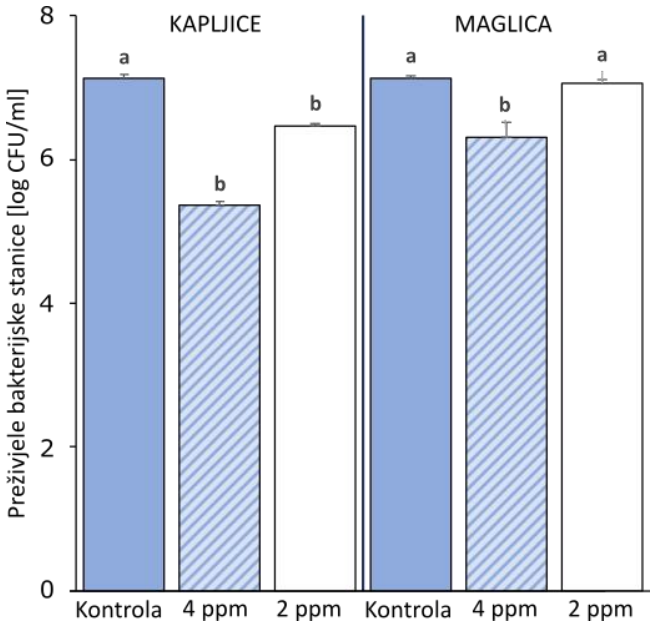
Graf 4.9. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_54 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Signifikantna redukcija brojnosti soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_68 u usporedbi s kontrolama uočena je kod svih tretmana. S iznimkom tretmana ozonom koncentracije 2 ppm u obliku maglice koji pokazuje značajno manje bakteriocidno djelovanje, ostali tretmanima pokazuju isto djelovanje. Svi tretmani, osim 2 ppm u obliku maglice (88,86%), postignuli su redukciju brojnosti veću od 99%. Shodno tome, tretman maglicom ozoniranom na 4 ppm reducirao brojnost bakterija za 99,13%, a tretmani kapljicama za 99,81% (4 ppm) i 99,52% (2 ppm) (graf 4.10.; tablica P4).



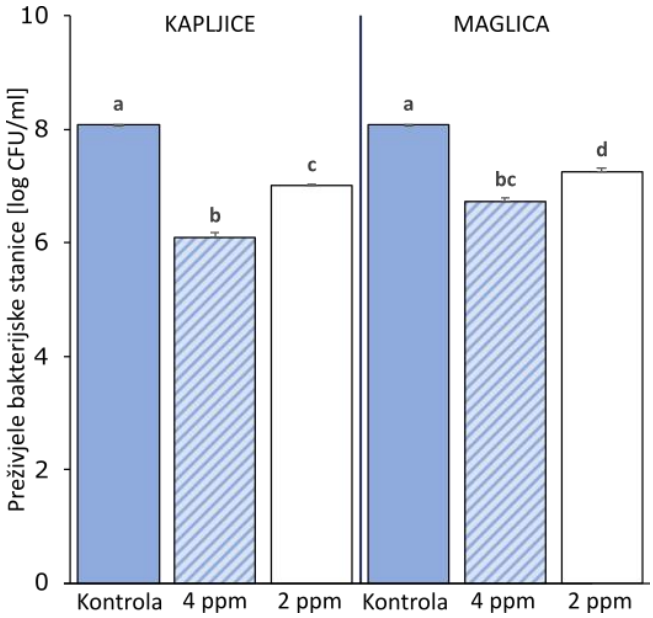
Graf 4.10. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_68 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

U pravilu, soj *K. pneumoniae* SE_SC_COL_102 je osjetljiv na djelovanje ozona. Tretmani ozonom koncentracije 4 ppm u obliku kapljice i maglice te 2 ppm u obliku kapljice pokazali su značajno bakteriocidno djelovanje. Iznimno, tretman ozonom koncentracije 2 ppm u obliku maglice je najmanje smanjio brojnosti ispitivanog soja, svega za 17,02%, što nije značajno različito od samih kontrola. Između preostalih tretmana nije uočena značajna razlika te je tretman kapljicama djelovao bakteriocidno na 98,29% (4 ppm) te 78,19% (2 ppm) bakterija. Preostali tretman maglicom u koncentraciji od 4 ppm je djelovao bakteriocidno na 85,47% bakterija (graf 4.11.; tablica P8).



Graf 4.11. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_102 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

Graf 4.12. prikazuje redukciju brojnosti soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_182. Redukcija brojnosti soja SE_SC_COL_182 ovisi o koncentraciji i načinu aplikacije ozona. Pa tako, bakteriocidan učinak značajno ovisi o načinu aplikacije samo kod koncentracije ozona od 2 ppm. Ozon koncentracije 4 ppm u obliku kapljice reducira brojnost soja SE_SC_COL_182 za 98,94%, a u obliku maglice za 95,44%. Ozon koncentracije 2 ppm, bez obzira na način aplikacije, pokazuje nešto slabije bakteriocidno djelovanje u odnosu na 4 ppm. U obliku kapljice ubija 95,44% bakterija, dok u obliku maglice pokazuje najslabije djelovanje i reducira tek 84,67% bakterija (tablica P10).



Graf 4.12. Preživljavanje soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_182 nakon tretmana ozonom otopljenim u vodi (4 i 2 ppm) u obliku kapljice i maglice.

5. Rasprava

Eksperimentalne studije dokazale su djelotvornost ozonirane vode kao antimikrobnog sredstva. Ova značajka povezana je s njegovim snažnim oksidacijskim djelovanjem koje proizlazi iz procesa razgradnje s oslobađanjem slobodnih radikala sposobnih za inaktivaciju bakterija, gljivica, virusa i praživotinja (Wood i sur., 2020; Akbar i sur., 2020; Porto i sur., 2019; Jiang i sur., 2019; Megahed i sur., 2018; Fontes i sur., 2012). S obzirom na potrebu za novim strategijama za kontrolu patogenih mikroorganizama, naročito multirezistentnih bakterija ili koronavirusa, upotreba sredstava za dezinfekciju, kao što je ozonirana voda, može se smatrati poželjnom i opće prihvaćenom strategijom (Wood i sur., 2020).

U ovom istraživanju antimikrobna djelotvornost ozonirane vode, generirane u obliku kapljica i maglice u koncentracijama od 2 ppm i 4 ppm, procijenjena je na 12 karabapenem i kolistin rezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* podrijetlom iz otpadnih voda. Rezultati su pokazali izuzetno visoku djelotvornost ozonirane vode kao antimikrobnog sredstva na izolate *Klebsiella pneumoniae.* Apsolutni broj bakterija *K. pneumoniae* statistički je smanjen u odnosu na kontrolu i iznosi 98,15-99,81% za ozon apliciran u obliku kapljica u koncentraciji od 4 ppm te od 13,02-98,70% za 2 ppm ozona primijenjenog u obliku maglice. Najbolja djelotvornost ozonirane vode bila je vidljiva kod izolata SE_SC_COL_61. Redukcija brojnosti ovog izolata prilikom svakog od 4 tretmana iznosila je više od 95%. Prema tome, neovisno o obliku ozonirane vode i koncentraciji ozona postiže se izuzetno visoko antimikrobno djelovanje prema pojedinim izolatima *Klebsiella pneumoniae.* Slični rezultati zamijećeni su i kod ostalih izolata uključujući sojeve SE_SC_COL 61, SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_86 i SE_SC_COL_96. Kod nekih sojeva *K. pneumoniae* preživio je znatno veći broj bakterija, ovisno o primjenjivanom tretmanu. Najveće odskakanje od prosječnih rezultata detektirano je za izolat SE_SC_COL_102 s obzirom na to da je ozonirana voda koncentracije 2 ppm u obliku maglice, reducirala samo 17,02% ovih bakterija što znači da je velik postotak ovih sojeva preživjelo tretman ozonom u navedenoj koncentraciji. U ovom istraživanju učinkovitost inaktivacije mikroorganizama primjenom veće (4 ppm) i manje (2 ppm) koncentracije ozona bila je izuzetno velika u oba slučaja. Međutim, prosječno bolje rezultate pokazala je voda zasićena većom koncentracijom ozona prilikom aplikacije iste u obliku maglice i kapljica. Načini aplikacije vode zasićene ozonom također su utjecali na udio reduciranih bakterija. Tako je prema prosječnim rezultatima bolju redukciju pokazao tretman aplikacije ozonirane vode u obliku kapljica.

Ozonirana voda može se primijeniti tijekom operativnog liječenja kako bi se zaštitilo tkivo od infekcija uzrokovanih patogenim bakterijama (Bialoszewski i sur., 2010). Osim za redukciju broja multirezisitenih *K. pneumoniae* dokazanog u ovom istraživanju, ozon je značajno smanjio brojnost i drugih patogenih bakterija poput *Enterococcus faecalis* i *Streptococcus mutans* (Nagayoshi i sur., 2004). Nagayoshi i sur. (2004) su također dokazali da ozonirana voda ima istu antimikrobnu aktivnost u kombinaciji s ultrazvukom, kao i tretman s 2,5% NaOCl. Međutim, Hems i sur. (2005) su zaključili da je sposobnost ozona da inaktivira soj *E. faecalis* puno slabija u usporedbi s učinkovitošću NaOCl-a.

U preliminarnom istraživanju Doroszkiewicz i sur. (1994) istraženo je djelovanje ozona na sojeve *Acinetobacter anitratus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultati su pokazali smanjenje broja bakterija kao odgovor na povećanu izloženost sojeva ozonu, no postojale su razlike u osjetljivosti bakterija na ozon što je dokazano i kod *K. pneumoniae*. Optimalno vrijeme

ozoniranja kako bi se postigao učinak inaktivacije 90% bakterija kod *A. anitratus* iznosi 10 minuta te kod *P. aeruginosa* 7 minuta. Za postizanje istog učinka u ovom istraživanju, *K. pneumoniae* je bila izložena ozonu u trajanju od 5 minuta što dokazuje veću osjetljivost *K. pneumoniae* u odnosu na Gram-negativne bakterije korištene u istraživanju Doroszkiewicz i sur. (1994).

Nadalje, Yaflez i sur. (2016) potvrđuju antimikrobnu aktivnost ozona na primjeru *Helicobacter pylori*. Usporedbom tretmana ozonom i tretmana klorom u vodenoj otopini, ozon je učinkovitije reducirao ove bakterije što bi moglo pomoći u smanjenju visoke stope infekcija uzrokovanih *H. pylori.* Rezultati Yaflez i sur. (2016) posebno su primjenjivi u zemljama u razvoju gdje je više od 80% odrasle populacije inficirano ispitivanom bakterijom.

Ozon pokazuje izuzetno snažno antimikrobno djelovanje protiv većine bakterija, gljivica i virusa te stoga ima izuzetan potencijal primjene u različitim granama industrije. Velik potencijal pokazuje u prehrambenoj industriji gdje velik problem predstavlja bakterija *Salmonella enteritidis.* Niske koncentracije ozona (1,51 ppm) učinkovite su za inaktivaciju *S. enteritidis* u stacionarnoj fazi rasta (Dave i sur., 1998). Stoga se ozon potencijalno može koristiti u preradi hrane s ciljem inaktivacije *S. enteritidis.*

6. Zaključak

- Multirezistentni sojevi *Klebsiella pneumoniae*, naročito oni otporni na karbapeneme i kolistin, koji se koriste kao antibiotici posljednje linije obrane u liječenju infekcija izazvanih ovim bakterijama, predstavljaju veliki javno-zdravstveni problem svuda u svijetu.
- Na temelju analize obrazaca dobivenih rep-PCR-om utvrđena je značajna unutar vrsna varijabilnost izolata *K. pneumoniae* izoliranih iz otpadnih voda te su selektirani reprezentativni sojevi (n=12) za daljnju analizu.
- Ozon otopljen u vodi apliciran je u dvije koncentracije (4 i 2 ppm) te u obliku kapljica i maglice, a u svrhu redukcije broja multirezistentnih sojeva *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme i kolistin.
- Ozonirana voda pokazala je značajnu antimikrobnu aktivnost. Kod sojeva *K. pneumoniae* SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_61, SE_SC_COL_86 i SE_SC_COL_96 postignuta je redukcija u brojnosti veća od 90%.
- Obje koncentracije ozona i oba načina primjene značajno su reducirale brojnost multirezistentnih sojeva *K. pneumoniae.* Kod 4 soja *K. pneumoniae,* SE_SC_COL_87, SE_SC_COL_102, SE_SC_COL_182 i H1_SC_COL_44, na učinkovitost je značajno utjecala koncentracija apliciranog ozona zajedno s načinom primjene (kapljice ili maglica).
- Učinkovitost inaktivacije mikroorganizama primjenom veće i manje koncentracije ozona bila je izuzetno velika u oba slučaja. Prosječno bolje rezultate pokazala je voda zasićena većom koncentracijom (4 ppm) ozona bez obzira na način primjene (maglica ili kapljice).
- Bolju redukciju pokazao je način primjene vode zasićene ozonom aplicirane u obliku kapljica.
- Ozon u koncentraciji od 4 ppm apliciran u obliku kapljica se pokazao kao najefikasniji u suzbijanju rasta sojeva *K. pneumoniae*. Stopa preživljavanja reprezentativnih sojeva tretiranih koncentracijom ozona od 4 ppm u obliku kapljica iznosila je 0,19 do 1,85%.
- Manja koncentracija ozona (2 ppm) apliciranog u obliku maglice pokazala se najmanje efikasnom i vrlo varijabilnom, sa stopom preživljavanja testnih sojeva od 1,30 do 86,98%.

7. Popis literature

1. Akbar, A., Medina, A., Magan, N. (2020) Potential Control of Mycotoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Stored Coffee Using Gaseous Ozone Treatment. Microorganisms 2020, 8, 1462.

2. Akturk, H., Sutcu, M., Somer, A., Aydin, D., Cihan, R., Ozdemir, A., Coban, A., Ince, Z., Citak, A., Salman, N. (2016) Carbapenem - resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. Brazillian Journal of Infectious Diseases 20 (2), 134-140.

3. Alekshun, M.N., Levy, B.S. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 128 (6), 1037-1050.

4. Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, S.P. (2000) Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. Antimicrobial agents and chemotherapy 44 (7), 1818-1824.

5. Andersson, D.I. (2006) The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Current Opinion in Microbiology. Volume 9, Issue 5, Pages 461-465.

6. Andrašević, A. T., Lucić, S., Tambić, T. (2018) Rezistencija na antibiotike u Hrvatskoj. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb. Vol.54, No.3, p. 312-321.

7. Andrašević, S., Vranić-Ladavac, M., Pristaš, I., Škerk, V. (2009) Uzročnici infekcija mokraćnog sustava I njihova osjetljivost na antibiotike. Infektološki glasnik, Vol. 29 No. 4, p. 165-170.

8. Antoszewski, Z., Madej, P. (1997): Ozonoterapia i jej zastosowanie w medycynie. Wyd. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała.

9. Antoszewski, Z., Skalski, J.H., Skalska, A. (2004): Tlen, niektóre inne gazy oddechowe i wolne rodniki tlenowe w medycynie. Wyd. Nauk. Śląsk, Katowice.

10. Azarpazhooh, A., Limback, H. (2008) The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. 36(2): 104-16.

11. Bagley, S.T., Seidler, R.J., Talbot, H.W.J., Morrow, J.E. (1978) Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. Applied Environment Microbiology 36:17.

12. Bhagirath, A.Y., Li, Y., Patidar, R. , Yerex, K., Ma, X., Kumar A., Duan, K. (2019) Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens. International Journal of Molecular Sciences.

13. Bialoszewski, D., Bocian, E., Bukowska, B., Czajkowska, M., Sokol-Leszczynska B., Tyski S. (2010) Antimicrobial activity of ozonated water. Department od Physiotheraphy, 2nd Medicial Faculty, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland. 16(9):MT71-5.

14. Bilić, B. (2015) Kolistin: stari lijek za liječenje novih multiplorezistentnih bakterija. Infektološki glasnik, Vol.35 No. 4, p. 117-127.

15. Brenner, D.J., Farmer, J.J. (2015) *Enterobacteriaceae.* Bergey's manual od systematics of archaea and bacteria, p. 1-24.

16. Broadwater, W. T., R. C. Hoehn, and F. H. King. 1973. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. Appl. Microbiol. 26:391–393.

17. Broadwater, W.T., Hoehn, R.C., King, P.H. (1973) Sensitivity of Three Selected Bacterial Species to Ozone. U.S. Army Academy of Health Sciences, Fort Sam Houston, Texas 78234, and DeDartment of Civil Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061. p. 391-393.

18. Brodowska, A. J., Śmigielski, K., Nowak, A., Brodowska, K., Catthoor, R., Czyżowska, A. (2014): The impact of ozone treatment on changes in biologically active substances of cardamom seeds. Journal of Food Sci. 79 (9): C1649-1655.

19. Bubonja-Šonje, M., Abram, M. (2014) Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. Medicina fluminensis 2014, Vol. 50, No.2, p. 128-149

20. Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V.M., Piazza, A., Bitar, I., De Cicco, M., Paolucci, S., Pilla, G., Migliavacca, R., Pagani, L. (2017) Occurrence od extended spectrum B-lactamases, KPC-type and MCR-1.2-producing *Enterobacteriaceae* from wells, river water and wastewater treatment plants in Oltrepo Pavese area. Frontiers in microbiology 8, 2232.

21. Campayo, A., Savoi, S., Romieu, C., Lopez-Jimenez, A.J., de la Hoz, K.S., Salinas, M.R., Torregrosa, L.,Alonso, G.L. (2021) The application of ozonated water rearranges the Vitis vinifera L. leaf and berry transcriptomes eliciting defence and antioxidant responses. Scientific Reports volume 11, Article number: 8114.

22. Campos, M.A,,Vargas M.A., Regueiro, V., Llompart, C.M., Alberti, S., Bengoechea, J.A. (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun72:7107–7114.

23. Cano,V. , March,C., Insua,J.L., Aguiló, N., Llobet, E., Moranta, D., Regueiro, V., Brennan, G. P., Millán-Lou, M.I., Martín, C., Garmendia, J., Bengoechea, J.A. (2015) Klebsiella pneumoniae survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. Cellular Microbiology, p. 1537-1560.

24. Casewell, M., Phillips, I. (1978) Food as a source of *Klebsiella* species for colonization and infection of intensive care patients. Journal of Clinical Pathology 31 (9), 845-849.

25. Chang-Ro, L., Jung Hun, L., , Kwang Seung, P., , Jeong Ho, J., Young Bae, K., Chang-Jun, C., Byeong Chul, J.,Sang Hee, L. (2017) Antimicrobial Resistance of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7: 483

26. Chawla, A.S. (2006) Application of ozonated water technology for improving quality and safety of peeled shrimp meat. LSU Master's Theses. 1535.

27. Dave, S., Kim, J.G., Lou, Y., Yousef, A.E. (1998) Kinetics of inactivation of *Salmonella enteritidis* by ozone. Dept. Of Food Science And Technology, The Ohio State University, 2121 Fyffe Road, Vivian Hall, Columbus, Ohio 43210, USA.

28. Davies, J., Davies, D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, p. 417–433.

29. Davis, T.J., Matsen, J.M. (1974) Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. J. infect. Dis. 130, p. 402-405.

30. De Majumdar , S., Yu, J., Fookes, M. et al.(2015) Elucidation of the RamA regulon in Klebsiella pneumoniae reveals a role in LPS regulation. PLoS Pathog 2015;11:e1004627.

31. De Majumdar, S., Yu, J., Fookes, M., McAteer, S.P., Llobet, E., Finn, S., Spence, S., Monahan, A., Kissenpfennig , A., Ingram, R.J., Bengoechea, J., Gally, D.L., Fanning, S., Elborn, J.S., and Schneiders, T. (2015) Elucidation of the RamA regulon in Klebsiella pneumoniae reveals a role in LPS regulation. PLoS Pathog11:e1004627.

32. Depardieu,F.,Podglajen,I., Leclercq,R., Collatz,E., Courvalin, P. (2007) Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin. Microbiol. Rev. 20:79–114.

33. Domig, K.J., Kiss, H., Petricevic, L., Viernstein, H., Unger, F., Kneifel, W. (2014) Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. Benef. Microbes. 5(3): 263-272.

34. Doroszkiewicz, W., Sikorska, I., Jankowski, S. (1994) Studies on the influence of ozone on complement-mediated killing of bacteria. FEMS Immunology and Medicinal Microbiology. Institute of Microbiology, Wroctaw University, 51-148 Wroctaw, Poland, at:d b Department of Microbiology, Academy of Medicine, Wroctaw, Poland. p. 281-286.

35. Dos Santos, L.M.C., de Silva, E.S., Oliveira, F.O., de Alencar Pereira Rodrigues, L., Neves P.R.F., Meira, C.S., Moreira, G.A.F., Lobato, G.M., Nascimento, C., Gerhardt, M., Lessa, A.S., Mascarenhas, L.A., Machado, B.A.S. (2021) Ozonized Water in Microbial Control: Analysis of the Stability, In Vitro Biocidal Potential, and Cytotoxicity. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. Biology 2021, 10, 525.

36. Dujmić Ilić, M. (2015) Rezistencija bakterijskih sojeva *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* izoliranih iz uzoraka urina na beta-laktamske antibiotike. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet.

37. Duvančić, T. (2019) Mehanizmi rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae.* Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

38. Emerson, M. A., Sproul, O.J., Buck, C.E. (1982): Ozone inactivation of cell-associated viruses. Appl. Environ. Microbiol. 43, 603–608

39. Emerson, M. A., Sproul, O.J., Buck, C.E. (1982): Ozone inactivation of cell-associated viruses. Appl. Environ. Microbiol. 43, 603–608.

40. Estrela, C., Estrela, C.R.A., Decurcio, D.A., Hollanda, A.C.B., Silva, J.A. (2006) Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. Department od Endodontics, Federal University of Goias, Goiania, GO, Brazil. International Endodontic Journal, 40, p. 85-93.

41. Flores, P., Hernandez, V., Fenoll, J., Hellin, P. (2019) Pre-harvest application of ozonated water on broccoli crops: Effect on head quality. Volume 83.

42. Fontes, B., Heimbecker, A.M.C., Brito, G.D.S., Costa, S.F., van der Heijden, I.M.;,Levin, A.S., Rasslan, S. (2012)Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. BMC Infect. Dis. 2012, 12, 358.

43. Freitas-Silva, O., Venancio, A. (2010): Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. Drug Metab Rev. 42(4): 612–620.

44. Fresno, S., Jimenez, N., Izquierdo, L., Merino, S., Corsaro, M.M., De Castro, C., Parrilli, M., Naldi, T., Regue, M., Tomas, J.M. (2006) The ionic interaction of Klebsiella pneumoniae K2 capsule and core lipopolysaccharide. Microbiology152:1807–1818.

45. Gillings, M.R., Holley,M.P., Stokes, H.W. (2009) Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. Department of Biological Sciences, Macquarie University, Sydney.

46. Giske, C.G., Monnet, D.L., Cars, O., Carmeli, Y. (2008) Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. Antimicrobial agents and chemotherapy 52 (3), 813-821.

47. Greene, A.K., Güzel-Seydim, Z.B., Seydim, A.C. (2012): Chemical and physical properties of ozone. Ozone in food processing. pp. 19-32.

48. Hems, R.S., Gulabivala, K., Ng, Y-L., Ready, D., Spratt, D.A. (2005) An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of Enterococcus faecalis. International Endodontic Journal 38, 22–9.

49. Hogberg, L.D., Heddini, A., Cars, O. (2010) The global need for effective antibiotics:challenges and recent advances. Trends in pharmacological sciences 31 (11), 509-515.

50. Jiang, H.J., Chen, N., Shen, Z.Q., Yin, J., Qiu, Z.G., Miao, J., Yang, Z.W., Shi, D.Y., Wang, H.R., Wang, X.W., et al. I (2019) nactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. Biomed. Environ. Sci. 2019, 32, 324–333.

51. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2011a) Biotransformacija lijeka. U: Trkulja V, Klarica M, Šalković-Petrišić M (Ur.) Temeljna i klinička farmakologija, jedanaesto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, str. 53-66.

52. Khadre, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.G. (2001) Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. Journal of Food Science. 66(9): 1242-1252.

53. Kim, I., Tanaka, H. (2010) Use od Ozone-Based Processes for the Removal of Pharmaceuticals Detected in a Wastewater Treatment Plant. Water Environment Research 82 (4), p. 294-301

54. Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S. (1999): Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. Journal of food protection. 62(9), 1071- 1087.

55. Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R. (1990): Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on Cryptosporidium parvum oocyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1423–1428.

56. Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R. (1990): Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on Cryptosporidium parvum oocyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1423–1428.

57. LAWRENCE RESTAINO,1 * ELON W. FRAMPTON,1 JENIFER B. HEMPHILL,1 AND PAUL PALNIKAR2 Efficacy of Ozonated Water against Various Food-Related Microorganisms (1995) R & F Laboratories, Inc., Bridgeview, Illinois,1 and Apex Associates, Southfield, Michigan2

58. Lee C. R., Lee J. H., Park K. S., Kim Y. B., Jeong B. C., Lee S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Front. Microbiol. 7:895. 10.3389/fmicb.2016.00895.

59. Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 12, 371–387.

60. Li W., Sun G., Yu Y., Li N., Chen M., Jin R., et al. . (2014b). Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Clin. Infect. Dis. 58, 225–232. 10.1093/cid/cit67

61. Livermore, D.M., Woodford, N. (2006) The B-lactamase threat in *Enterobacteriaceae, Pseudomonas* and *Acinetobacter.* Trends in Microbiology, p. 413-420.

62. Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K.M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C.G., Fernández-Carrasco, H., Insua, J.L., Salminen, T.A., Garmendia, J., Bengoechea, J.A. (2015) Deciphering tissue-induced Klebsiella pneumoniae lipid A structure. 112 (46) E6369-E6378.

63. Llobet, E., Tomas, J.M., Bengoechea, J.A. (2008) Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiology154:3877–3886.

64. Longstreth, J., de Gruijl, F.R., Kripke , M.L., Abseck, S., Arnold, F.,Slaper, H.I., Velders, G., Takizawa, Y., van der Leun, J.C. (1998) Health risks. Journal od Photochemistry and Photobiology B: Biology. Volume 46, Issues 1-3, pages 20-39.

65. M. Arita, M. Nagayoshi, T. Fukuizumi, T. Okinaga, S. Masumi, M. Morikawa, Y. Kakinoki, T. Nishihara (2005) Microbicidal efficacy of ozonated water against Candida albicans adhering to acrylic denture plates. Department of Oral Microbiology, Kyushu Dental College, 2-6-1 Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu 803–8580, Japan

66. Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Curr. Trends Microbiol. 2001, 9, 34–39.

67. March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J.M., Suárez, T., Garmendia, J., Bengoechea, J.A. (2013) Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of Klebsiella pneumoniae with Phagocytes. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056847.

68. Marshall, B. M., Ochieng, D. J., Levy, S. B. (2009) Commensals: unappreciated reservoir of antibiotic resistance. Microbe 4:231–238.

69. Megahed, A., Aldridge, B., Lowe, J. (2018) The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. PLoS ONE 2018, 13, e0196555.

70. Moore McClurkin, J., Maier, D. (2010) Half-life time of ozone as a function of air conditions and movement.

71. Murphy, C.N., Mortensen, M.S., Krogfelt, K.A., Clegg, S. (2013) Role of Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. Infection and immunity 81 (8), 3009-3017.

72. Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T., Terashita, M. (2004) Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. Journal of Endodontics 30, 778–81.

73. Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihira, T., Terashita, M. (2005) Antimicrobial Effect of Ozonated Water on Bacteria Invading Dentinal Tubules. Journal o Endosontics, p. 778-781.

74. Needham, B.D., Trent, M.S. (2013) Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. Nature Reviews Microbiology volume 11, pages 467–481.

75. Noguez, I., Orta de Velásquez, M. T., Casasola Rodríguez, B., Román, P.I. (2016) Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC Helicobacter pylori by molecular techniques and FESEM images. Environmental Technology 38(6):744-753.

76. Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect; 9:228-36.

77. Norman, A., Hansen, L. H., Sorensen, S. J. (2009) Conjugative plasmids: vesselsofthecommunalgenepool.Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci. 364:2275–2289.

78. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000, 54, 49–79.

79. Ohlmuller. 1892. Action of ozone on bacteria. Arb. Kais. Gesund. 8:228-235.

80. Paczosa, M.K., Mecsas, J. (2016) Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 15;80(3):629-61.

81. Papachristodoulou, M., Koukounaras, A., Siomos, A.S., Liakou, A., Gerasopoulos, D. (2017) The effects of ozonated water on the microbial counts and the shelf life attributes of fresh-cut spinach. Volume 42, Issue 1.

82. Piddock, L. J. (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 19:382–402.

83. Podschuh, R., Ullmann, U. (1998) *Klebsiella spp.* as Nosocomial, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews.

84. Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P. (2017) Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids of chromosomes. Clinical Microbiology Reviews 30: 557-596.

85. Porto, Y.D., Trombete, F.M., Freitas-Silva, O., de Castro, I.M., Direito, G.M., Ascheri, J.L.R. (2019) Gaseous Ozonation to Reduce Aflatoxins Levels and Microbial Contamination in Corn Grits. Microorganisms 2019, 7, 220.

86. Queenan, A. M., Bush, K. (2007) Carbapenemases: the versatile -lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 20:440–458.

87. Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., Palnikar, P. (1995): Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3471–3475

88. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D. (2010) Complement: a keysystem for immune surveillance and homeostasis. Nat. Immunol. 11, 785–797.

89. Rickloff, J.R. (1987) An evaluation of the sporicidal activity of ozone. Apr;53(4):683-6.

90. Rosen, D.A., Hilliard, J.K., Tiemann, K.M., Todd, E.M., Morley,S.C., Hunstad, D.A. (2015) lebsiella pneumoniae FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia. The Journal of Infectious Diseases, p. 649-658.

91. Russo T. A., Olson R., MacDonald U., Beanan J., Davidson B. A. (2015). Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of

hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae ex vivo* and *in vivo*. Infect. Immun. 83, 3325–3333. 10.1128/IAI.00430-15.

92. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. (2006) Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, CDC.

93. Stewart, P.S. (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Zentralbl. Bakteriol. 292, 107–113.

94. Struve C., Roe C. C., Stegger M., Stahlhut S. G., Hansen D. S., Engelthaler D. M., et al. . (2015). Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. MBio. 6:e00630. 10.1128/mBio.00630-15.

95. Surgers L., Boyd A., Girard P. M., Arlet G., Decré D. (2016). ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. Emerging Infect. Dis. 22, 1687–1688. 10.3201/eid2209.160681

96. Štimac, I., Vasiljev Marchesi, V., Tomljenović, M., Rukavina, T. (2009) Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima vode. Znanstveni rad.

97. Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., Swings, J. (2005) Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of Enterococcus spp. FEMS Microbiol. Lett. 247(1): 59-63.

98. Tambić Andrašević, A., Jelić, M., Gužvinec, M., Butić, I., Bukovski, S. (2012) Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. Stručni rad.

99. Tambić Andrašević, A., Tambić, T., Žmak, Lj., Obrovac, M., Payerl Pal, M., Debelec, D., Bukovski, S., Hunjak, B., Unukić, T., Bošnjak, S., Škoda, A.M., Butić, I., Šoprek,S., Lucić, S. (2020) Osjetljivost I rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2019.g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske

100. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. http://www.eucast.org.

101. Umar, M., Roddick, F.A., Fan, L., Aziz, H.A. (2012) Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater- A review.

102. Varga, L., Szgieti, J. (2016) Use of ozone in the dairy industry: A review. Volume 69, Issue 2, pages 157-168.

103. Volar, M. (2017) Prekormjerna upotreba antibiotika i problem rezistencije: stavovi I mišljenja pacijenata. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

104. Walport, M.J. (2001) Complement-first of two parts. N. Engl. J. Med. 344,1058–1066.

105. Wei, J.C., Pan, L.L., Maddy, E., Pittman, J.V., Divarkarla, M., Xiong, X., Barnet, C. (2010) Ozone Profile Retrieval from an Advanced Infrared Sounder: Experiments with

Tropopause-Based Climatology and Optimal Estimation Approach. Center for Satellite Application and Research, Camp Springs, Maryland. 1123-1139.

106. Wert, E.C., Rosario-Ortiz, F.L., Snyder, S.A. (2009) Effect of ozone exposure on the oxidation of trace organic contaminants in wastewater. Water research 43 (4), p. 1005-1014.

107. Wood, J.P., Wendling, M., Richter, W., Rogers, J. (2020) The use of ozone gas for the inactivation of Bacillus anthracis and Bacillus subtilis spores on building materials. PLoS ONE 2020, 15, e0233291.

108. Wu, J., Luan, T., Lan, C., Wai Hung Lo, T., Yuk Sing Chan, G. (2007) Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. Volume 18, Issue 5, p. 466-472.

109. Xuan, D.W., Jia, C.C., Hong, W.Z., Zhang, R., Chen, G.X. (2009) Reduced susceptibilityto carbapenems in Klebsiella pneumoniae clinical isolates associated withplasmid-mediatedß-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. J.Med. Microbiol. 58, p. 1196–1202.

110. Zorlugenc, B., Zorlugenc, F.K., Oztekin, S., Evliya, B. (2008) The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B(1) in dried figs. 46(12):3593-7.

8. Prilog

8.1. Popis kratica

°C	stupanj celzijus
µL	mikrolitar
µg	mikrogram
BPA	Bisfenol A
CPS	polisaharidna kapsula
DBPS	engl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*
ESBL	engl. *extended spectrum beta lactamases*
g	gram
GC-MS	plinska kromatografija-masena spektrometrija
hvKP	hipervirulentna *Klebsiella pneumoniae*
Kb	kilobajt
KPC	engl. *carbapenem-producing Klebsiella pneumoniae*
LPS	lipopolisaharidi
MDR	engl. *Multidrug-Resistantance*
mg/L	gram po litri
min	minuta
mL	mililitar
mM	milimol
ng	nanogram
ng/µL	nanogram po mikrolitru
PBP	engl. *penicillin-binding protein*
pmol/µL	pikomola po mikrolitru
ppm	engl. *parts per milion*
s	sekunda
SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
U/µL	jedinica po mikrolitru

8.2. Tablice

Tablica P1. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat *Klebsiella pneumoniae* SE_SC_COL_46.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_46	Kontrola D	7,70x106	8,29x105	
SE_SC_COL_46	4 ppm D	1,21x105	2,15x104	98.42
SE_SC_COL_46	2 ppm D	4,48x105	1,79x104	94.19
SE_SC_COL_46	Kontrola F	7,93x106	6,50x105	
SE_SC_COL_46	4 ppm F	6,54x105	1,93x104	91.75
SE_SC_COL_46	2 ppm F	6,22x105	4,26x104	92,15

Tablica P2. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat *Klebsiella pneumoniae* SE_SC_COL_54.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_54	Kontrola D	$1,74x10^6$	$2,29x10^5$	
SE_SC_COL_54	4 ppm D	$1,34x10^4$	$3,06x10^3$	99,23
SE_SC_COL_54	2 ppm D	$8,30x10^3$	$8,95x10^2$	99,52
SE_SC_COL_54	Kontrola F	$1,59x10^6$	$1,18x10^5$	
SE_SC_COL_54	4 ppm F	$9,46x10^4$	$1,86x10^4$	94,04
SE_SC_COL_54	2 ppm F	$3,32x10^5$	$2,87x10^4$	79,07

Tablica P3. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae SE_SC_COL_61.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_61	Kontrola D	$1,88x10^7$	$1,83x10^6$	
SE_SC_COL_61	4 ppm D	$1,36x10^5$	$2,60x10^4$	99,28
SE_SC_COL_61	2 ppm D	$2,85x10^5$	$1,48x10^4$	98,48
SE_SC_COL_61	Kontrola F	$1,86x10^7$	$1,01x10^6$	
SE_SC_COL_61	4 ppm F	$7,68x10^5$	$5,86x10^4$	95,86
SE_SC_COL_61	2 ppm F	$5,35x10^5$	$4,35x10^4$	97,12

Tablica P4. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat *Klebsiella pneumoniae* SE_SC_COL_68.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_68	Kontrola D	$6,03x10^6$	$3,69x10^5$	
SE_SC_COL_68	4 ppm D	$1,16x10^4$	$1,46x10^3$	99,81
SE_SC_COL_68	2 ppm D	$2,91x10^4$	$4,21x10^3$	99,52
SE_SC_COL_68	Kontrola F	$5,81x10^6$	$2,59x10^5$	
SE_SC_COL_68	4 ppm F	$5,08x10^4$	$1,16x10^4$	99,13
SE_SC_COL_68	2 ppm F	$6,48x10^5$	$5,61x10^4$	88,86

Tablica P5. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat *Klebsiella pneumoniae* SE_SC_COL_86.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_86	Kontrola D	$1,45x10^7$	$1,79x10^6$	
SE_SC_COL_86	4 ppm D	$3,29x10^4$	$3,28x10^3$	99,77
SE_SC_COL_86	2 ppm D	$2,04x10^4$	$4,15x10^3$	99,86
SE_SC_COL_86	Kontrola F	$1,44x10^7$	$1,31x10^6$	
SE_SC_COL_86	4 ppm F	$1,06x10^5$	$1,34x10^4$	99,27
SE_SC_COL_86	2 ppm F	$1,24x10^6$	$1,61x10^5$	91,41

Tablica P6. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat *Klebsiella pneumoniae* SE_SC_COL_87.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_87	Kontrola D	$1,33x10^6$	$8,85x10^4$	
SE_SC_COL_87	4 ppm D	$3,15x10^5$	$2,43x10^4$	76,38
SE_SC_COL_87	2 ppm D	$7,83x10^4$	$1,59x10^4$	94,12
SE_SC_COL_87	Kontrola F	$1,33x10^6$	$8,00x10^4$	
SE_SC_COL_87	4 ppm F	$3,33x10^5$	$1,97x10^4$	75,00
SE_SC_COL_87	2 ppm F	$2,31x10^5$	$2,96x10^4$	82,67

Tablica P7. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae SE_SC_COL_96.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_96	Kontrola D	$1,51x10^7$	$2,18x10^6$	
SE_SC_COL_96	4 ppm D	$8,90x10^4$	$1,97x10^4$	99,41
SE_SC_COL_96	2 ppm D	$9,48x10^5$	$8,42x10^4$	93,70
SE_SC_COL_96	Kontrola F	$1,52x10^7$	$1,75x10^6$	
SE_SC_COL_96	4 ppm F	$1,72x10^5$	$8,81x10^3$	98,86
SE_SC_COL_96	2 ppm F	$1,95x10^5$	$1,48x10^4$	98,71

Tablica P8. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae SE_SC_COL_102.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_102	Kontrola D	$1,35x10^7$	$1,70x10^6$	
SE_SC_COL_102	4 ppm D	$2,31x10^5$	$2,59x10^4$	98,29
SE_SC_COL_102	2 ppm D	$2,95x10^6$	$1,88x10^5$	78,19
SE_SC_COL_102	Kontrola F	$1,38x10^7$	$8,78x10^5$	
SE_SC_COL_102	4 ppm F	$2,00x10^6$	$1,24x10^6$	85,47
SE_SC_COL_102	2 ppm F	$1,14x10^7$	$1,80x10^6$	17,02

Tablica P9. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae SE_SC_COL_173.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_173	Kontrola D	$3{,}55 \times 10^{7}$	$1{,}09 \times 10^{6}$	
SE_SC_COL_173	4 ppm D	$1{,}11 \times 10^{5}$	$4{,}77 \times 10^{4}$	99,69
SE_SC_COL_173	2 ppm D	$8{,}47 \times 10^{6}$	$5{,}86 \times 10^{5}$	76,16
SE_SC_COL_173	Kontrola F	$3{,}55 \times 10^{7}$	$6{,}85 \times 10^{5}$	
SE_SC_COL_173	4 ppm F	$3{,}79 \times 10^{5}$	$6{,}69 \times 10^{4}$	98,93
SE_SC_COL_173	2 ppm F	$9{,}56 \times 10^{6}$	$4{,}05 \times 10^{5}$	73,08

Tablica P10. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae SE_SC_COL_182.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
SE_SC_COL_182	Kontrola D	$1{,}19 \times 10^{8}$	$3{,}55 \times 10^{6}$	
SE_SC_COL_182	4 ppm D	$1{,}26 \times 10^{6}$	$2{,}66 \times 10^{5}$	98,94
SE_SC_COL_182	2 ppm D	$1{,}03 \times 10^{7}$	$4{,}81 \times 10^{5}$	91,33
SE_SC_COL_182	Kontrola F	$1{,}19 \times 10^{8}$	$3{,}41 \times 10^{6}$	
SE_SC_COL_182	4 ppm F	$5{,}42 \times 10^{6}$	$7{,}78 \times 10^{5}$	95,44
SE_SC_COL_182	2 ppm F	$1{,}82 \times 10^{7}$	$2{,}90 \times 10^{6}$	84,67

Tablica P11. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae H2_SC_COL_118.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
H2_SC_COL_118	Kontrola D	$6{,}97 \times 10^{7}$	$2{,}06 \times 10^{6}$	
H2_SC_COL_118	4 ppm D	$5{,}00 \times 10^{5}$	$6{,}00 \times 10^{4}$	99,28
H2_SC_COL_118	2 ppm D	$6{,}29 \times 10^{6}$	$1{,}02 \times 10^{6}$	90,97
H2_SC_COL_118	Kontrola F	$6{,}94 \times 10^{7}$	$9{,}60 \times 10^{5}$	
H2_SC_COL_118	4 ppm F	$3{,}21 \times 10^{6}$	$2{,}78 \times 10^{5}$	95,37
H2_SC_COL_118	2 ppm F	$2{,}37 \times 10^{6}$	$1{,}25 \times 10^{5}$	96,58

Tablica P12. Utjecaj ozona različitih koncentracija i načina aplikacije na izolat Klebsiella pneumoniae H1_SC_COL_44.

Izolat	Tretman	$\bar{x}$ [CFU/ml]	stDev [CFU/ml]	Redukcija u brojnosti [%]
H1_SC_COL_44	Kontrola D	$1{,}39 \times 10^{8}$	$6{,}41 \times 10^{6}$	
H1_SC_COL_44	4 ppm D	$2{,}57 \times 10^{6}$	$2{,}64 \times 10^{5}$	98,15
H1_SC_COL_44	2 ppm D	$1{,}90 \times 10^{7}$	$1{,}43 \times 10^{6}$	86,34
H1_SC_COL_44	Kontrola F	$1{,}39 \times 10^{8}$	$3{,}43 \times 10^{6}$	
H1_SC_COL_44	4 ppm F	$6{,}97 \times 10^{6}$	$2{,}80 \times 10^{5}$	95,00
H1_SC_COL_44	2 ppm F	$2{,}76 \times 10^{7}$	$2{,}43 \times 10^{6}$	80,20

Životopis

Doris Repinec rođena je 23.7.1997. godine u Zagrebu. Djetinjstvo je provela na selu, u Rakovici, pokraj Samobora. Završivši osnovnu školu Bogumila Tonija u Samoboru, upisala je opću gimnaziju Antun Gustav Matoš također u Samoboru koju je pohađala od 2012. do 2016. godine. Nakon srednje škole, 2016. godine, odlučila je upisati Agronomski fakultet u Zagrebu na preddiplomskom studiju Biljne znanosti. Završni rad na temu „Procjena proklijavanja u klasu kod različitih genotipova u polju i laboratoriju“ obranila je 2019. godine te stekla titulu Sveučilišne prvostupnice inženjerke biljnih znanosti. Iste te godine upisala je diplomski studij Agroekologije usmjerenja Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi. Na oba studija odrađivala je stručnu praksu u laboratorijima zavoda Agronomskog fakulteta, točnije Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku te na Zavodu za mikrobiologiju. Tijekom studija imala je priliku odraditi nekolicinu studentskih poslova. Slobodno vrijeme provodila je aktivno, u društvu prijatelja i mlađe sestre Franke.