Tripiridilporfirin u fotodinamičkoj inaktivaciji biofilma

Ćavar, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

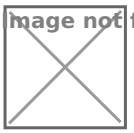
2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:030644

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

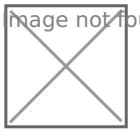


Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository







SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

Biotehnologija i istraživanje lijekova

Iva Ćavar

Tripiridilporfirin u fotodinamičkoj inaktivaciji biofilma

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

Biotehnologija i istraživanje lijekova

Iva Ćavar

Tripiridilporfirin u fotodinamičkoj inaktivaciji biofilma

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Ko-mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Undergraduate programme

Biotechnology and drug research

Iva Ćavar

Tripyridylporphyrin in photodynamic inactivation of biofilm

Bachelor's thesis

Rijeka, 2019

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Ko-mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Završni rad je obranjen dana 09.07.2019.

Pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Željka Maglica-predsjednica povjerenstva
2. Izv. prof. dr. sc. Igor Jurak
3. Izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti
4. Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Rad ima 41 stranicu, 14 slika i 45 literaturnih navoda.

Sažetak

Legionella pneumophila Gram-negativna je bakterija koja spada u porodicu *Legionellaceae*. Uzročnik je pontijačke groznice i legionarske bolesti. Obitava u vodenom okruženju kao što su jezera, rijeke, ali i umjetno stvoreni vodeni sustavi kao što su sustavi s visokim temperaturama vode, sustavi rashladne vode, spa i wellness centri, hoteli, bolnice, vodeni sustavi u stomatološkim ordinacijama. U takvom okruženju stvaraju se biofilmovi koje nastanjuje *L. pneumophila* i u njima se razmnožava. Biofilmovi su otporni na dezinfekcijska sredstva i termičku obradu vode što otežava eradikaciju legionele. Zbog toga potrebno je razviti nove metode dezinfekcije voda, a jedna od tih metoda je fotodinamička inaktivacija. Fotodinamička inaktivacija temelji se na upotrebi fotosenzibilizatora, u ovom radu 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirina (TMPyP3-$C_{17}H_{33}$), u aerobnim uvjetima. Izlaganje amfifilnog porfirina izvoru svjetlosti određene valne duljine rezultira stvaranjem singletnog kisika ($^1O_2$) i/ili ostalih kisikovih reaktivnih vrsta (ROS) koji dovode do oksidacije i stanične smrti patogena. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati učinkovitost fotodinamičke inaktivacije amfifilnog porfirina na razaranje 6-dnevnog biofilma *Legionella pneumophila* soj 130b. Korištena je sterilna vodovodna voda, a kao izvor svjetlosti korištena je ljubičasta svjetlost intenziteta 40 mW/cm^2. Koncentracije amfifilnog porfirina od 0,176 μM, 0,351 μM, 0,702 μM i 1,404 μM su dovele do uništavanja biofilma *L. pneumophila* u vodovodnoj vodi. Istraživanjem je dokazano da spoj učinkovito razara bakterijski biofilm pa bi se metoda mogla primijeniti u praksi.

Ključne riječi: amfifilni porfirin, biofilm, fotodinamička inaktivacija, *Legionella pneumophila*

Summary

Legionella pneumophila is a Gram-negative bacteria of the family *Legionellaceae*. It is a causative agent of Pontiac fever and Legionnaires' disease. It resides in water environment like rivers, lakes as well as in artificially created water systems like high temperature systems, cooling water systems, spa and wellness centres, hotels, hospitals, water systems in dental offices. In such environment biofilms are formed and inhabited by *L. pneumophila* that multiplies within them. Biofilms are resistant to disinfectants and thermal processing what makes eradication of *Legionella* more difficult. Consequently, new methods for water disinfection need to be developed and photodynamic inactivation is one of those methods. Photodynamic inactivation is based on usage of photosensitizer, in this case 5-(4-octadec-9-enamidophenyl)-10,15,20-tris(3-pyridyl)porphyrin (TMPyP3-$C_{17}H_{33}$) in aerobic conditions. Exposure of amphiphilic porphyrin to light of specific wavelength results in generation of singlet oxygen ($^1O_2$) and/or other reactive oxygen species (ROS) that lead to oxidation and cell death of pathogen. Focus of this research was determining effectiveness of photodynamic inactivation of amphiphilic porphyrin on destruction of 6 day-old biofilm of *Legionella pneumophila* strain 130b. Sterile tap water and violet light with intensity of 40 mW/cm^2 were used. Concentration of amphiphilic porphyrin of 0.176 μM, 0.351 μM, 0.702 μM and 1.404 μM led to destruction of *Legionella pneumophila* biofilm in tap water. This research demonstrated that compound effectively destroys bacterial biofilm therefore this method could be put into practice.

Key words: amphiphilic porphyrin, biofilm, photodynamic inactivation, *Legionella pneumophila*

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1 Mehanizam fotodinamičke inaktivacije 2
1.2 Fotosenzibilizatori 3
1.2.1 Porfirini 4
1.3 Izvori svjetlosti 5
1.4 Primjene fotodinamičke inaktivacije 6
1.5 Utjecaj fotosenzibilizatora na bakterije 7
1.6 *Legionella pneumophila* 9
1.6.1 Epidemiologija, patogeneza, klinička slika i liječenje infekcija legionelom 9
1.7 Bakterijski biofilm 11
1.7.1 Biofilm bakterija *Legionella pneumophila* 13
2. CILJ RADA 17
3. MATERIJALI I METODE 18
3.1 Pribor i uređaji 18
3.2 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin 19
3.3 Bakterijski soj 19
3.4 Medij i hranjiva podloga 20
3.4.1 Vodovodna voda iz slavine 20
3.4.2 BCYE (eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) agar 20
3.5 Bakterijski inokulum 21
3.6 Stvaranje biofilma *Legionella pneumophila* 21
3.7 Razaranje biofilma legionela pomoću amfifilnog porfirina 21
3.8 Statistička obrada podataka 24
4. REZULTATI 25

4.1 Minimalna efektivna koncentracija (MEK) ispitivana dilucijskom metodom 25

4.2 Utjecaj amfifilnog porfirina na šestodnevni biofilm bakterija *Legionella pneumophila* 25

5. RASPRAVA 28

6. ZAKLJUČAK 32

7. LITERATURA 33

8. ŽIVOTOPIS 40

1. UVOD

Legionella pneumophila Gram-negativna je bakterija koja spada u porodicu *Legionellaceae*, red *Legionellales* te razred *Gammaproteobacteria*. Ova bakterija prirodno obitava u vodenom okruženju [1]. Osim svog prirodnog staništa *L. pneumophila* nastanjuje umjetno stvorene vodene sustave kao što su sustavi s visokim temperaturama vode, sustavi rashladne vode, spa i wellness centri, hoteli, bolnice, vodeni sustavi u stomatološkim ordinacijama [2], [3]. U takvim umjetno stvorenim vodenim sustavima nastaju biofilmovi koje nastanjuje legionela i u njima se razmnožava. *L. pneumophila* u biofilmovima pokazuje otpornost na dezinfekcijska sredstva i termičku obradu vode [4]. Zbog otpornosti bakterije u biofilmu potrebno je naći nove metode dezinfekcije voda i fotodinamička inaktivacija (PDI, skraćenica od eng. *photodynamic inactivation*) jedna je od kandidata [5].

PDI poznata i pod nazivom antimikrobna fotodinamička terapija (aPDT, skraćenica od eng. *antimicrobial photodynamic therapy*) obećavajuća je metoda za dezinfekciju voda koja kombinira uporabu fotosenzibilizatora (PS, skraćenica od eng. *photosensitizer*) koji je inače bez izvora svjetlosti netoksičan te se pasivno nakuplja u ciljnim stanicama [6], [7]. Uz prisutnost molekularnog kisika (O_2) fotosenzibilizator se aktivira izlaganjem svjetlosti određene valne duljine što rezultira stvaranjem citotoksičnog singletnog kisika ($^1O_2$) i/ili ostalih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, skraćenica od eng. *reactive oxygen species*) [7]. Osim dezinfekcije voda PDI može služiti kao tretman za lokalizirane infekcije izazvane humanim-papiloma i herpesvirusima, gljivične i bakterijske infekcije kože, periodontitis, ali potencijalno i kao insekticidna metoda i metoda dezinfekcije površina [8], [9].

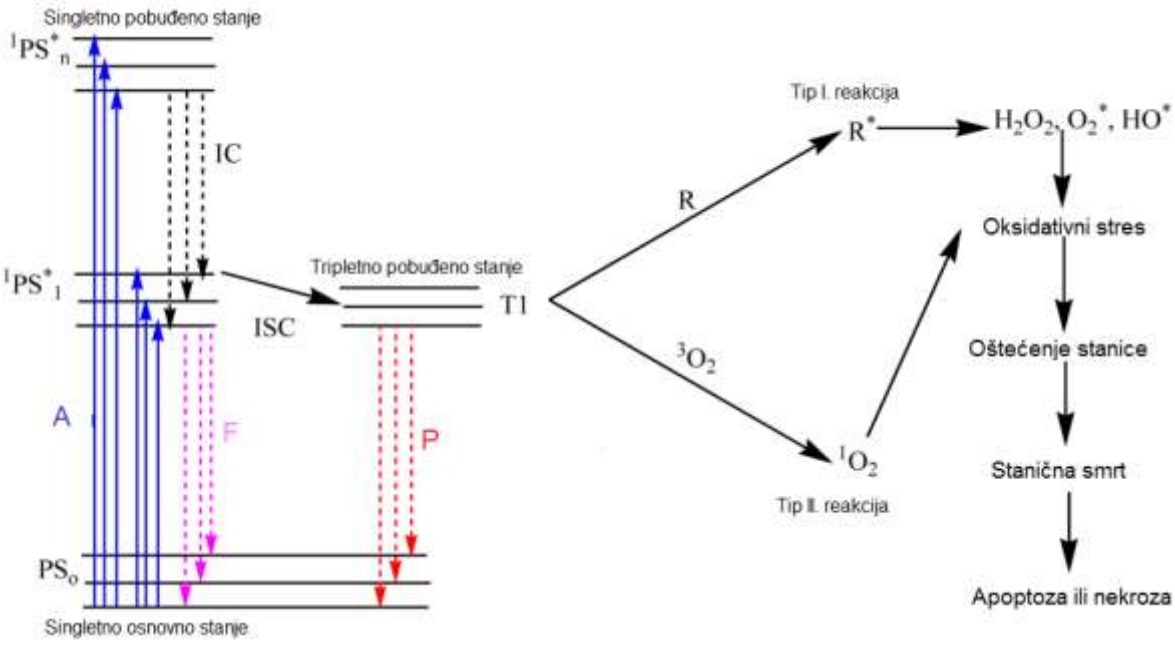
1.1 Mehanizam fotodinamičke inaktivacije

Fotodinamička inaktivacija (PDI) uključuje uporabu fotosenzibilizatora (PS) koji inače u odsutnosti svjetlosti nije toksičan, svjetlosti određene valne duljine i molekularnog kisika [7], [10]. Nakon izlaganja PS-a izvoru svjetlosti dolazi do apsorpcije elektromagnetskog zračenja određene valne duljine i prijelaza jednog od elektrona iz energetski niže u energetski višu molekulsku orbitalu bez promjene spina. Kao posljedica tog prijelaza PS prelazi iz osnovnog singletnog stanja (S_0) u pobuđeno singletno stanje (S_n). PS se može vratiti u osnovno singletno stanje emisijom energije u obliku svjetlosti (fluorescencija) ili oslobađanjem energiju u obliku topline vibracijskim opuštanjem. PS u singletnom pobuđenom stanju ima kratak poluživot (u nano-piko sekundama) radi čega ne stupa u reakcije. PS u pobuđenom singletnom stanju može prijeći u pobuđeno triplet stanje (T_n) tako da pobuđeni elektron promijeni svoj spin u procesu međusustavnog križanja (ISC eng. *intersystem crossing*), što je spinski zabranjen proces. PS u pobuđenom triplet stanju ima dulji poluživot pa može stupiti u reakcije važne za PDI. Iz pobuđenog triplet stanja moguć je povratak u osnovno singletno stanje radijacijskim procesom fosforescencije i ne-radijacijskim procesima [11]. PS u triplet pobuđenom stanju može reagirati putem dva tipa reakcija.

U fotokemijskim reakcijama tipa I. dolazi do prijenosa elektrona s PS u pobuđenom triplet stanju na organske supstrate, molekule u ciljnim stanicama iz čega nastaju slobodni radikali. Ti slobodni radikali su jako reaktivni pa lako stupaju u reakcije s molekularnim kisikom tvoreći reaktivne kisikove vrste (ROS eng. *reactive oxygen species*) kao što su superoksidni anion, hidroksilni radikali i vodikov peroksid koji narušavaju integritet bioloških membrana [12], [13].

U fotokemijskim reakcijama tipa II. dolazi do prijenosa energije s PS-a u triplet pobuđenom stanju na molekularni kisik koji se inače nalazi u triplet stanju ($^3O_2$) iz čega nastaje singletni kisik ($^1O_2$) koji reagira sa širokim spektrom bioloških supstrata uzrokujući oksidaciju staničnih komponenti, a

PS se pri tom vraća u osnovno singletno stanje. Singletni kisik ima kratak poluživot i radijus djelovanja (0,01-0,02 μM) zbog čega su reakcije i šteta koju prouzrokuje usko lokalizirani [13]–[15]. Svi navedeni fotofizikalni i fotokemijski procesi mogu se shematski prikazati dijagramom Jablonskog prikazanim na Slici 1.



Slika 1. Modificirani prikaz dijagrama Jablonskog. PS-fotosenzibilizator u singlet stanju, (eng. *photosensitizer*), T-triplet stanje, IC-unutarnja pretvorba (eng. *internal coversion*), ISC-međusustavno križanje (eng. *intersystem crossing*), A-apsorpcija elektromagnetskog zračenja, F-fluorescencija, P-fosforescencija, R-supstrat [16]

1.2 Fotosenzibilizatori

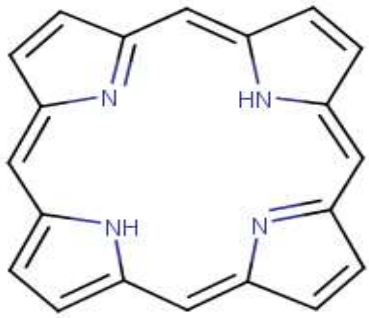
Fotosenzibilizator je prirodni ili sintetički spoj koji nakon apsorpcije svjetlosti određene valne duljine uzrokuje fizikalne i kemijske promjene drugih kemijskih entiteta. Makrociklički spojevi koriste se u dijagnostičke i terapeutske svrhe kao PS, a u tu skupinu spojeva spadaju porfirini, klorini, bakterioklorini, ftalocijanini, naftalocijanini [11], [16]. Dobar PS trebao bi ispunjavati određene kriterije kao što su kemijska čistoća i točno određena kemijska struktura, stabilnost pri sobnoj temperaturi, minimalna toksičnost u mraku, pogodna topljivost u otapalima određenim primjenom, financijska isplativost, visoko kvantno iskorištenje stvaranja tripletnog stanja koje ima dovoljno dug poluživot da stupi u reakcije. PS-i se mogu podijeliti u tri generacije.

U prvu generaciju PS-a spadaju derivati hematoporfirina (HpD) koji su se koristili u ranim kliničkim istraživanjima učinkovitosti fotodinamičke terapije. Sastav i struktura im nisu bili jasno definirani pa su iz toga razloga razvijeni PS-i druge generaciju. U tu generaciju spadaju makrociklički spojevi koje čine strukturalno modificirani porfirini, ftalicijanini, bakterioklorini, klorini, fulereni koji imaju jasno definiran sastav i strukturu što je poboljšalo apsorpcijski spektar i selektivnost na mete fotodinamičke terapije. Ipak nedovoljno specifična lokalizacija dovela je do potrebe dizajniranja treće generacije PS-a koju predstavljaju PS-i konjugirani biomolekulama ili drugim materijalima koji se ponašaju kao nosači te mogu prepoznati mete [11], [17].

1.2.1 Porfirini

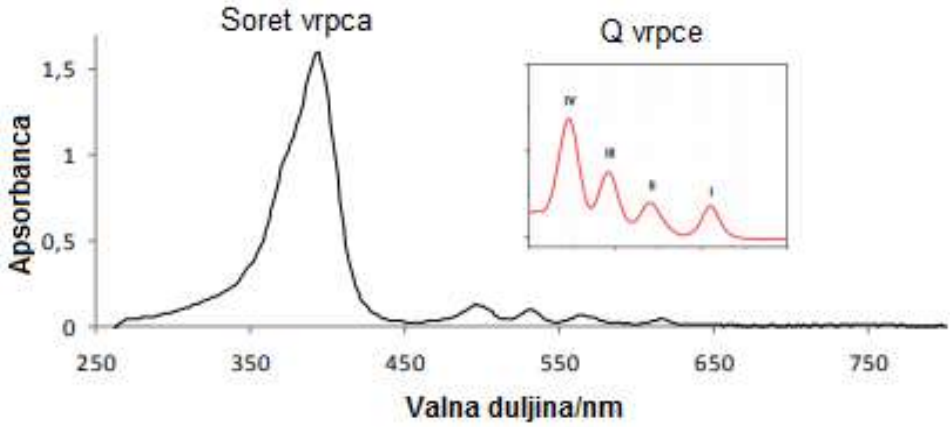
Porfirini su skupina raznovrsnih makrocikličkih spojeva. Rašireni su u prirodi gdje igraju važnu ulogu u prijenosu kisika i elektrona u važnim biokemijskim procesima kao što je fotosinteza. Aktivni su centar hemoglobina, mioglobina, klorofila i citokroma. Mogu tvoriti agregate kako prirodni tako i sintetski porfirini. Istraživanja su pokazala da porfirini korišteni kao PS koji agregiraju imaju znatno manji doprinos u stvaranju singletnog kisika od monomernih oblika [18].

Glavni element kemijske strukture porfirina čini porfinski prsten koji se sastoji od 4 pirolne podjedinice povezane metinskim mostovima (Slika 2.). Ako se na *meso*- i *β*- poziciji porfina vežu atomi koji nisu vodik ili neke druge grupe tada se ta novonastala struktura naziva porfirinom [19], [20].



Slika 2. Kemijska struktura porfina-tetrapirolnog središta porfirina

Karakteristike porfirina kao što su njihova boja i apsorpcijski spektar proizlaze i njihovog sustava konjugiranih π-elektrona. U apsorpcijskom spektru porfirina vidljiva je Soret-ova ili B vrpca pri valnim duljinama 350-500 nm ovisno o tome je li porfirin *meso*- ili *β*- supstituiran. Ova vrpca prikazuje prijelaz elektrona iz osnovnog singletnog stanja S_0 u singletno pobuđeno stanje S_2. Pri valnim duljinama 500-750 nm vidljive su četiri Q vrpce koje prikazuju prijelaz elektrona iz S_0 u S_1 stanje, intenzitet Q vrpci ovisi o poziciji i vrsti supstituenta (Slika 3.). Prema tome porfirini se mogu dijeliti na *etio*, *rhodo*, *oxo-rhodo* i *phyllo*porfirine [20].



Slika 3. Tipičan UV/Vis spektar porfirina *etio*-tipa [20]

1.3 Izvori svjetlosti

Izvor svjetlosti važna je komponenta fotodinamičke inaktivacije jer osim dostupnosti kisika i karakteristika fotosenzibilizatora učinkovitost fotodinamičke inaktivacije ovisi o korištenom izvoru svjetlosti. Najčešće korišteni izvori svjetlosti su lampe, laseri i diode koje emitiraju svjetlost (LED, skraćenica od eng. *Light Emitting Diode*). Plava svjetlost (450-495 nm) bolje prodire kroz vodu jer se voda ponaša kao filter pa se spektar i intenzitet bijele svjetlosti mijenja pri prolasku kroz vodu što treba uzeti u obzir kada se fotodinamička inaktivacija koristi kao metoda dezinfekcije voda [10], [21], [22].

Laseri emitiraju svjetlost točno određene valne duljine. Ta svjetlost je jakog intenziteta, koherentna i monokromatska što olakšava točne

dozimetrijske izračune. Laseri se mogu ukomponirati u optička vlakna i tako dostaviti svjetlost na, drugim izvorima svjetlosti, nepristupačna područja. Lampe emitiraju široke spektre elektromagnetskog zračenja zbog čega su često potrebni filteri. Bolji su izbor kod primjene u dermatologiji jer osvjetljavaju veću površinu. Osim toga lakše se njima rukuje nego laserima i financijski su isplativiji izvori svjetlosti. U zadnje vrijeme razvijaju se i LED lampe koje su također financijski isplative, mogu se organizirati u različite geometrijske oblike i pokriti velika područja te se njima relativno lako rukuje. Postoji velik izbor pri proizvodnji valnih duljina koje mogu emitirati od UVA (350 nm) do bliskih infracrvenih (1100 nm) valnih duljina [23].

1.4 Primjene fotodinamičke inaktivacije

Fotodinamička inaktivacija pokazala se kao efektivna metoda u liječenju čireva koji ne zacjeljuju, lokaliziranih infekcija uzrokovanih humanim papiloma virusom (HPV) i *Herpes* virusom, ali i ostalim nevirusnim dermatološkim infekcijama kao što su akne i druge infekcije uzrokovane kvascima, gljivicama i bakterijama. Uspješno su liječene i bakterijske infekcije kod apscesa mozga. *Acne vulgaris* multifaktorijalna je bolest u kojoj dolazi do pretjerane proliferacije bakterije *Cutibacterium acnes* koje same proizvode porfirine, većinom protoporfirin IX i koproporfirin III što znači da je dovoljno kožu osvijetliti svjetlošću određene valne duljine. PDI u kojoj se kao PS koristila δ-aminolevulinska kiselina i crvena svjetlost (630 nm, 100 J/cm^2) pokazala se učinkovitija u liječenju leishmanijaze od topikalno primijenjenog paramomicina. Ovom metodom uspješno su liječene infekcije u gastrointestinalnom traktu uzrokovane bakterijom *Helicobacter pylori* koja prirodno akumulira fotoaktivne porfirine pa je zahvaćeno područje bilo potrebno izložiti primjerenom izvoru svjetlosti [8]. PDI se pokazala efektivnom i u liječenju periodontitisa. Uz metilen plavo (MB skraćenica od eng. *methylene blue*) kao PS i izlaganje crvenoj svjetlosti (665 nm, 30 J/cm^2) uništeno je 97 % biofilma bakterije *Enterococcus faecalis* iz eksperimentalno inficiranog izvađenog zuba [10]. Od malog broja fotosenzibilizatora koji su prošli klinička ispitivanja i u uporabi su koriste se

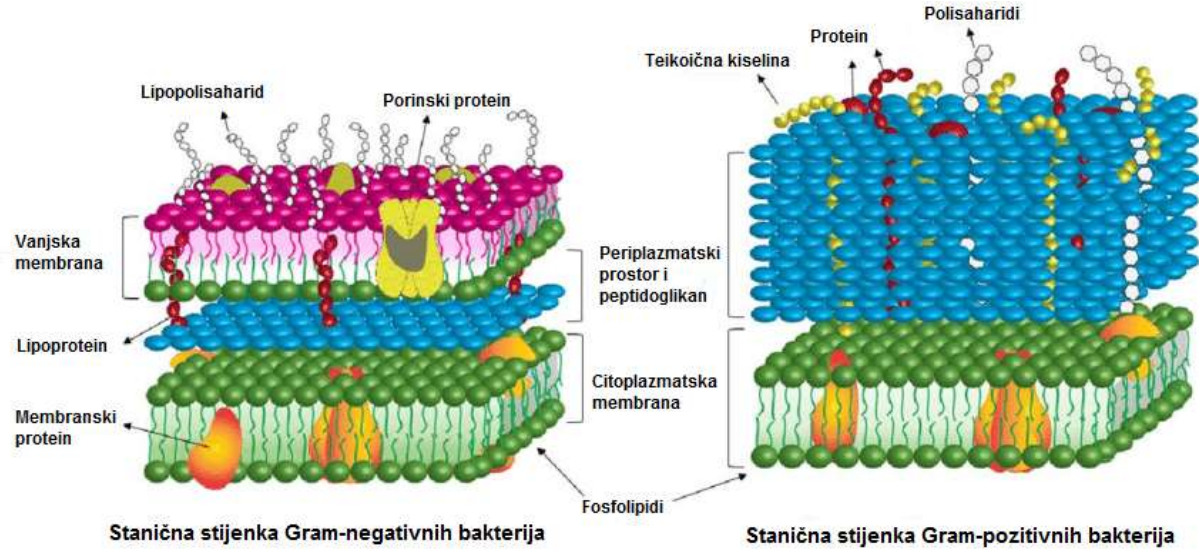
u svrhe liječenja raka pluća, mokraćnog mjehura, cervikalnog karcinoma, malignih i nemalignih kožnih bolesti, aktiničke keratoze, makularne degeneracije vezane sa starenjem te dijagnoze tumora mokraćnog mjehura, kože, pluća i gastrointestinalnog trakta [16].

Osim kliničkih primjena PDI ima potencijala za eradikaciju štetnih insekata i dezinfekciju vode. Stvaranje materijala imobilizacijom PS-a na nosače mogu se stvoriti materijali koji bi se mogli koristiti u bolnicama i javnim ustanovama za dezinfekciju površina i predmeta [9]. Otpadne vode iz domaćinstva i industrije predstavljaju sve veći problem jer kontaminiraju okoliš pa je potrebno dezinficirati vode kako bi se iz njih uklonili patogeni. U prenapučenim mjestima ponovna uporaba vode neizbježna je zbog čega je potrebno razvijati nove metode dezinfekcije. Klasične metode dezinfekcije vode su uporaba klora, ozona i ultraljubičastog zračenja. Nedostaci su stvaranje toksičnih nus-produkata u slučaju korištenja klora ili financijska neisplativost u slučaju dezinfekcije ozonom ili ultraljubičastim zračenjem. Za efektivniju dezinfekciju voda poželjno je koristiti imobilizirane PS-e jer to omogućuje višekratnu uporabu i onemogućuje otpuštanje PS-a i kontaminaciju voda [24].

1.5 Utjecaj fotosenzibilizatora na bakterije

U svrhu razlikovanja različitih bakterijskih stanica koristi se metoda diferencijalnog bojanja po Gramu. Prema toj metodi bakterije se dijele na Gram-pozitivne bakterije koje pokazuju ljubičasto obojenje i Gram-negativne bakterije koje pokazuju ružičasto obojenje. Razlike u boji posljedica su različite građe stanične stijenke kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Slika 4.). Gram-pozitivne bakterije imaju deblju staničnu stijenku od Gram-negativnih bakterija čijeg 90 % sastava čini peptidoglikan, polisaharida sastavljenog od dva derivata šećera, *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilmuraminske kiseline. Mnoge Gram-pozitivne bakterije imaju molekule teikoične kiseline (polimeri građeni od glicerol fosfata ili ribitol fosfata) koje su negativno nabijene. Molekule teikoične kiseline kovalentno su vezane za peptidoglikan, a kada su vezane za lipide

nazivaju se lipoteikoične kiseline. Gram-negativne bakterije imaju znatno tanji sloj peptidoglikana od Gram-pozitivnih bakterija povrh kojega se nalazi vanjska membrana. Na vanjskoj membrani nalazi se lipopolisaharid (LPS) koji je karakterističan za Gram-negativne bakterije, a sastoji se od polisaharidne jezgre, O-specifičnih polisaharida i lipida A i doprinosi većoj rezistenciji Gram-negativnih bakterija [1], [25].



Slika 4. Modificirani shematski prikaz razlike u građi stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Prilagođeno iz Liu et al. [26]

Zbog razlika u strukturi bakterijske stanične stijenke različiti fotosenzibilizatori pokazuju različite rezultate fotodinamičke inaktivacije. Gram-pozitivne bakterije uspješno mogu biti inaktivirane korištenjem anionskih, kationskih i neutralnih fotosenzibilizatora [27]. Za razliku od Gram-pozitivnih, Gram-negativne bakterije ne mogu se uspješno inaktivirati anionskim i neutralnim fotosenzibilizatorima bez uporabe membranskih disruptora kao što su $CaCl_2$, Tris-EDTA i polimiksin B koji mijenjaju permeabilnost vanjske membrane [25], [27], [28]. Zbog izrazito negativnog naboja LPS-a anionski i neutralni fotosenzibilizatori slabo prodiru u stanice, dok kationski fotosenzibilizatori stvaraju jake elektrostatske interakcije s LPS-om i učinkovitije inaktiviraju Gram-negativne bakterije [27]. Osim pozitivnog naboja, povećanje amfifilnog karaktera fotosenzibilizatora povećava njegov afinitet za bakterije i akumulaciju u stanice [24].

Najčešće mete fotosenzibilizatora u PDI-i su stanična stijenka, lipopolisaharid, membranski proteini, citoplazmatska membrana, a od unutarstaničnih to su kromosomska i plazmidna DNA. PDI je proces koji pogađa više meta odjednom pa je malo vjerojatno da će mikroorganizmi razviti otpornost na ovu metodu eradikacije [25], [26].

1.6 *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila je Gram-negativna, aerobna bakterija koja spada u porodicu *Legionellaceae*. Unutar te porodice do sada je otkriveno preko 50 vrsta bakterija i više od 70 seroskupina legionela. Najznačajnija je *L. pneumophila* koja uzrokuje oko 90 % humanih infekcija legionelama, a prema specifičnostima u antigenskoj građi podijeljena je u 15 seroskupina od kojih prva najčešće izaziva infekcije kod ljudi. *Legionella spp.* su tanki pleomorfni štapići koji se pojavljuju u kokobacilarnom (najčešće u kliničkim uzorcima) i filamentoznom obliku (umjetna hranilišta). Pokretne su, posjeduju jednu do dvije flagele i pile. *L. pneumophila* ima monopolarnu flagelu i višebrojne pile. Prirodno obitava u vodenim okruženjima, vlažnom tlu, ali i umjetno stvorenim vodenim sustavima [29], [30]. Razmnožava se na temperaturama između 25 °C i 42 °C s tim da joj je najpogodnija temperatura za razmnožavanje 35 °C. Mogu preživjeti temperature od 0°C do 68 °C, pH u rasponu 5,0-8,5 i koncentracijama otopljenog kisika u vodi u rasponu 0,2-15 ppm [31], [32]. Zbog posebnih nutritivnih zahtjeva *Legionella spp*. ne rastu na većini hranjivih podloga, već rastu na posebnoj podlozi koja mora sadržavati L-cistein, željezne soli, aktivni ugljen i kvaščev ekstrakt (BCYE agar skraćenica od eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) [29].

1.6.1 Epidemiologija, patogeneza, klinička slika i liječenje infekcija legionelom

Budući da *L. pneumophila* nastanjuje umjetno stvorene vodene sustave, najčešći izvor zaraze za ljude su objekti koji su bili zatvoreni duže vrijeme i vodeni sustav nije bio u upotrebi, klimatizirani objekti i svi objekti koji posjeduju spremnike većih količina vode. Ova bakterija pokazala je

otpornost na razne načine dezinfekcija, a posebice kada se radi o bakterijama u biofilmu koji povećava otpornost na biocidna sredstva što povećava mogućnost zaraze čak i nakon provedene dezinfekcije vode [2], [4], [29].

Zaraziti se može udisanjem kontaminiranog aerosola, ali ne s čovjeka na čovjeka. *L. pneumophila* predstavlja najčešćeg bakterijskog uzročnika pneumonije u općoj populaciji. Infekcije uzrokovane ovom bakterijom manifestiraju se u dva različita klinička oblika [29].

Pontijačka groznica je blaga, samolimitirajuća bolest koja po simptomima nalikuje gripi. Teška upala pluća karakterizirana glavoboljom, bolovima u mišićima, suhim i neproduktivnim kašljem, bolovima u abdomenu, probavnim smetnjama (dijareja), bubrežnim tegobama, osipom, oštećenjem funkcija jetre i središnjeg živčanog sustava naziva se legionarska bolest. Može se javiti u svim dobnim skupinama, ali je najčešća u srednjoj ili starijoj životnoj dobi. Pontijačka groznica nema sezonski uočljivu distribuciju za razliku od legionarske bolesti koja se javlja u proljeće i ljeto. Od legionarske bolesti najčešće obolijevaju imunokompromitirane osobe, a od ishodu nakon izlaganja kontaminiranom aerosolu važnu ulogu ima i infektivna doza. Smrtnost u slučaju legionarske bolesti je u rasponu 5-20 % ovisno o imunosnom statusu oboljele osobe, primjeni odgovarajuće terapije i razvoju komplikacija [29], [31].

Patogeneza bolesti zasniva se na mogućnosti razmnožavanja bakterije unutar stanica. Nakon udisanja kontaminiranog aerosola bakterija se razmnožava u makrofagima u fagosomu. Sprječava spajanje fagosoma i lizosoma i proteolitičku razgradnju bakterija. Na taj način fagosom postaje sigurno utočište u kojemu se bakterija može slobodno replicirati. *L. pneumophila* u fagosomu izmjenjuje se između virulentne (transmisijske) i replikacijske faze ovisno o dostupnosti nutrijenta. Nutritivno bogato okruženje pogoduje replikacijskoj fazi kada bakterija eksprimira malo virulentnih čimbenika. U nutritivno limitirajućim uvjetima fagosom ne podupire više replikacijsku fazu, već ulazi u transmisijsku fazu koju

karakterizira povećana pokretljivost, otpornost na stresore, ekspresija virulentnih čimbenika i na kraju izlazak iz zaraženog domaćina. *L. pneumophila* izlučuje razne proteolitičke enzime kao što su lipaza, fosfataza, ribonukleaza, deoksiribonukleaza, a imaju i enzimsku aktivnost katalaze, oksidaze i β-laktamaze zbog čega su otporne na β-laktamske antibiotike [29], [33].

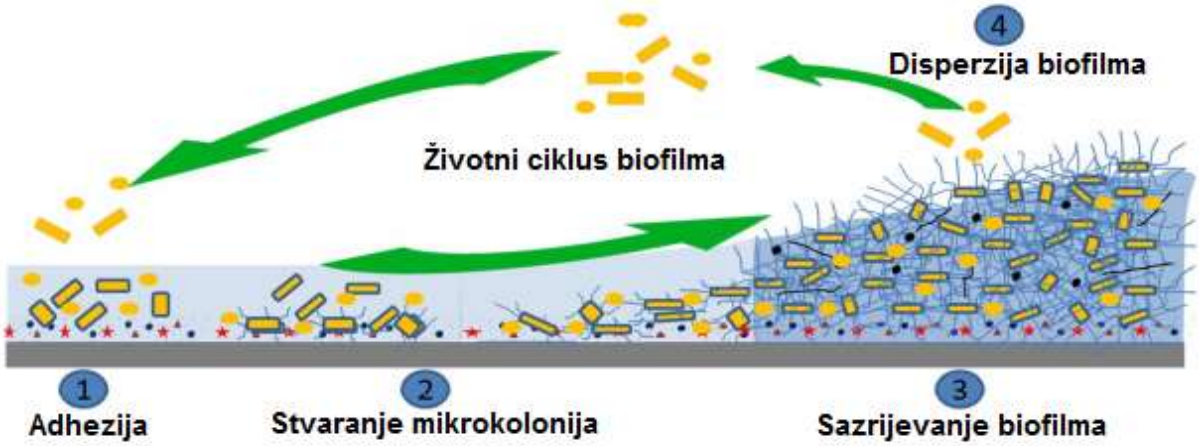
Zbog enzimske aktivnosti β-laktamaze infekcije uzrokovane legionelama ne liječe se penicilinima i cefalosporinima, a osim toga ne djeluje ni terapija aminoglikozidima i vankomicinom. Za liječenje se mogu koristiti makrolidi, rifampin, tetraciklini, kinoloni jer su to antibiotici koji se akumuliraju u stanicama u visokim koncentracijama. Kroz povijest primarni izbor za liječenje bio je eritromicin, ali *in vitro* podaci govore da azitromicin i fluorokinoloni imaju bolji učinak u liječenju infekcija uzrokovanih legionelama i imaju manje nus-pojava od eritromicina. Rifampin se počeo koristiti u novije vrijeme, ali njegova uporaba nije potkrijepljena odgovarajućim *in vitro* podacima [29], [31].

1.7 Bakterijski biofilm

Biofilm je zajednica mikroorganizama vezanih za površinu supstrata. U prirodi je sesilni oblik života bakterija kao biofilm dominantan nad planktonskim oblikom života. Biofilm mogu tvoriti jedna vrsta, dvije vrste ili više vrsta mikroorganizama koje mogu činiti bakterije, gljive i protozoe. Biofilm čine mikroorganizmi ireverzibilno povezani međusobno i sa supstratom, uronjeni u izvanstanični matriks koji čine polisaharidi, mrtve stanice i bakterijska DNA, a fenotipski su različiti od planktonskih mikroorganizama iste vrste. Mikroorganizmi stvaraju biofilm kao vid samoobrane jer povećava preživljenje kao u slučaju stvaranja biofilma u cijevima u vodenim sustavima gdje biofilmovi sprječavaju fizičko sapiranje bakterija, ali sprječava fagocitozu od strane protozoa i onemogućuje ili smanjuje penetraciju antimikrobnih tvari. Zbog toga bakterijske stanice u biofilmu znaju biti i do sto puta otpornije na antimikrobne tvari od planktonskih stanica iste vrste. Osim otpornosti na antimikrobne tvari

stanice u biofilmu zaštićene su i od efektorskih molekula imunosnog sustava. Osim toga biofilmovi su često pričvršćeni za nutrijentima bogata područja što pruža bakterijama stanište pogodno za proliferaciju, a bliskost bakterijskih stanica u biofilmu omogućuje lakšu međustaničnu komunikaciju i preživljenje [1], [29], [31].

Stvaranje biofilma odvija se u četiri faze (Slika 5.). U prvoj fazi dolazi do reverzibilnog vezanja za površine u kojoj važnu ulogu imaju stanične komponente kao flagele, pili i površinski proteini koji ostvaruju vezu između stanice i površine. Nakon toga dolazi do druge faze tj. ireverzibilnog vezanja za površinu. Zbog toga dolazi do povećane ekspresije gena koji su karakteristični sesilnom obliku života u biofilmu. Ti geni pokreću unutarstanične signalne puteve koji modificiraju enzimsku aktivnost, vežu se za mRNA, modificiraju transkripcijsku aktivnost, smanjuju aktivnost flagelarnih motora što dovodi do treće faze stvaranja biofilma, a to je stvaranje polisaharidnog matriksa i sazrijevanje. Zreli biofilm sačinjavaju stanice mikroorganizama u postotku 15-20 %, a ostatak otpada na sluzavu izvanstanični matriks. U takvom okruženju stanice gube flagele i nisu pokretne, ali biofilm nije statična masa i stanice imaju mogućnost disperzije što čini četvrtu fazu stvaranja biofilma [1], [29], [33].



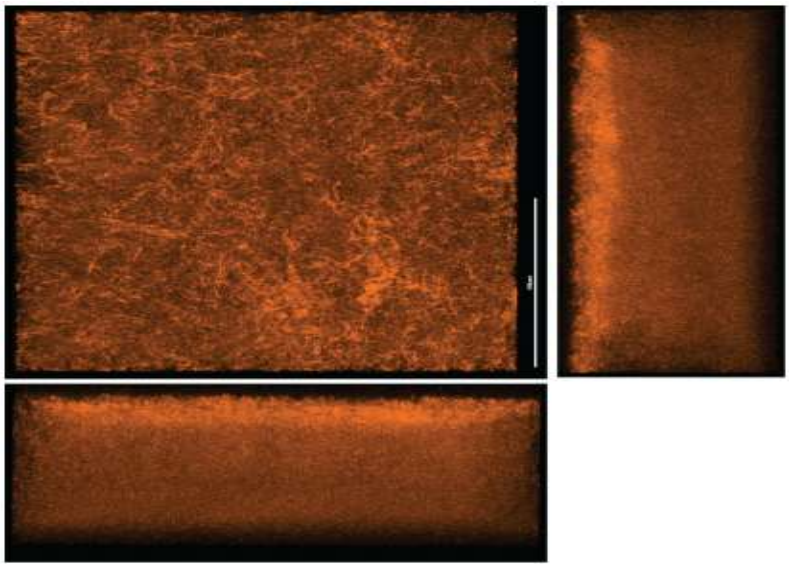
Slika 5. Faze stvaranja biofilma 1. Reverzibilna adhezija 2. Ireverzibilna adhezija i stvaranje mikrokolonija 3. Sazrijevanje biofilma i stvaranje polisaharidnog matriksa 4. Disperzija. Prilagođeno iz Abdallah et al. [34]

Biofilmovi su sveprisutni i predstavljaju veliki zdravstveni problem. Stvaraju se u cijevima zbog čega mogu smanjiti protok vode ili ulja u

industrijskim postrojenjima, mogu pospješiti koroziju cijevi i narušiti zdravstvenu ispravnost pitke vode. Osim toga biofilmovi se stvaraju kod kroničnih infekcija kao što su periodontitis, bakterijska vaginoza, cistična fibroza, infekcije kroničnih rana, stafilokokne infekcije, legionarska bolest, tuberkuloza, ali su prisutni i na implantatima, lećama, kateterima, organima koji se transplantiraju [1], [29].

1.7.1 Biofilm bakterija *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila može preživjeti u okolišu u slobodnoživućem planktonskom obliku ili tvoreći bakterijski biofilm pričvršćivanjem za površinu [33]. *In vitro L. pneumophila* može stvarati jednovrsne biofilmove koji sadržavaju izvanstanični matriks (Slika 6.), ali u prirodnim staništima kao što su voda, vlažno tlo, umjetno stvoreni vodeni sustavi češće se nalazi u viševrsnim biofilmovima koje kolonizira [35]. Promatrajući formaciju biofilma u laboratoriju utvrđeno je da količina, stupanj prianjanja i brzina stvaranja biofilma ovise o temperaturi pri kojoj taj biofilm nastaje. Biofilm stvoren pri temperaturi od 25 °C ima oblik gljive, isprepleten je kanalima vode, tanji je i adherentniji od biofilma stvorenog pri višim temperaturama i tvore ga većinom bakterije kokobacilarnog oblika. Biofilm stvoren pri temperaturnom intervalu 37 °C-42 °C čine bakterije filamentoznog oblika, a biofilm nije isprepleten vodenim kanalima, robustan je i deblji od onoga stvorenog pri temperaturi od 25 °C. Naklonjenost filamentoznom obliku bakterija *L. pneumophila* regulirana je temperaturom, a unutar stanica domaćina bakterije filamentoznog oblika se uspješnije razmnožavaju od bakterija kokobacilarnog oblika [33], [36]. Osim temperature na formiranje i kolonizaciju biofilma utječu i drugi okolišni čimbenici.



Slika 6. Jednovrsni biofilm *Legionella pneumophila* označen DNA bojom Syto62. Mjerna ljestvica predstavlja 100 μm. Preuzeto iz Abdel-Nour et al. [35]

Budući da je pričvršćivanje za površinu prvi korak u stvaranju biofilma, važnu ulogu ima materijal na koji se bakterije pričvršćuju u inicijalnim fazama stvaranja biofilma. U umjetno stvorenim vodenim sustavima *L. pneumophila* uspješno se može pričvrstiti na više vrsta plastike koja je čest izbor materijala za izradu cijevi. Bakar i nanočestice inhibiraju formaciju biofilma. Nanočestice ometaju interakcije *L. pneumophila*-amebe u viševrsnim biofilmovima i narušavaju strukturu biofilma. Prisutnost dvovalentnih kationa kao što su magnezijev i kalcijev kation potpomaže vezanje bakterije za abiotičke površine, a povećane razine cinka, magnezija i mangana u korelaciji su s povećanom kontaminacijom legionelom. Povišene koncentracije cinka omogućuju lakše vezanje za stanice domaćina i time potpomažu pričvršćivanje bakterije i na biotičke površine kako što su epitelne stanice u plućima ljudi. Osim toga stagnacija vode u distribucijskim sustavima potpomaže kolonizaciju biofilma legionelom i povezana je s pojavom legionarske bolesti u bolnicama. Konstantan protok vode kroz sustav smanjuje prisutnost bakterije i onemogućuje vezanje za površinu, ali već stvoreni biofilmovi u sustavu cijevi otporni su i na turbulentan protok vode vjerojatno jer se bakterije mogu lokalizirati u sedimentu koji ih štiti od turbulencije [35], [32]. Još jedan čimbenik koji utječe na stvaranje i kolonizaciju biofilma je prisutnost željeza koje je važan čimbenik za rast

mnogih mikroorganizama i može utjecati na replikaciju legionele. Prisutnost kelatora željeza kao što je laktoferin direktno uništava bakterije *L. pneumophila*, a prisutnost željeznih soli inhibira stvaranje biofilma *Pseudomonas aeruginosa*. Iako je željezo esencijalno za preživljavanje legionele, prevelike koncentracije željeza inhibiraju stvaranje biofilma jer potpomažu stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta [33], [35].

L. pneumophila kolonizira viševrsne biofilmove pa uspješnost kolonizacije i stvaranja biofilma ovisi o prisutnosti drugih bakterijskih vrsta u biofilmu. *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium sp.*, *Empedobacter breve*, *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas fluorescens* bakterijske su vrste koje promoviraju opstojnost i kolonizaciju bakterije *L. pneumophila* u viševrsnim biofilmovima. Ove bakterije sintetiziraju kapsularni i izvanstanični matriks koji promiče pričvršćivanje na površinu i pruža čimbenike rasta koji stimuliraju rast i razmnožavanje legionele. Druge bakterijske vrste kao *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Acidovorax sp.* i *Sphingomonas sp.* imaju antagonističko djelovanje na opstojnost legionele u biofilmu [33]. Inhibitorni učinak *P. aeruginosa* na kolonizaciju biofilma legionelom poništava prisutnost *K. pneumoniae* što ukazuje na to da kolonizacija biofilma legionelom nije određena samo brojem bakterijskih vrsta u biofilmu već i prirodom interakcija među tim vrstama [33], [37].

Viševrsni biofilmovi su meta protozoa kojima predstavljaju izvor nutrijenata što legionela iskorištava kako bi nastanila protozoe i replicirala se unutar njih. Zbog toga se prisutnost protozoa u vodi smatra rizičnim čimbenikom koji povećava mogućnost kontaminacije vode legionelom. Kao unutarstanični parazit *L. pneumophila* zaštićena je od biocidnih sredstava koja se koriste za dezinfekciju vode, okolišnih stresora, a kada nastanjena u termotolerantnoj amebi opstaje u vodi i nakon termalne obrade [35]. Razmnožavanjem u amebama kao što je *Acanthamoeba castellanii* povećava se kapacitet bakterije za stvaranje polisaharida što može poboljšati mogućnost stvaranja biofilma [38]. Izlaganjem legionele prisutne

u biofilmu biocidnim sredstvima može potaknuti ulazak u vijabilno-nekulturabilno stanje iz kojega je teško procijeniti razinu kontaminacije jer da bi se dobio stvaran broj bakterija potrebno je ko-kulturiranje *L. pneumophila* i ameba [39].

Od endogenih čimbenika za stvaranje biofilma bitna je detekcija kvoruma (eng. *quorum sensing*) koja je inače jedan od presudnih čimbenika za stvaranje biofilma, a temelji se na komunikaciji autoinduktorskim molekulama putem kojih se detektira je li gustoća stanica dovoljna za aktiviranje gena odgovornih za virulenciju u koje spadaju i geni povezani s biofilmom [29]. Kod bakterija *L. pneumophila* otkrivene su molekule α-hidroksi ketona za koje nije točno utvrđeno da utječu na stvaranje biofilma, ali slične molekule proizvodi *Vibrio cholera* i te molekule reguliraju virulenciju, proizvodnju izvanstaničnog matriksa i sedimentaciju preko gena koji čine sustav gena detekcije kvoruma karakterističan bakteriji *L. pneumophila* (*Lqs* skraćenica od eng. *Legionella quorum sensing*). Osim toga sekundarni glasnik ciklički di-GMP (c-di-GMP) važan je čimbenik u formaciji biofilma kod većine bakterija. *L. pneumophila* ima 22 gena povezana s proizvodnjom, razgradnjom i prepoznavanjem c-di-GMP-a. Za sada samo jedan gen, *lpg1057*, koji kodira enzim koji proizvodi c-di-GMP koji promovira stvaranje biofilma, ima dokazani utjecaj na stvaranje jednovrsnog biofilma *L. pneumophila*. Osim toga za flagelarni sigma čimbenik, FliA, pretpostavlja se da ima ulogu u stvaranju biofilma jer delecija *fliA* rezultira smanjenjem stvaranja biofilma [35].

2. CILJ RADA

Cilj ovoga istraživanja je ispitati učinak amfifilnog porfirina na razaranje šest dana starog biofilma bakterije *Legionella pneumophila*, tj. odrediti potencijal PS-a za razaranje šest dana starog biofilma pri različitim temperaturama i koncentracijama ispitivanog spoja kako bi se utvrdilo može li se potencijalni učinak razaranja biofilma koristiti kao antibakterijsko sredstvo pri dezinfekciji umjetno stvorenih vodenih sustava.

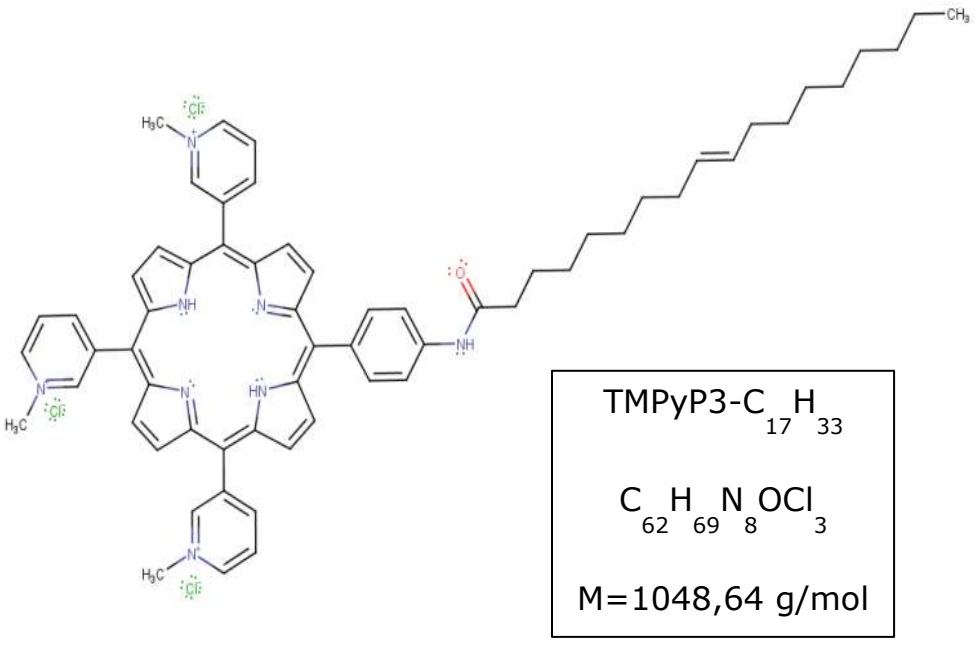
3. MATERIJALI I METODE

3.1 Pribor i uređaji

- plastične mikrobiološke ušice („eze“)
- plastične Petrijeve zdjelice
- mikrotitarske pločice (96 well, ROLL Piove di Sacoo, Italija)
- autoklavirana voda iz slavine
- staklene epruvete (15 mL) s čepom
- ultrazvučna kupelj (Bandelin-BactoSonic, Njemačka)
- spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- inkubator (Termo-medicinski aparati, Bodalec & Havoić, Dugo Selo -
- Zagreb, Hrvatska)
- LED lampa - 394 nm, 40 mW/cm^2 (Laboratorij za fotoniku i kvantnu optiku Zavoda za eksperimentalnu fiziku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska)
- plastične kivete za spektrofotometriju
- šprice
- filteri
- aluminijska folija (Alluminio Brian Roll, Italija)
- BCYE (engl. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) agar
- multikanalna pipeta 0,5 - 300 µL (Transferpette S-8, Njemačka)
- automatske mikropipete (Gilson, SAD):
    - 2 - 20 µL
    - P100 (20 - 100 µL)
    - P200 (50 - 200 µL)
    - 200- 1000 µL
- nastavci za pipete (Gilson, SAD)
- miješalica (Kartell TK35)

3.2 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin

Za izvedbu ovoga istraživanja koristio se amfifilni porfirin 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin čija je kratica TMPyP3-$C_{17}H_{33}$ (Slika 7.). Molarna masa spoja iznosi 1048,64 g/mol. Sintetiziran je u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja na Odjelu za biotehnologiju, a opisan je u radu [21]. Istraživački dio rada proveden je na Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Izvagano je 1,6 mg spoja te je pripremljena *stock* otopina koncentracije 180 μM. *Stock* otopina je profiltrirana te pohranjena u staklenu epruvetu zamotanu u aluminijsku foliju radi zaštite spoja od svjetlosti. Epruveta sa *stock* otopinom čuvana je u hladnjaku na temperaturi od +4 °C.



Slika 7. Kemijska struktura amfifilnog porfirina TMPyP3-$C_{17}H_{33}$

3.3 Bakterijski soj

U istraživanju korištena je Gram-negativna bakterija *Legionella pneumophila*, soj 130b. Bakterije suspendirane u 10 %-tnom glicerol bujonu alikvotirane su i čuvane u zamrzivaču na -80 °C. Da bi se mogle koristiti u istraživanju potrebno ih je nasaditi na BCYE (eng. *Buffered*

Charcoal Yeast Extract) agar uz inkubaciju pri 35±2 °C tijekom 3-5 dana (Slika 8.).

3.4 Medij i hranjiva podloga

3.4.1 Vodovodna voda iz slavine

Primjena amfifilnog porfirina u fotodinamičkoj inaktivaciji na legionele ispitivana je u vodovodnoj vodi iz slavine koja je uobičajeno stanište bakterija koje su nalaze u umjetno stvorenim sustavima voda. Korištena voda je autoklavirana pri 121 °C (15 min.) kako bi se otklonila prisutnost ostalih mikroorganizama iz vode i istovremeno inaktivirao rezidualni klor.

3.4.2 BCYE (eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) agar

Ova podloga je selektivna za legionele. BCYE agar sadrži: 10 g ACES pufera (*N*-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid), 2 g aktivnog ugljena, 10 g kvaščevog ekstrakta, 1 g α-ketoglutarata, 20 g agara i 900 mL sterilne, destilirane vode. pH je namješten pomoću 10 M KOH na 6,9±0,2. Smjesa je autoklavirana pri standardnim uvjetima te je u nju dodano 10 mL $Fe(NO_3)_2$ i 10 mL L-cisteina (hidrokloridni monohidrat). Pripremljena podloga nakon što se ohladi na 50 °C izlivena je u sterilne Petrijeve zdjelice na debljinu od oko 4 mm te pohranjena u hladnjaku na +4 °C (Slika 8.).



Slika 8. Porast bakterije *Legionella pneumophila* na BCYE agaru. Bakterije su prethodno suspendirane u 10 %-tnom glicerol bujonu, alikvotirane i čuvane u zamrzivaču na -80 °C, nakon čega su nasađene na BCYE agar uz inkubaciju pri 35±2 °C tijekom 3-5 dana.

3.5 Bakterijski inokulum

Broj bakterija određivan je spektrofotometrijskom metodom pomoću spektrofotometra (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka). U epruveti od 15 mL dodano je oko 5 mL sterilne vode iz slavine te su sterilnom, plastičnom mikrobiološkom ušicom pokupljene kolonije legionela s BCYE agara koje su nacijepljene u sterilnu vodu iz slavine te homogenizirane na mješalici (Kartell TK35, Italija). U plastičnu kivetu za spektrofotometriju dodana je sterilna voda iz slavine korištena u istraživanju kao slijepa proba. Optička gustoća bakterijske suspenzije namještena je razrjeđivanjem na OD1 (OD eng. *Optical Density*) što odgovara koncentraciji bakterija od $1x10^9$ CFU/mL (eng. *colony-forming unit*). Serijskim deseterostrukim razrjeđenjima priredila se bakterijska suspenzija koncentracije bakterija od $1x10^6$ CFU/mL koje se koristila dalje u provođenju istraživanja.

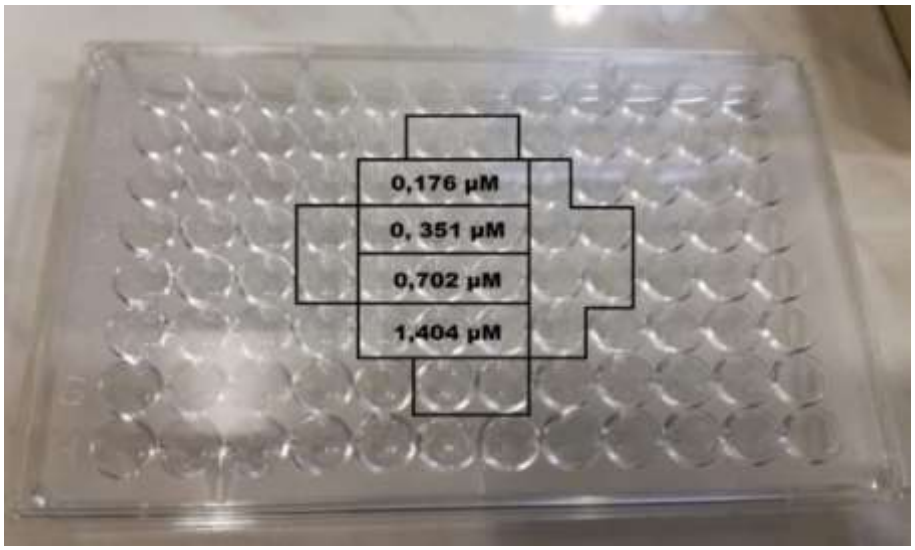
3.6 Stvaranje biofilma *Legionella pneumophila*

U 12 jažica na svakoj od dvije korištene mikrotitarske pločice (96 well, ROLL Piove di Sacoo, Italija) naneseno je po 200 µL već pripremljene bakterijske suspenzije ($1x10^6$ CFU/mL) te su pločice stavljene na inkubaciju, jedna pri temperaturi od 25 °C, a druga pri temperaturi od 37 °C kroz vremenski period od šest dana kako bi se formirao biofilm. U sve preostale jažice na mikrotitarskoj pločici dodano je 200 µL sterilne vodovodne vode kako voda iz bakterijske suspenzije ne bi isparila za vrijeme inkubacije.

3.7 Razaranje biofilma legionela pomoću amfifilnog porfirina

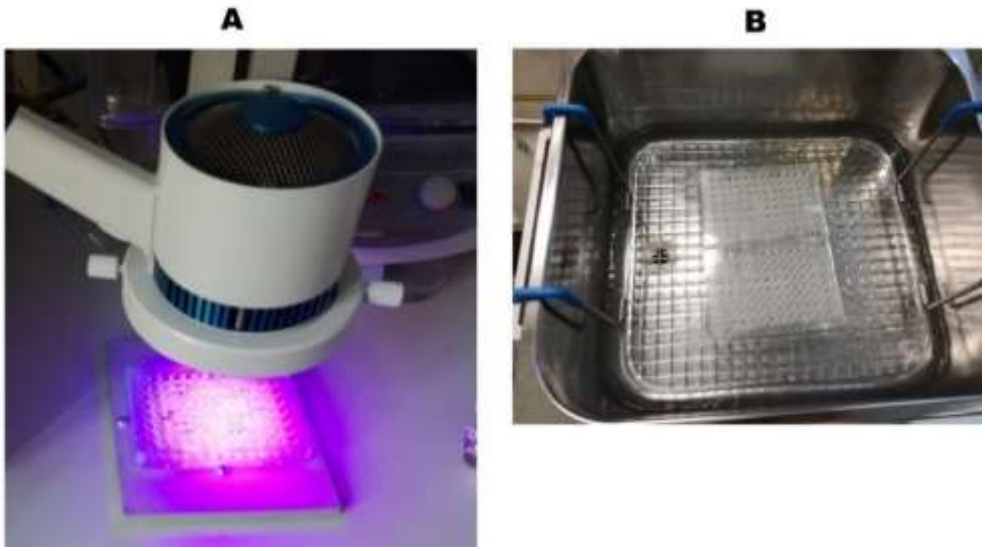
Iz štok otopine ispitivanog spoja koncentracije 180 µM pripremljena je otopina koncentracije 1,404 µM iz koje su dvostrukim serijskim razrjeđenjima priređene otopine koncentracija 0,702 µM, 0,351 µM i 0,176 µM. Nakon šest dana inkubacije uklonjena je bakterijska suspenzija te su jažice u kojima se nalazila dva puta isprale sterilnom vodovodnom vodom. Voda je također uklonjena te je dodano 200 µL ispitivanog spoja određene koncentracije u po tri jažice za svaku navedenu koncentraciju ispitivanog spoja (Slika 9.). Pločice su pokrivene aluminijskom folijom kako bi se

zaštitio ispitivani spoj od utjecaja sunčeve svjetlosti za vrijeme inkubacije u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacije pločica je izložena svjetlosti u trajanju od 10 minuta (Slika 10. (A)). Kao izvor svjetlosti korištena je LED lampa (eng. *Light Emitting Diode*) valne duljine λ=394 nm i intenziteta 40 mW/cm^2. Izvor homogenog monokromatskog svjetla nije ravnomjerno osvjetljavao cijelu površinu mikrotitarske pločice pa su uzorci bakterija naneseni unutar područja koje je ravnomjerno osvjetljivano.



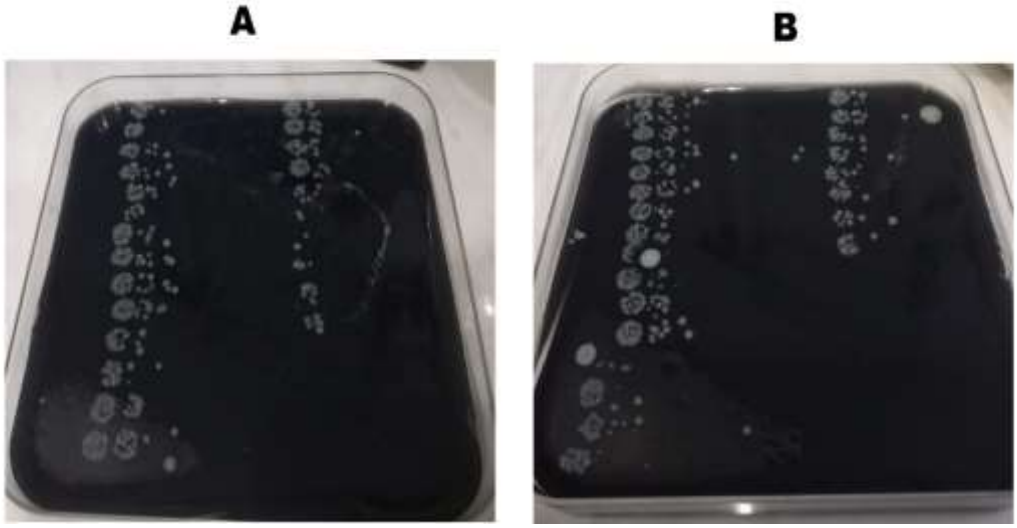
Slika 9. Prikaz područja koje ravnomjerno osvjetljava LED lampa (λ=394 nm i intenzitet 40 mW/cm^2) korištena kao izvor svjetlosti pri fotodinamičkoj inaktivaciji amfifilnog porfirina te naznačene jažice u kojima se nalazila bakterijska suspenzija tretirana koncentracijama od 0,176 µM, 0,351 µM, 0,702 µM i 1,404 µM ispitivanog spoja

Nakon izlaganja obje mikrotitarske pločice svjetlosti, inkubirane su pri temperaturi od 35±2 °C kroz 24 sata. Nakon perioda inkubacije bakterijski biofilm ispran je dva puta sterilnom vodovodnom vodom, kako bi se isprale neadherentne bakterije. Nakon ispiranja mikrotitarska pločica je uronjena u ultrazvučnu kupelj (Bandelin-BactoSonic, Njemačka) te sonificirana kroz 1 minutu pri snazi 200 W i frekvenciji 40 kHz kako bi se bakterije u biofilmu odlijepile od površine pločice (Slika 10. (B)).



Slika 10. Prikaz aparature (A) korištene kao izvor svjetlosti-LED lampa (λ=394 nm i intenzitet 40 mW/cm^2). (B) za sonificiranje bakterijskog biofilma-ultrazvučna kupelj (snaga 200 W i frekvencija 40 kH)

Pipetom je resuspendiran tretirani bakterijski biofilm s površine jažica te prenesen u novu mikrotitarsku pločicu gdje se serijskim deseterostrukim razrjeđenjima odredio broj bakterija u uzorku. Na BCYE agar naneseno je automatskom pipetom (Gilson, SAD) u duplikatu po 10 µL iz svake jažice. Rezultati su očitavani nakon inkubacije pri 35±2 °C kroz 3-5 dana brojanjem poraslih kolonija (Slika 11.).



Slika 11. Prikaz izraslih kolonija na BCYE agaru nakon tretiranja ispitivanim spojem (koncentracije spoja od 0,176 µM, 0,351 µM, 0,702 µM i 1,404 µM, 30 minuta inkubacije i 10 minuta osvjetljavanja LED lampom (λ=394 nm i intenzitet 40 mW/cm^2)) za bakterijski biofilm stvoren tijekom 6-dnevne inkubacije pri (A) 25 °C (B) 37 °C

Kao negativna kontrola u istraživanju poslužio je šestodnevni biofilm stvoren pri temperaturama od 25 °C i 37 °C koji nije tretiran spojem ni svjetlom. Kontrolni biofilm na kojemu se ispitivao utjecaj svjetlosti na šestodnevni biofilm stvoren pri temperaturama od 25 °C i 37 °C izložen je izvoru svjetlosti u trajanju od 10 minuta (λ=394 nm i intenziteta 40 mW/cm^2) kao i biofilm tretiran spojem i svjetlom. Kontrolni biofilm na kojemu se ispitivao utjecaj neosvijetljenog spoja na šestodnevnom biofilmu stvorenom pri temperaturama od 25 °C i 37 °C tretiran je spojem koncentracije 1,404 μM (30 minuta inkubacija). Koncentracija bakterija u kontrolnim biofilmovima određena je kao i za biofilm tretiran spojem i izložen izvoru svjetlosti.

3.8 Statistička obrada podataka

Eksperimentalno dobiveni podaci statistički su obrađeni u računalnom programu Excel kako bi se mogli grafički prikazati. Za izradu grafičkih prikaza korištene su vrijednosti izražene kao srednje vrijednosti obrađenih podataka uz koje je navedena i pripadajuća standardna devijacija. Podaci o tretiranom biofilmu obrađeni su u odnosu na negativnu kontrolu, odnosno šestodnevni bakterijski biofilm koji nije tretiran ispitivanim spojem.

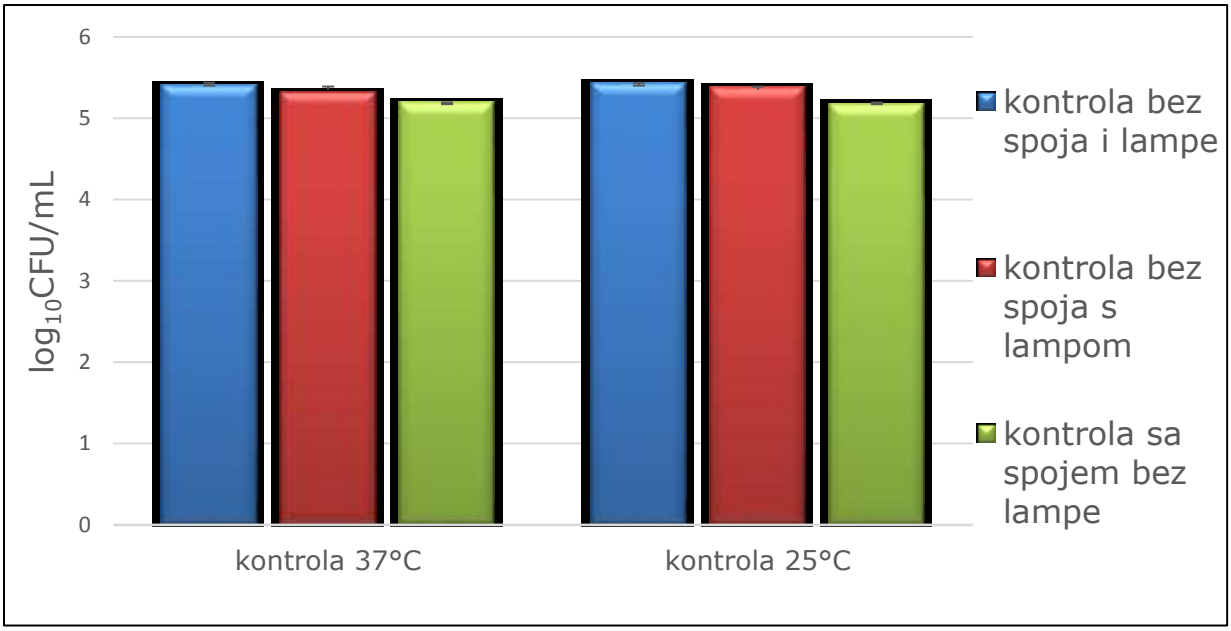
4. REZULTATI

4.1 Minimalna efektivna koncentracija (MEK) ispitivana dilucijskom metodom

U prethodno provedenim eksperimentima s istim spojem određivana je MEK vrijednost . Eksperimenti su provedeni u mraku i na svjetlu s različitim vremenima inkubacije. Kao izvor svjetlosti korištena je LED lampa (λ=394 nm i intenzitet 40 mW/cm^2). MEK vrijednost ispitivana je u sterilnoj vodi iz slavine. MEK vrijednost je iznosila 0,391 μM. MEK vrijednosti spoja nakon djelovanja u mraku iznosila je 6,25 μM [40].

4.2 Utjecaj amfifilnog porfirina na šestodnevni biofilm bakterija *Legionella pneumophila*

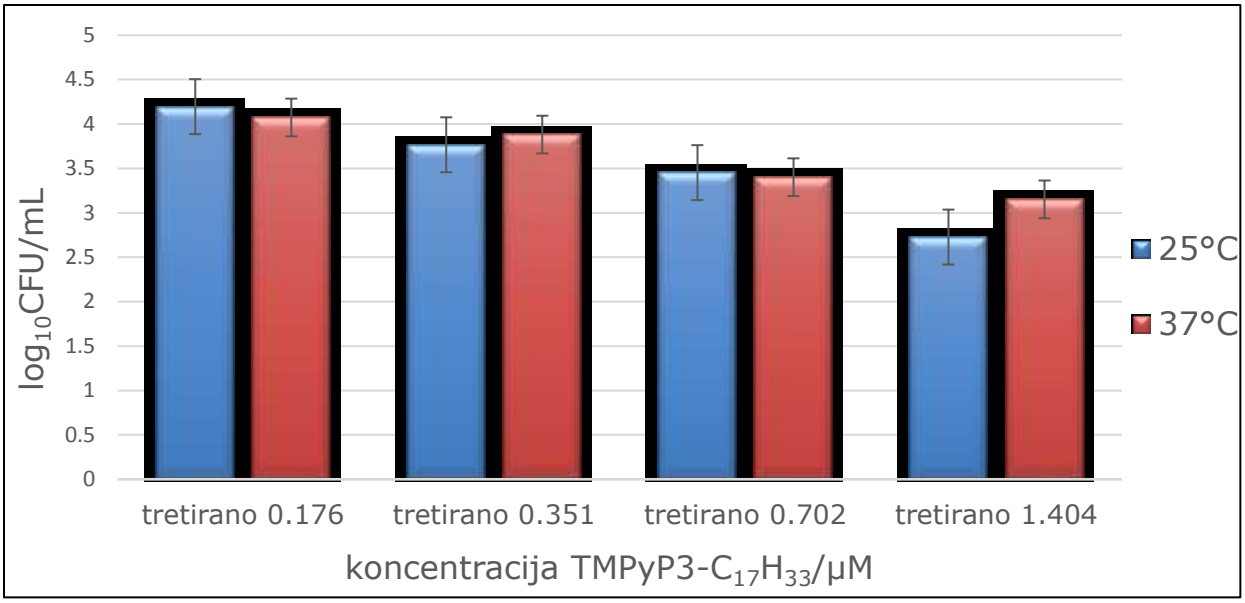
Kao negativna kontrola u ovom istraživanju poslužio je šest dana star biofilm stvoren pri temperaturama 25 °C i 37 °C koji nije tretiran spojem. Predstavlja sposobnost stvaranja biofilma na polistirenu pri različitim temperaturama. Kontrolni biofilmovi na kojima je ispitivan utjecaj svjetlosti i samoga spoja na šestodnevni biofilm ne razlikuju se značajno od biofilma koji nije tretiran spojem ili svjetlom (Slika 12.). Ove kontrole govore može li se učinkovitost PDI-e biofilma postignuta u ovom istraživanju pripisati drugim čimbenicima kao djelovanju samoga spoja na biofilm ili utjecaju svjetlosti.



Slika 12. Grafički prikaz sposobnosti stvaranja biofilma kroz 6 dana inkubacije pri temperaturi od 25 °C i 37 °C (kontrola „bez spoja i lampe"), nakon izlaganja svjetlosti kroz 10 minuta (LED lampa, λ=394 nm i intenzitet 40 mW/cm^2) 6-dnevnog biofilma stvorenog pri temperaturama od 25 °C i 37 °C (kontrola „bez spoja s lampom") i nakon primjene amfifilnog porfirina (1,404 μM, 30 minuta inkubacije) na 6-dnevni biofilm stvoren pri temperaturama od 25 °C i 37 °C bez izlaganja izvoru svjetlosti (kontrola „sa spojem bez lampe"). Koncentracija je određena nasađivanjem serijskih deseterostrukih razrjeđenja te brojanjem poraslih kolonija na BYCE agaru nakon 3-5 dana inkubacije pri 35±2 °C.

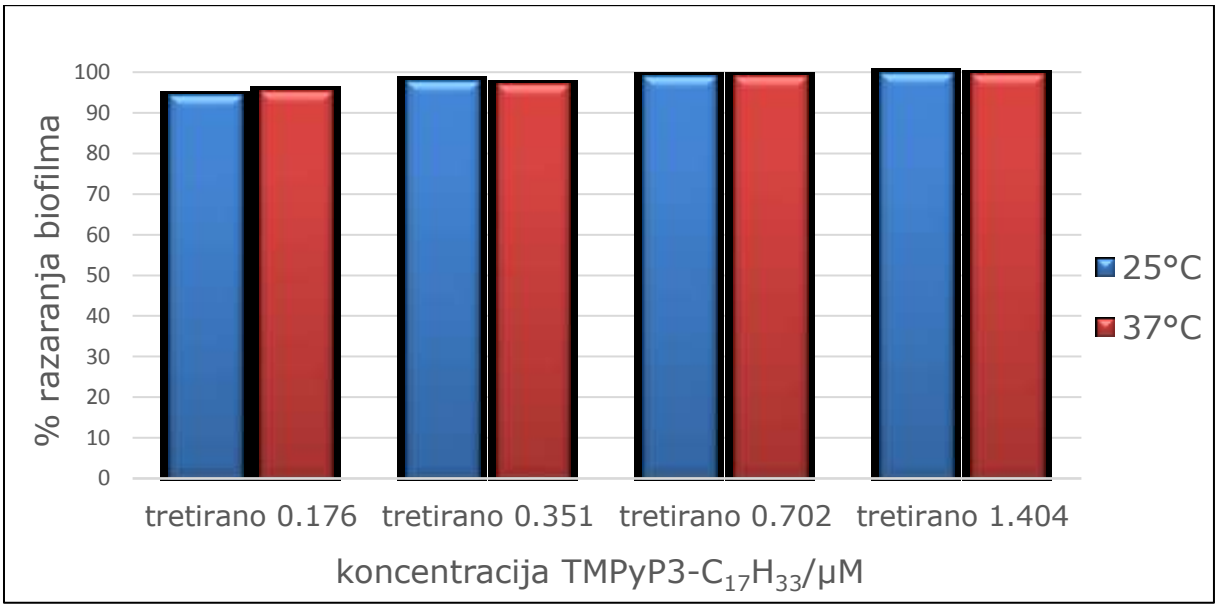
Za ispitivanje učinka fotodinamičke inaktivacije amfifilnog porfirina korišten je šestodnevni bakterijski biofilm stvoren pri temperaturama 25 °C i 37 °C. Oba biofilma tretirana su pod istim uvjetima (30 min. inkubacije u mraku, 10 min. osvjetljavanja LED lampom (λ=394 nm i intenzitet 40 mW/cm^2). Nakon nasađivanja na BCYE agar i 24 h inkubacije očitani su rezultati. Uz stalne parametre istraživanja (vrijeme inkubacije i osvjetljavanja, intenzitet svjetlosti i valna duljina) dokazano je da djelovanje spoja ovisi o koncentraciji tj. s porastom koncentracije ispitivanog spoja uočen je veći postotak razaranja biofilma. Nije bilo značajne razliku u djelovanju amfifilnog porfirina na bakterijski biofilm stvoren pri temperaturi 25 °C od bakterijskog biofilma stvorenog pri temperaturi od 37 °C.

Na Slici 13. grafički su prikazani rezultati dobiveni brojanjem poraslih kolonija na BCYE agaru nakon tretiranja biofilma. Srednje vrijednosti prikazane su kao dekadski logaritam.



Slika 13. Grafički prikaz razaranja 6-dnevnog biofilma (25°C i 37°C) *L. pneumophila* za doze amfifilnog porfirina od 0,176 μM, 0,351 μM , 0,702 μM i 1,404 μM. Rezultati su dobiveni inkubacijom od 30 min. i 10-minutnim osvjetljavanjem tretiranog biofilma LED lampom valne duljine λ=394 nm i intenziteta 40 mW/cm^2

Na Slici 14. prikazan je postotak inhibicije za isti tretirani biofilm dobiven prema formuli: $100 - \%poraslih\ bakterija\ nakon\ tretmana$, % poraslih bakterija nakon tretmana određen je formulom: $\frac{br.\ bakterija\ nakon\ tretmana\ određenom\ koncentracijom\ (srednja\ vrijednost)}{br.\ bakterija\ u\ negativnoj\ kontroli\ (srednja\ vrijednost)} \times 100$



Slika 14. Grafički prikaz ovisnosti razaranja biofilma (%) o koncentraciji ispitivanog spoja. Rezultati su dobiveni inkubacijom od 30 min. i 10-minutnim osvjetljavanjem tretiranog biofilma LED lampom valne duljine λ=394 nm i intenziteta 40 mW/cm^2

5. RASPRAVA

Ispitivani spoj je trikationski, amfifilni porfirin. Zahvaljujući pozitivnom naboju pokazao se učinkovitim u fotodinamičkoj inaktivaciji Gram-negativne bakterije *L. pneumophila* jer lako stupa u elektrostatske interakcije s negativno nabijenim vanjskim slojem, lipopolisaharidom. Zbog takvih interakcija ovaj porfirin mogao bi se primijeniti kao PS u PDI-i Gram-negativnih bakterija bez dodatne primjene membranskih disruptora kao što su Tris-EDTA, polimiksin B ili $CaCl_2$. Ovaj porfirin ima tri pozitivna naboja, ali utjecaj broja naboja na učinkovitost PDI-e nije moguće sa sigurnošću utvrditi jer rezultati istraživanja variraju.

U istraživanju gdje su korištena dva *meso*-supstituirana tetrakationska porfirina T_4MPyP i T_4-MAP i jedan tetraanionski *meso*-supstituirani porfirin $TPPS_4$ kao PS-i u PDI-i bakterija *Enterococcus seriolicida* (G+), *Vibrio anguillarum* i *Escherichia coli* (G-) pokazano je da su svi porfirini imali sličan utjecaj na Gram-pozitivne bakterije, ali da su tetrakationski porfirini bili učinkovitiji u inaktivaciji Gram-negativnih bakterija od tetraanionskog porfirina, koji nije imao zamjetnu učinkovitost u inaktivaciji, iako su imali sličnu distribuciju u stanicama. Koncentracija porfirina je bila 10 μg/mL i korištene su četiri volframove lampe (snaga 250 W, intenzitet 6 mW/cm^2) [28]. Istraživanje provedeno na bakterijama *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (G-) i *Staphylococcus aureus (*G+) u kojemu je korišteno sedam PS-a pokazalo je da je neutralni PS najmanje učinkovit u PDI svih bakterijskih vrsta. Gram-negativne bakterije učinkovitije su inaktivirane kationskim porfirinima, a najučinkovitiji pokazao se dikationski porfirin, koji se pokazao učinkovitijim od tetrakationskih porfirina [25]. Nasuprot tome, istraživanje na bakterijama *Enterococcus faecalis* (G+) i *Escherichia coli* (G-) pokazalo je da su tetrakationski porfirini korišteni u tom istraživanju učinkovitiji od dikationskih i monokationskih porfirina. Najučinkovitijim PS-ima u inaktivaciji *E. coli* pokazali su se trikationski Tri-Py^+-Me-PF i Tri-Py^+-

Me-CO_2Me primijenjeni u koncentraciji od 5,0 μM i izloženi bijeloj svjetlosti (doza svjetlosti 64,8 J/cm^2) [24].

Osim pozitivnog naboja, amfifilnost porfirina korištenog u ovom istraživanju pozitivno utječe na učinkovitost PDI-e jer za razliku od potpuno hidrofilnih molekula, amfifilne molekule mogu proći staničnu membranu koja je sačinjena od fosfolipidnog dvosloja koji je lipofilan. Hidrofilni dio molekule omogućuje otapanje u vodi, a lipofilni dio molekule koji čini nezasićeni ugljikovodični lanac od sedamnaest ugljikovih atoma omogućuje lakši prolazak kroz staničnu membranu i akumulaciju spoja unutar stanice što utječe na učinkovitost PDI-e. Kako singletni kisik ima kratak poluživot, domet djelovanja je uzak pa je poželjno da se spoj akumulira unutar stanice gdje singletni kisik može izazvati željeni učinak. Usporedbom amfifilnog porfirina TMPyP3-$C_{17}H_{35}$, koji se razlikuje od spoja korištenog u ovom istraživanju za samo jednu dvostruku vezu, s hidrofilnim analogom TMPyP3-CH_3 utvrđeno je da je lipofilni ugljikovodični lanac povećao učinkovitost PDI-e što dodatno potkrjepljuje važnost amfifilnog karaktera PS-a u PDI-i [21].

Prisutnost biofilmova predstavlja značajan problem u zdravstvu i industriji jer smanjuju protok tvari kroz cijevi, prisutni su kod većine infekcija, povećavaju otpornost bakterija na biocidna sredstva i nastaju na različitim površinama, od implantata do tkiva u živim bićima. Sveprisutnost biofilmova i porast rezistentnosti bakterija na antibiotike stvara potrebu razvijanja novih metoda eradikacije bakterija u biofilmu. Fotodinamička inaktivacija kao metoda inaktivacije biofilma ima prednost kombinacije netoksičnog PS-a i svjetla koji tek nakon izlaganja PS-a svjetlu daju željeni učinak. Istraživanje u kojemu je korijenski kanal inficiran bakterijom *E. faecalis* tretiran metilen plavim (inkubacija 5 minuta, 25 μg/mL, crvena svjetlost λ=665 nm, doza 222 J/cm^2) dovelo je do inaktivacije 97 % biofilma [41]. Koristeći δ-aminolevulinsku kiselinu kao PS u tretiranju *P. aeruginosa* u biofilmu i u planktonskom obliku došlo je do potpune eradikacije bakterija u planktonskom obliku koristeći PS u koncentraciji 10 mM nakon osvjetljavanja LED lampom (λ=630 nm, intenzitet 100 mW/cm^2, doza 240

J/cm^2) ili u koncentraciji od 7,5 mM i uz dozu svjetlosti od 360 J/cm^2. Odsutnost vijabilnih stanica iz biofilma postignuta je pri koncentraciji PS-a od 20 mM i dozi svjetlosti 240 J/cm^2, ali nakon vraćanja biofilma u sterilne uvjete uočen je ponovni rast bakterija što bi se moglo spriječiti ponavljanjem postupka [42].

Biofilm bakterije *L. pneumophila* predstavlja problem za zdravstvenu ispravnost vode jer povećava otpornost bakterije koja je sveprisutna u vodoopskrbnim sustavima i teško ju je u potpunosti eradicirati postojećim metodama dezinfekcije. Zbog toga je u ovom istraživanju ispitivana mogućnost primjene PDI-e na inaktivaciju biofilma *L. pneumophila*. Prijašnjim istraživanjem za spoj korišten u ovom istraživanju utvrđeno je da pokazuje određenu toksičnost u mraku na bakterije *L. pneumophila* s minimalnom efektivnom koncentracijom od 6,25 μM [40]. Zbog dokazane toksičnosti u mraku spoj je pogodniji za primjenu u dezinfekciji voda, nego kao lijek koji bi se na različite načine administrirao ljudima radi potencijalnog neželjenog, toksičnog učinka prije izlaganja svjetlu. Ovim istraživanjem utvrđena je učinkovitost PDI-e kao metode inaktivacije biofilma *L. pneumophila* i mogućnost potencijalnog korištenja metode za osiguravanje zdravstvene ispravnosti vode. Tretiranjem šestodnevnog biofilma *L. pneumophila*, stvorenog pri temperaturama od 25 °C i 37 °C, različitim koncentracijama amfifilnog porfirina TMPyP3-$C_{17}H_{33}$ (0,176 μM, 0,351 μM, 0,702 μM i 1,404 μM, inkubacija 30 minuta) i nakon izlaganja LED lampi (λ=394 nm, intenzitet 40 mW/cm^2, 10 minuta) postignut je postotak inaktivacije viši od 90 % za sve navedene koncentracije. Biofilm tretiran koncentracijom PS-a od 1,404 μM metodom PDI-e inaktiviran je za 99,80 % (25 °C), odnosno za 99,44 % (37 °C). Nije utvrđena značajna razlika u inaktivaciji biofilma stvorenog pri temperaturi od 25 °C od onoga stvorenog pri 37 °C pa se ne može reći da je temperatura pri kojoj je stvaran biofilm utjecala na učinkovitost PDI-e u ovome slučaju. Budući da nema značajne razlike između negativne kontrole, kontrolnog biofilma izloženom izvoru svjetlost i kontrolnog biofilma tretiranog sami spojem,

učinkovitost PDI-e šestodnevnog biofilma postignuta u ovom istraživanju ne može se pripisati utjecaju svjetlosti niti samoga spoja, već je rezultat stvaranja singletnog kisika i/ili ostalih reaktivnih kisikovih vrsta uslijed izlaganja PS-a izvoru svjetlosti.

Trenutno najučestalije metode dezinfekcije voda su termalna dezinfekcija, kloriranje, hiperkloriranje, dezinfekcija pomoću UV svjetlosti. Hiperkloriranje uz termalnu dezinfekciju, koja se provodi propuštanjem vode na temperaturi iznad 60 °C kroz sve izlazne točke vodoopskrbnog sustava, jedna je od najčešćih metoda eradikacije legionele. Tretiranjem izolata bakterije *L. pneumophila* s osam različitih dezinficijensa pokazalo je neučinkovitost hiperkloriranja kao metode eradikacije jer je jedan klon, pronađen na brodovima, u bolnicama i hotelima, iz serogrupe 1 preživio višegodišnje tretmane hiperkloriranja. Spojevi koji se koriste pri hiperkloriranju nemaju dovoljno dobru penetraciju bakterijskog biofilma zbog čega se proliferacija bakterija javlja ubrzo nakon prestanka tretmana [43]. Povećanje temperature kao metoda korisno je dok se provodi konstantno, čim se temperatura spusti ispod 55 °C javlja se proliferacija legionele. U istraživanju biofilma prije i nakon dvije termalne dezinfekcije (druga u kombinaciji s biocidima i biodisperzantima) vode *Legionella spp.* prisutne su u oba slučaja što dokazuje neučinkovitost termalne dezinfekcije na legionele u biofilmu [44]. Osvjetljavanje UV svjetlošću učinkovita je metoda samo na uskom području primjene i nije primjenjiva na čitav vodoopskrbni sustav kao samostalna metoda eradikacije legionele [45].

6. ZAKLJUČAK

PDI kao metoda inaktivacije biofilma *L. pneumophila* pokazala se učinkovitom s postotkom inaktivacije >90 % za sve koncentracije amfifilnog porfirina. Učinkovitosti inaktivacije biofilma Gram-negativne bakterije *L. pneumophila* pridonijeli su amfifilni karakter i pozitivan naboj PS-a koji osiguravaju akumulaciju unutar stanice i ostvarivanje elektrostatskih interakcija s LPS-om te odabir svjetlosti valne duljine 394 nm zbog svojstva vode da se ponaša kao filter. Kombinacijom svega navedenog postignuta je inhibicija šestodnevnog biofilma od 99,80 % (25 °C) i 99,44 % (37 °C) nakon tretiranja koncentracijom PS-a od 1,404 μM. Učinkovitost PDI-e biofilma u ovome istraživanju ne može se pripisati utjecaju svjetlosti ili samoga spoja, već nastaje nakon izlaganja PS-a izvoru svjetlosti. U usporedbi s drugim metodama dezinfekcije voda PDI, u ovom slučaju, učinkovito je inaktivirala biofilm pri relativno niskim koncentracijama PS-a nakon 10 minuta izlaganja izvoru svjetlosti. Trenutne metode kao kloriranje stvaraju štetne nus-produkte koji zaostaju u vodi nakon dezinfekcije ili nisu učinkovite na dulji vremenski period pogotovo kada se radi o bakterijama u biofilmu. Zbog uspješne inaktivacije šestodnevnog biofilma ova metoda ima potencijal za primjenu u praksi za dezinfekciju voda, a korisno bi bilo ispitati učinkovitost metode na viševrsni bakterijski biofilm koji kolonizira *L. pneumophila* i mogućnost imobilizacije PS-a na nosač kako bi se omogućila lakša višekratna uporaba i onemogućilo zaostajanje spoja i kontaminacija vode.

7. LITERATURA

[1] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 14th ed. San Francisco: Pearson; 14 edition, 2015.

[2] C. Guyard and D. E. Low, "Legionella infections and travel associated legionellosis.," *Travel Med. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 4, pp. 176–186, Jul. 2011.

[3] J. P. Springston and L. Yocavitch, "Existence and control of Legionella bacteria in building water systems: A review.," *J. Occup. Environ. Hyg.*, vol. 14, no. 2, pp. 124–134, Feb. 2017.

[4] Y. S. Lin, J. E. Stout, V. L. Yu, and R. D. Vidic, "Disinfection of water distribution systems for Legionella.," *Semin. Respir. Infect.*, vol. 13, no. 2, pp. 147–159, Jun. 1998.

[5] W. C. M. A. de Melo *et al.*, "Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 11, no. 7, pp. 669–693, Jul. 2013.

[6] F. F. Sperandio, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, "Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria.," *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, vol. 8, no. 2, pp. 108–120, Aug. 2013.

[7] N. Malatesti, I. Munitic, and I. Jurak, "Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents.," *Biophys. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 149–168, Apr. 2017.

[8] G. B. Kharkwal, S. K. Sharma, Y.-Y. Huang, T. Dai, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy for infections: Clinical applications," *Lasers Surg. Med.*, vol. 43, no. 7, pp. 755–767, Sep. 2011.

[9] E. Alves, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, Â. Cunha, H. Nadais,

and A. Almeida, "Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 22, pp. 34–57, 2015.

[10] S. Rajesh, E. Koshi, K. Philip, and A. Mohan, "Antimicrobial photodynamic therapy: An overview.," *J. Indian Soc. Periodontol.*, vol. 15, no. 4, pp. 323–327, 2011.

[11] U. Chilakamarthi and L. Giribabu, "Photodynamic Therapy: Past, Present and Future.," *Chem. Rec.*, vol. 17, no. 8, pp. 775–802, Aug. 2017.

[12] A. A. Takasaki *et al.*, "Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases.," *Periodontol. 2000*, vol. 51, pp. 109–140, 2009.

[13] Sharman, Allen, and van L. JE, "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications.," *Drug Discov. Today*, vol. 4, no. 11, pp. 507–517, Nov. 1999.

[14] C.-L. Peng, P.-S. Lai, C.-C. Chang, P.-J. Lou, and M.-J. Shieh, "The synthesis and photodynamic properties of meso-substituted, cationic porphyrin derivatives in HeLa cells," *Dye. Pigment.*, vol. 84, no. 1, pp. 140–147, 2010.

[15] J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 549–553, Apr. 1991.

[16] T. A. Debele, S. Peng, and H.-C. Tsai, "Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 9, pp. 22094–22136, Sep. 2015.

[17] J. Kou, D. Dou, and L. Yang, "Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 46, pp. 81591–81603, Oct. 2017.

[18] L. Moreira, M. Maftoum Costa, C. Pacheco Soares, and N. Soares da

Silva, *Photodynamic Therapy: Porphyrins and Phthalocyanines as Photosensitizers*, vol. 61. 2008.

[19] T. P. Wijesekera and D. Dolphin, "Some preparations and properties of porphyrins.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 193, pp. 229–266, 1985.

[20] R. Giovannetti, "The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins," 2012.

[21] M. Jelovica *et al.*, "In Vitro Photodynamic Activity of N-Methylated and N-Oxidised Tripyridyl Porphyrins with Long Alkyl Chains and Their Inhibitory Activity in Sphingolipid Metabolism," *ChemMedChem*, vol. 13, no. 4, pp. 360–372, 2018.

[22] G. Rossi, D. Goi, and C. Comuzzi, "The photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus in water using visible light with a new expanded porphyrin.," *J. Water Health*, vol. 10, no. 3, pp. 390–399, Sep. 2012.

[23] L. Brancaleon and H. Moseley, "Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy.," *Lasers Med. Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 173–186, 2002.

[24] E. Alves *et al.*, "Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins.," *BMC Microbiol.*, vol. 9, p. 70, Apr. 2009.

[25] S. Banfi *et al.*, "Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 85, no. 1, pp. 28–38, 2006.

[26] Y. Liu, R. Qin, S. A. J. Zaat, E. Breukink, and M. Heger, "Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections.," *J. Clin. Transl. Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 140–167, Dec. 2015.

[27] K. A. D. F. Castro *et al.*, "New Materials Based on Cationic Porphyrins

Conjugated to Chitosan or Titanium Dioxide: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Efficacy.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 10, May 2019.

[28] M. Merchat, G. Bertolini, P. Giacomini, A. Villanueva, and G. Jori, "Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 32, no. 3, pp. 153–157, Feb. 1996.

[29] S. Kalenić, *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2013.

[30] T. Hindre, H. Bruggemann, C. Buchrieser, and Y. Hechard, "Transcriptional profiling of Legionella pneumophila biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation.," *Microbiology*, vol. 154, no. Pt 1, pp. 30–41, Jan. 2008.

[31] B. S. Fields, R. F. Benson, and R. E. Besser, "Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 3, pp. 506–526, Jul. 2002.

[32] J. Tai *et al.*, *Biofilm Formation by Legionella pneumophila in Water Distribution Systems: Role of Supports and Temperatures*, vol. 2012. 2012.

[33] A. Abu Khweek and A. O. Amer, "Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by Legionella pneumophila.," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, p. 38, 2018.

[34] M. Abdallah, C. Benoliel, D. Drider, P. Dhulster, and nour eddine Chihib, *Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments*, vol. 196. 2014.

[35] M. Abdel-Nour, C. Duncan, D. E. Low, and C. Guyard, "Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 11, pp. 21660–21675, Oct. 2013.

[36] Z. Piao, C. C. Sze, O. Barysheva, K. Iida, and S. Yoshida,

"Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by Legionella pneumophila.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 2, pp. 1613–1622, Feb. 2006.

[37] C. R. Stewart, V. Muthye, and N. P. Cianciotto, "Legionella pneumophila persists within biofilms formed by Klebsiella pneumoniae, Flavobacterium sp., and Pseudomonas fluorescens under dynamic flow conditions.," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e50560, 2012.

[38] R. Bigot, J. Bertaux, J. Frere, and J.-M. Berjeaud, "Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for Legionella.," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e77875, 2013.

[39] L. Alleron, N. Merlet, C. Lacombe, and J. Frere, "Long-term survival of Legionella pneumophila in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment.," *Curr. Microbiol.*, vol. 57, no. 5, pp. 497–502, Nov. 2008.

[40] J. Peradinović, "Tripiridilporfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela," Sveučilište u Rijeci, 2018.

[41] N. S. Soukos *et al.*, "Photodynamic therapy for endodontic disinfection.," *J. Endod.*, vol. 32, no. 10, pp. 979–984, Oct. 2006.

[42] C.-F. Lee, C.-J. Lee, C.-T. Chen, and C.-T. Huang, "delta-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on Pseudomonas aeruginosa planktonic and biofilm cultures.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 75, no. 1–2, pp. 21–25, Jul. 2004.

[43] M. T. Garcia *et al.*, "Persistence of chlorine-sensitive Legionella pneumophila in hyperchlorinated installations.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 3, pp. 837–847, Sep. 2008.

[44] M. Farhat, M. Moletta-Denat, J. Frère, S. Onillon, M.-C. Trouilhé, and E. Robine, "Effects of Disinfection on Legionella spp., Eukarya, and

Biofilms in a Hot Water System," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 19, pp. 6850 LP – 6858, Oct. 2012.

[45] L. Franzin, D. Cabodi, and C. Fantino, "Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated byLegionella," *J. Hosp. Infect.*, vol. 51, no. 4, pp. 269–274, 2002.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti i ko-mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin na pruženoj mogućnosti za izvođenje eksperimentalnog rada kao i za usmjeravanje, pomoć, znanje i iskustvo koje su podijelile sa mnom.

Zahvaljujem se svim članovima obitelji i prijateljima koji su mi bili pomoć i podrška tijekom cijeloga života, a posebno tijekom školovanja daleko od doma.