

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Kaća Piletić**

**UČINAK PLINOVITOG OZONA NA VIŠESTRUKO OTPORNE**  
**MIKROORGANIZME U BOLNIČKOJ SREDINI**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Kaća Piletić**

**UČINAK PLINOVITOG OZONA NA VIŠESTRUKO OTPORNE**  
**MIKROORGANIZME U BOLNIČKOJ SREDINI**

**Doktorski rad**

**Mentor: prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. san. ing.**

**Komentor: doc. dr. sc. Martina Oder, dipl. san. ing.**

**Rijeka, 2024.**

**UNIVERSITY OF RIJEKA**

**FACULTY OF MEDICINE**

**Kaća Piletić**

**THE EFFECT OF GASEOUS OZONE ON MULTIDRUG-  
RESISTANT MICROORGANISMS IN HOSPITAL  
ENVIRONMENT**

**Doctoral thesis**

**Mentor: prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. san. ing.**

**Co-mentor: doc. dr. sc. Martina Oder, dipl. san. ing.**

**Rijeka, 2024.**

Mentor rada:

prof.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.san.ing.

Komentor rada:

doc. dr. sc. Martina Oder, dipl. san. ing.

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

Rad ima 184 lista.

UDK:

## ZAHVALA

Prije svega, od srca zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Gobin i komentorici doc. dr. sc. Martini Oder na prijateljstvu, stručnoj pomoći, vodstvu i konstruktivnim kritikama pruženim prilikom izrade ovoga doktorskog rada.

Veliko hvala tvrtki Mozon d.o.o. Sisak i direktoru Zdravku Medvedu na posudbi generatora ozona bez kojeg se ovaj doktorski rad ne bi mogao ostvariti.

Veliko hvala dr. sc. Davorki Repac-Antić, dr. med., dr. sc. Gabrijeli Begić i Danici Rebić sa Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju te izv. prof. dr. sc. Mirni Petković Didović sa Zavoda za medicinski kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na stručnoj i tehničkoj pomoći prilikom izvođenja pokusa, konstruktivnim kritikama i moralnoj podršci.

Veliko hvala Bruni Kovaču i Mateju Planiniću čija je pomoć kod izvođenja i ponavljanja pokusa bila neprocjenjiva.

Zahvale cjelokupnom osoblju Opće bolnice dr. Ivo Pedišić u Sisku, posebice pomoćniku ravnatelja Marinu Repustiću i dr. med. Martini Radmanovic-Škrbić na logističkoj potpori prilikom izvođenja *in situ* dijela istraživanja.

Zahvale cjelokupnom osoblju Zavoda za javno zdravstvo Sisačko-moslavačke županije, posebice dr. med. Khalilu Nemeru na stručnoj pomoći prilikom prikupljanja kliničkih uzoraka.

Zahvale cjelokupnom osoblju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije na posudbi uređaja za uzorkovanje zraka, posebice doc. dr. sc. Željku Linšaku i doc. dr. sc. Dijani Tomić-Linšak na stručnoj pomoći.

Na kraju, najveće hvala mojim sinovima Josipu i Borni, suprugu Marinu, roditeljima, ujaku i prijateljima na silnoj ljubavi, potpori i razumijevanju pruženom prilikom izrade ovog rada.

## SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Biofilm višestruko otpornih mikroorganizama i kontaminacija bolničkog okoliša biofilmom predstavlja izazov u provođenju dezinfekcije kao mjere sprječavanja i kontrole infekcija. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak plinovitog ozona kao potencijalnog alternativnog dezinfekcijskog sredstva na biofilm predstavnika višestruko otpornih mikroorganizama iz bolničke sredine.

**Metode:** Istraživanje je obuhvaćalo *in vitro* ispitivanje učinka plinovitog ozona na 24-satnom biofilmu model organizama: *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na keramici i polistirenu uz prisustvo različitog organskog opterećenja. Ispitivane su fizikalno-kemijske karakteristike materijala i površine model organizama. Praćeni su parametri učinka plinovitog ozona na ukupan broj kultivabilnih bakterija, ukupan broj vijabilnih bakterija uporabom ATP bioluminiscencije i Dead/Live bojenja te učinak na ukupnu biomasu putem kristal violet bojenja. Praćen je i učinak na ukupan broj reaktivnih kisikovih vrsta te morfološke promjene na biofilmu korištenjem digitalne mikroskopije, mikroskopije atomskih sila i pretražne elektronske mikroskopije. *In situ* učinak plinovitog ozona praćen je na biofilmu odabranih referentnih sojeva model organizama u Općoj bolnici dr. Ivo Pedišić, Sisak uz popratno praćenje mikrobiološke čistoće prostora i broja bakterija u zraku.

**Rezultati:** Plinoviti ozon u koncentraciji od 25 ppm tijekom 1 sata izloženosti uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja kultivabilnih i vijabilnih bakterija u biofilmu odabranih model organizama te značajnu redukciju ukupne biomase na oba materijala te uz manje i veće organsko opterećenje. Najosjetljiviji model organizam na djelovanje ozona na oba materijala i uz različite vrste organskog opterećenja bio je *A. baumannii*, najmanje osjetljiv *S. aureus*. Plinoviti ozon uzrokuje statistički značajno povećanje reaktivnih kisikovih vrsta u svim model organizmima te morfološke promjene na biofilmu i na pojedinačnim bakterijskim stanicama u smislu deformacija stanica i ulegnuća na staničnoj membrani te razaranja stanica.

**Zaključak:** Plinoviti ozon je učinkovito dezinfekcijsko sredstvo, međutim samostalno ne uspijeva u potpunosti ukloniti biofilm model organizama s keramike i polistirena te se za uspješno uklanjanje biofilma preporučuje obvezno redovito mehaničko čišćenje i pranje prije dezinfekcije ozonom u kombinaciji s još jednim dezinfekcijskim sredstvom.

**Ključne riječi:** *A. baumannii*; biofilm; *K. pneumoniae*; ozon; *S. aureus*; višestruko otporni mikroorganizmi

## SUMMARY

**Research objectives:** Biofilm of multidrug-resistant organisms and contamination of the hospital environment with biofilm is a challenge in the implementation of disinfection as infection prevention and control measure. The aim of this research was to examine the effect of gaseous ozone as a potential alternative disinfectant on the biofilm of multidrug-resistant organisms from the hospital environment as model organisms.

**Methods:** *In vitro* part of the research included examining of the effect of gaseous ozone on the 24-hour biofilm of *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *S. aureus* on ceramics and polystyrene with the presence of different organic load. The physico-chemical characteristics of the material and the surface of the model organisms were examined. The parameters of the biocidal effect of gaseous ozone included the total number of cultivable bacteria, the total number of viable bacteria using ATP bioluminescence and Dead/Live staining and the effect on the total biomass using crystal violet staining. The effect on the total number of reactive oxygen species and morphological changes on the biofilm were monitored using digital microscopy, atomic force microscopy and scanning electron microscopy. The *in situ* effect of gaseous ozone was monitored on the biofilm of selected standard strains of model organisms in the dr. Ivo Pedišić General Hospital, Sisak, with accompanying monitoring of the microbiological cleanliness of the surfaces and the number of bacteria in the air.

**Results:** Gaseous ozone in a concentration of 25 ppm during 1 hour of exposure causes a statistically significant reduction of the total number of cultivable and viable bacteria and a significant reduction of the total biomass in the biofilm on both materials and different organic load. The most sensitive model organism to the effect of ozone on both materials and with different types of organic load was *A. baumannii*, the least sensitive was *S. aureus*. Gaseous ozone causes a statistically significant increase in reactive oxygen species in all model organisms and morphological changes in the biofilm and individual bacterial cells in the sense of cell deformation and deposition on the cell membrane and cell destruction.

**Conclusion:** Gaseous ozone is an effective disinfectant, however, it does not manage to completely remove biofilm model organisms from ceramics and polystyrene on its own, and for successful biofilm removal, mandatory regular mechanical cleaning and washing before ozone disinfection in combination with another disinfectant is recommended.

**Key words:** *A. baumannii*; biofilm; *K. pneumoniae*; multidrug-resistant organisms; ozone; *S. aureus*

## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLEG PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.1. Višestruko otporni mikroorganizmi.....	2
1.1.1. <i>ESKAPE</i> patogeni .....	2
1.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
1.1.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	4
1.1.1.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	5
1.2. Uloga bolničkog okoliša u širenju višestruko otpornih mikroorganizama.....	7
1.2.1. Uloga neživih površina u širenju višestruko otpornih mikroorganizama .....	7
1.2.2. Uloga zraka u širenju višestruko otpornih mikroorganizama.....	9
1.3. Uloga biofilma u kontaminaciji neživih površina višestruko otpornim mikroorganizmima.....	10
1.3.1. <i>Biofilm</i> .....	10
1.3.1.1. <i>Struktura biofilma</i> .....	11
1.3.1.2. <i>Mehanizam stvaranja biofilma</i> .....	11
1.3.2. <i>Kontaminacija neživih površina biofilmom višestruko otpornih mikroorganizama u bolničkom okolišu</i> .....	13
1.3.3. <i>Smanjena osjetljivost i otpornost biofilma višestruko otpornih mikroorganizama na dezinfekcijska sredstva</i> .....	14
1.4. Dezinfekcija bolničkog okoliša kao mjera prevencije i kontrole širenja višestruko otpornih mikroorganizama.....	15
1.4.1. <i>Čišćenje kao metoda održavanja higijene bolničkog okoliša</i> .....	16
1.4.2. <i>Dezinfekcija kao metoda održavanja higijene bolničkog okoliša</i> .....	17
1.4.2.1. <i>Čimbenici koji utječu na učinkovitost kemijske dezinfekcije</i> .....	19
1.4.3. <i>Sterilizacija</i> .....	20
1.4.4. <i>Čimbenici koji utječu na učinkovitost postojećih metoda čišćenja i dezinfekcije u bolničkom okolišu</i> .....	21
1.5. Alternativne metode dezinfekcije i dekontaminacije bolničkog okoliša .....	23
1.5.1. <i>Nova tekuća dezinfekcijska sredstva</i> .....	24
1.5.1.1. <i>Vodikov peroksid i dezinfekcijska sredstva bazirana na vodikovom peroksidu</i> .....	24
1.5.1.2. <i>Elektrolizirana voda</i> .....	24
1.5.2. <i>Antimikrobne površine</i> .....	24
1.5.2.1. <i>Antiadhezivne površine</i> .....	25
1.5.2.2. <i>Antimikrobne površine</i> .....	25



1.5.3.	<i>Biološka dezinfekcijska sredstva</i> .....	25
1.5.4.	<i>Fotosenzibilizatori</i> .....	25
1.5.5.	<i>Automatski sustavi za dekontaminaciju prostora</i> .....	26
1.5.5.1.	<i>Para i aerosol vodikovog peroksida (HPV)</i> .....	26
1.5.5.2.	<i>UV-C uređaji</i> .....	27
1.5.5.3.	<i>Vodena para</i> .....	27
1.6.	<i>Dezinfekcija plinovitim ozonom kao alternativna automatska metoda</i> .....	27
1.6.1.	<i>Ozon – kemijske osobine i toksikološki profil</i> .....	28
1.6.2.	<i>Stvaranje ozona</i> .....	30
1.6.3.	<i>Primjena ozona kao sredstva za dezinfekciju bolničkog okoliša</i> .....	30
1.6.4.	<i>Čimbenici koji utječu na učinkovitost ozona kao dezinfekcijskog sredstva</i> .....	31
1.6.5.	<i>Biocidni učinak ozona</i> .....	32
1.6.5.1.	<i>Oksidativni stres uzrokovan ozonom</i> .....	34
1.6.6.	<i>Ozon i biofilm</i> .....	35
2.	<i>CILJ ISTRAŽIVANJA</i> .....	39
2.1.	<i>Hipoteze istraživanja</i> .....	40
2.2.	<i>Ciljevi istraživanja</i> .....	40
3.	<i>MATERIJALI I METODE</i> .....	41
3.1.	<i>Materijali</i> .....	42
3.1.1.	<i>Model zatvorene kutije</i> .....	42
3.1.2.	<i>Generator ozona</i> .....	42
3.1.3.	<i>Mjerni instrumenti za praćenje parametara u zatvorenoj kutiji</i> .....	43
3.1.4.	<i>Bakterijski sojevi – model organizmi</i> .....	43
3.1.5.	<i>Podloge za stvaranje biofilma</i> .....	44
3.1.6.	<i>Bolnička soba – model za in situ istraživanje</i> .....	44
3.2.	<i>Metode</i> .....	45
3.2.1.	<i>Prikupljanje kliničkih MDR patogena</i> .....	45
3.2.2.	<i>Antimikrobna karakterizacija prikupljenih kliničkih MDR patogena</i> .....	46
3.2.3.	<i>Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma model organizama na keramici i polistirenu uz različito organsko opterećenje</i> .....	46
3.2.4.	<i>Fizikalno kemijska karakterizacija materijala</i> .....	47
3.2.4.1.	<i>Određivanje hidrofилnosti i hidrofobnosti keramike i polistirena</i> .....	47
3.2.4.2.	<i>Određivanje hrapavosti keramike i polistirena</i> .....	47
3.2.5.	<i>Određivanje fizikalno – kemijskih svojstava površine model organizama</i> .....	48
3.2.6.	<i>Uspostava modela za in vitro istraživanje i određivanje ciljne koncentracije ozona</i> .....	48

3.2.7.	<i>In vitro</i> tretman biofilma model organizama na keramici plinovitim ozonom .	49
3.2.8.	<i>In vitro</i> tretman biofilma model organizama na polistirenu plinovitim ozonom ..	49
3.2.9.	Određivanje ukupne biomase metodom kristal violet bojenja .....	50
3.2.10.	Utvrđivanje vijabilnosti model organizama metodom ATP bioluminiscencije	51
3.2.11.	Određivanje vijabilnosti model organizama Dead Live bojenjem .....	51
3.2.12.	Utvrđivanje morfoloških promjena u biofilmu model organizama .....	52
3.2.12.1.	Digitalna mikroskopija .....	52
3.2.12.2.	Mikroskopija atomskih sila .....	52
3.2.12.3.	Pretražna elektronska mikroskopija .....	53
3.2.12.4.	Utvrđivanje oksidativnog stresa .....	54
3.2.13.	Ispitivanje učinka na kvalitetu zraka, mikrobiološku čistoću i biofilm model organizama <i>in situ</i> .....	55
3.2.14.	Etički aspekti istraživanja .....	56
3.2.15.	Statistička obrada podataka .....	56
4.	REZULTATI.....	57
4.1.	Osjetljivost model organizama na antibiotike .....	58
4.2.	Afinitet prema otapalima model organizama .....	60
4.3.	Hidrofobnost, hidrofilnost i hrapavost keramike i polistirena .....	63
4.4.	Sposobnost stvaranja biofilma model organizama na keramici i polistirenu uz različito organsko opterećenje .....	64
4.5.	Učinkovitost plinovitog ozona na biofilm model organizma <i>K. pneumoniae</i> .....	68
4.5.1.	Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu <i>K. pneumoniae</i> .....	68
4.5.2.	Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu <i>K. pneumoniae</i> .....	71
4.5.3.	Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu <i>K. pneumoniae</i> .....	74
4.5.4.	Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu <i>A. baumannii</i> .....	77
4.5.5.	Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu <i>A. baumannii</i> .....	80
4.5.6.	Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu <i>A. baumannii</i> .....	84
4.5.7.	Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu <i>S. aureus</i> .....	87
4.5.8.	Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu biofilma <i>S. aureus</i> .....	90
4.5.9.	Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu <i>S. aureus</i> .....	93

4.5.10.	<i>Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih i vijabilnih bakterija te na ukupnu biomasu model organizama na keramici i polistirenu uz različitu količinu organskog opterećenja</i> .....	95
4.6.	Oksidativni stres model organizama nakon tretmana plinovitim ozonom .....	97
4.7.	Učinak plinovitog ozona na topologiju biofilma reprezentativnog soja <i>K. pneumoniae</i> .....	100
4.8.	Morfološke promjene na biofilmu i stanicama reprezentativnih sojeva model organizama nakon tretmana plinovitim ozonom .....	103
4.9.	Učinak plinovitog ozona na vijabilnost stanica u biofilmu model organizama .....	107
4.10.	<i>In situ</i> učinak plinovitog ozona na broj bakterija u zraku .....	111
4.11.	<i>In situ</i> učinak plinovitog ozona na mikrobiološku čistoću prostora.....	113
4.12.	<i>In situ</i> učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija model organizama.....	115
5.	RASPRAVA .....	117
6.	ZAKLJUČCI.....	130
7.	LITERATURA.....	134

## **1. UVOD I PREGLEG PODRUČJA ISTRAŽIVANJA**

## 1.1. Višestruko otporni mikroorganizmi

Otkriće i uporaba antibiotika te njihovo uvođenje u kliničku praksu oko 1930. godine smatra se jednim od najvećih napredaka u povijesti čovječanstva [1,2]. Otada je korištenje antibiotika postalo globalno, a njihova uporaba u medicini, veterini i poljoprivredi dio svakodnevnice [1,3]. Nedugo nakon otkrića antibiotika otkrivena je i bakterijska otpornost, pojava koja od otkrića ostvaruje trend širenja i rasta [4]. Bakterijska otpornost može biti prirodna ili stečena, s time da potonja ima puno veći javnozdravstveni i klinički značaj [2]. Bakterijska otpornost najčešće nastaje pod pritiskom prekomjernog, pogrešnog ili neprimjerenog korištenja antibiotika u populaciji, što posljedično dovodi do razvoja otpornosti [2]. U posljednjih dvadesetak godina, posebno zabrinjava pojava i širenje višestruko otpornih mikroorganizama [5]. Pojam višestruke otpornosti može se definirati kao stečena otpornost na najmanje jedan lijek u tri ili više klasa antibiotika [6,7]. Zajednička osobina svih višestruko otpornih mikroorganizama (eng. *multidrug resistant organisms*, MDRO; MDR) osim višestruke otpornosti na dostupne antibiotike jest i činjenica da predstavljaju veliki javnozdravstveni problem, posebice u bolničkom okolišu, gdje su identificirani kao česti uzročnika bolničkih infekcija [8,9].

### 1.1.1. *ESKAPE* patogeni

ESKAPE patogene sačinjava skupina od šest mikroorganizama koji dijele zajedničke osobine višestruke otpornosti na antibiotike [10–13]. Izraz ESKAPE označava akronim početnih slova u nazivima pripadnika skupine – *Enterococcus faecium* (E), *Staphylococcus aureus* (S), *Klebsiella pneumoniae* (K), *Acinetobacter baumannii* (A) i *Enterobacter species* (E) [14]. Patogeni iz ESKAPE skupine odgovorni su za većinu bolničkih infekcija u svijetu te su od strane Svjetske zdravstvene organizacije prepoznati kao globalna prijetnja javnom zdravlju, a nužnost za razvojem novih djelotvornih antibiotika izdvojena je kao istraživački prioritet [15,16].

#### 1.1.1.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je Gram-pozitivna bakterija okruglastog oblika i nepokretna (**Slika 1.**). Rod *Staphylococcus* sačinjava 52 vrste i 28 podvrsta, međutim *S. aureus* ima najveći javnozdravstveni i klinički značaj, posebice soj otporan na meticilin (eng. *methicillin – resistant*

*Staphylococcus aureus*, MRSA) [17].

Infekcije *S. aureus* se prenose dodirnom sa zaraženom osobom, hranom i preko zaraženih predmeta i površina [18]. Poseban problem predstavljaju bolničke infekcije uzrokovane višestruko otpornim MRSA sojem [19].

Karakteristika soja je višestruka otpornost na antibiotike koje sadrže  $\beta$ -laktam (penicilini, cefalosporini i karbapenemi) zbog produkcije penicilinaze koja razara  $\beta$ -laktamski prsten [1,20]. Otpornost MRSA najčešće se javlja stjecanjem gena *mecA* i *MeC*. Oba gena kodiraju protein koji veže penicilin (eng. *penicillin binding protein 2a*, PBP2a) i smješteni su na genomskom otoku naziva stafilokokna kromosomska *mec* kasetna (eng. *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, SCCmec) [2]. Ekspresija *mecA* gena se kontrolira putem proteolitičkog puta prijenosa signala koji se sastoji od senzorskog proteina (*MecR1*) i represora (*MecI*) [21].



**Slika 1.** Porast *Staphylococcus aureus* na krvnom agaru, autorski rad

*S. aureus* posjeduje niz čimbenika virulencije poput lučenja toksina, niza izvanstaničnih proteina koji pomažu adheziju i širenje stafilokoka u organizam domaćina (hemolizin, proteaze, hijalouronidaze i kolagenaze) te intrinzični mehanizam za izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina [17,22,23].

Stafiloksantin je karotenoidni pigment odgovoran za zlatnu boju stafilokoka, međutim predstavlja važan dio intrinzičnog mehanizma kojim se stafilokoki bore protiv reaktivnih kisikovih vrsta izlučenim od strane neutrofila i pomoćnih stanica domaćina [1,24].

### 1.1.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* je Gram-negativna bakterija koja pripada redu *Enterobacterales* kokobacilarnog oblika, ne stvara spore, nije pokretna i fakultativni je anaerob (**Slika 2.**) [25,26]. Zahvaljujući svojim čimbenicima virulencije, sposobnosti stvaranja biofilma i višestrukoj otpornosti na postojeće antibiotike predstavlja sve veći javnozdravstveni problem, napose i u bolničkom okolišu [1,2,27,28]. Sastavni je dio mikrobiote ljudi i životinja i oportunistički je patogen.

Najveći epidemiološki i javnozdravstveni značaj roda *K. pneumoniae* je uzrokovanje bolničkih infekcija koje se zbog otpornosti na antibiotike teško liječe. Trend je to koji je u slučaju *K. pneumoniae* u konstantnom porastu posljednje desetljeće [1,27,29–32], posebice pojavom i širenjem sojeva otpornih na karbapeneme i na kinolone [1,2,33–36]. Danas se pojavljuju sojevi *K. pneumoniae* koji proizvode  $\beta$ -laktamaze širokog spektra (engl., *extended spectrum  $\beta$ -lactamase*, ESBL) te sojevi koji proizvode karbapenemaze.

Karbapenemaze su također  $\beta$ -laktamaze koje hidroliziraju karbapeneme i većinu  $\beta$ -laktama te se ovisno o enzimu razvrstavaju u dvije skupine [2,5]. U prvu skupinu pripadaju enzimi koji posjeduju serin te se označavaju kao klasa A i D, od kojih je najpoznatiji enzim klase A KPC (eng., *K. pneumoniae carbapenemase*, KPC), a klase D oksacilinaza (eng. *oxacillinase*, OXA), posebice OXA-48. U drugu skupinu ubrajaju se karbapenemaze koje zahtijevaju metale za svoju aktivnost i nazivaju se metalo-beta-laktamaze (eng. *metallo-beta-lactamase*, MBL) [2,5]. Najpoznatije MBL karbapenemaze su imipenemaza (eng. *imipenemase*, IMP), Verona integron-kodirana MBL (eng., *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*, VIM) i New Delhi MBL (eng., *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*, NDM) [2,5].

Otpornost na kinolone najčešće nastaje zbog mutacija gena *gyrA* i *gyrB* (DNA giraza) i gena *parC* i *perE* (topoizomeraza IV) [37].



**Slika 2.** Porast *K. pneumoniae* na krvnom agaru, autorski rad

Među najvažnije faktore virulencije *K. pneumoniae* ubrajaju se debela kapsula sačinjena od dva sloja polisaharidnih vlakana (K antigeni) koja štiti bakteriju od fagocitoze te od baktericidnog djelovanja serumskih faktora [26,31], lipopolisaharid koji također štiti bakteriju od imunološkog odgovora domaćina, fimbrije tipa 1 i fimbrije tipa 3 koji sudjeluju u adheziji i pomažu kolonizaciju domaćina i izlučivanje siderofora za akviziciju željeza kao potrebnog nutrijenta [27]. Osim navedenog, *K. pneumoniae* ima mogućnost stvaranja biofilma na živim i neživim površinama [4,28,38].

#### **1.1.1.3. *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* je oportuni patogen, pripadnik porodice *Moraxellaceae*, aerobni Gram-negativni štapić, nepokretan i ne stvara spore (**Slika 3.**) [39,40]. Pripadnik je ESKAPE grupe i sve češći uzročnik bolničkih infekcija te predstavlja ozbiljan izazov za javno zdravstvo i kliničare diljem svijeta [41–43].

Jedna od najvažnijih značajki *A. baumannii* jest njegova mogućnost preživljavanja na površinama, a što se pripisuje njegovoj osobini da vrlo brzo mutira i na taj način se prilagodi stresnim uvjetima okoliša [2,44–49]. Na neživim i suhim površinama može preživjeti danima i mjesecima [1,41,50]. Osim što je prisutan u okolišu, ljudi također mogu biti nosioci *A. baumannii* te je oko 1/4 zdravih ljudi nosioc *A. baumannii*. Kolonizacija se povećava u hospitaliziranih osoba gdje onda zaraženi pacijenti mogu predstavljati izvor zaraze [41], ali izvor zaraze može biti i kontaminirani bolnički okoliš [1,43,51].





**Slika 3.** Porast *A. baumannii* na Muller-Hinton agaru, autorski rad

Iako se smatra bakterijom relativno niske virulencije, osobine *A. baumannii* poput brze prilagodbe stresnim uvjetima okoline, brzom razvijanju otpornosti na antibiotike, dugotrajnim preživljavanjem na suhim površinama i stvaranjem biofilma čine ga izazovom u sustavima zdravstvene skrbi [43,46,51–54]. Otpornost na antibiotike *A. baumannii* ostvaruje putem 3 glavna mehanizma: smanjenjem permeabilnosti porina na membrani ili putem efluks pumpi, modifikacijom ciljnog mjesta djelovanja antibiotika ili putem enzimatske inaktivacije antibiotika. *A. baumannii* je intrinzično otporan na neke vrste  $\beta$ -laktamskih antibiotika (peniciline i cefalosporine) izlučivanjem  $\beta$ -laktamaza (klasa A  $\beta$ -laktamaze, ESBL, MBL, cefalosporinaze, oksacilinaze, karbapenemaze) [55]. Uz navedenu enzimatsku aktivnost, *A. baumannii* posjeduje efluks pumpe, proteine za vezivanje penicilina, polisaharidnu kapsulu koja je odgovorna za otpornost prema imunološkom odgovoru domaćina, fimbrije koji olakšavaju adheziju i kolonizaciju, posebice Csu pili - tip 1 koje izravno povezuju sa stvaranjem biofilma, lipopolisaharid, proizvodi enzime i toksine odgovorne za razaranje tkiva. *A. baumannii* posjeduje i otpornost na određene pripadnike skupina aminoglikozida, tetraciklina, florokinolona, makrolida i polimiksina [55].

Infekcije uzrokovane *A. baumannii* su najčešće povezane sa bolničkom skrbi, posebice na odjelima jedinica intenzivne skrbi i kirurškim odjelima [56].

## 1.2. Uloga bolničkog okoliša u širenju višestruko otpornih mikroorganizama

Višestruko otporni mikroorganizmi su zbog karakteristika poput visoke otpornosti na uvjete okoliša i dostupne antibiotike postali gotovo endemski u bolničkom okolišu, unatoč velikim institucionalnim naporima da se smanje ili iskorijene [57–59].

Prisustvo MDR patogena poput *S. aureus*, *K. pneumoniae* i *A. baumannii* u bolničkom okolišu predstavlja potencijalni izvor za nastanak i širenje bolničkih infekcija [60–63]. Bolničke infekcije uzrokovane MDR patogenima su u posljednjih desetljeća u porastu [63–66] i predstavljaju veliki javnozdravstveni i socioekonomski izazov te se povezuju s povećanim mortalitetom, morbiditetom i ukupnim troškovima liječenja [60,61,63,64,67,68].

Iako se više od polovice bolničkih infekcija povezuje s kontaminacijom medicinskih uređaja i implantata poput venskih i urinarnih katetera, povećana incidencija bolničkih infekcija izravno se povezuje i s prijenosom MDR patogena križnom infekcijom između pacijenata, osoblja i pacijenata te putem kontaminiranog bolničkog okoliša [60,64,69].

Endogena mikrobiota pacijenata se smatra glavnim izvorom širenja MDR patogena u bolničkoj okolini, a podaci iz dostupne literature navode visoku pojavnost kontaminacije ruku pacijenata nakon otpuštanja iz bolnice [60,62,70–72].

Prijenos MDR patogena preko ruku bolničkog osoblja je najčešći način širenja MDR patogena u bolničkoj sredini iz razloga što bolničko osoblje po prirodi posla komunicira i njeguje veliku količinu pacijenata, a procjenjuje se da je oko trećina bolničkih infekcija uzrokovana upravo križnom infekcijom preko ruku bolničkog osoblja [70,73,74]. Prijenos MDR patogena putem kontaminiranih ruku bolničkog osoblja se može dogoditi izravnim dodiranjem zaraženog pacijenta ili neizravno preko dodirivanja pacijentovih izlučevina [60,75]. Opisan je i prijenos MDR patogena preko odjeće bolničkog osoblja (rukavice, kute, jednokratna odijela) [69].

### 1.2.1. Uloga neživih površina u širenju višestruko otpornih mikroorganizama

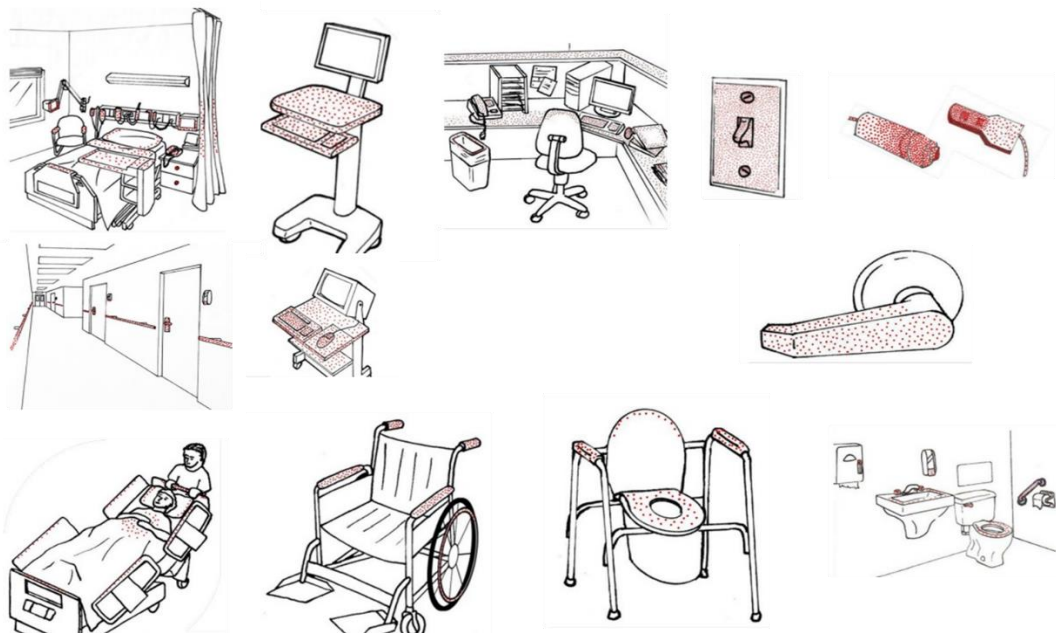
Bolnički okoliš sudjeluje u prijenosu MDR patogena te je povezan s ukupno četvrtinom bolničkih infekcija [60,62,70,74]. Pod pojmom bolnički okoliš podrazumijevaju se nežive površine, predmeti i uređaji u zdravstvenoj ustanovi poput kreveta, plahti, utičnica, kvaki, prekidača, podova, medicinske opreme, uređaja i slično (**Slika 4.**). Iako se povijesno u istraživanjima povezanim s epidemiologijom MDR patogena u bolničkom okolišu prednost prijenosa davala izravnom kontaktu pacijenata i osoblja, recentni podaci ukazuju na značajnu

ulogu bolničkog okoliša u prijenosu MDR patogena [57,59,78–83,60,63,64,73–77].

Bolnički okoliš predstavlja svojevrsan rezervoar MDR patogena koji u okoliš dospjevaju izlučivanjem iz zaraženih pacijenata ili bolničkog osoblja i vjerojatnost zaraze MDR patogenom raste ukoliko se pacijent smješta u sobu koja je bila prethodno okupirana pacijentom koloniziranim MDR patogenom [60,73–75,79,84].

Kritične točke u bolničkoj sredini predstavljaju i površine koja se često dotiču rukama, tako da doprinose kao mjesta sekundarne kontaminacije osoblja i pacijenata [18,50,64,82]. Opisana je snažna korelacija između okolišne kontaminacije MRSA-om i utvrđenih stopa bolničkih infekcija [85].

Studije provedene nakon epidemija bolničkih infekcija uzrokovanih *A. baumannii* u pedijatrijskim odjelima djece s opeklinama i jedinicama intenzivne skrbi povezuju ulogu bolničkog okoliša s incidencijom zaraženih i pojavom novih slučajeva zaraze [82]. Nadalje, MDR patogeni su izolirani na raznim plastičnim površinama unutar bolničke sredine, kao i na ventilacijskim oknima.



**Slika 4.** Predmeti i površine koje se učestalo dotiču, prilagođeno [3]

Razina kontaminacije bolničkog okoliša varira ovisno o primarnoj djelatnosti koja se u prostoru odvija i stupnju rizičnosti pacijenata [58], ali ovisi i o primarnom mjestu kolonizacije ili infekcije MDR patogenom. Nadalje, svojstvo dugog preživljavanja MDR patogena doprinosi razini kontaminacije.

Primjerice, dostupna istraživanja navode da *A. baumannii* može preživjeti 33 dana na plastičnoj površini, a 3 do 5 mjeseci na suhoj neživoj površini [50,64,71]. *K. pneumoniae* može preživjeti na suhim neživim površinama i do više od 30 mjeseci [50,64], dok MRSA može biti virulentan i do 10 dana na suhoj površini, a preživjeti od 7 dana do 9 tjedana [50,64,71,86,87].

Naposlijetku, jedna od možda najvažnijih karakteristika MDR patogena u kontaminaciji bolničkog okoliša je uspješno stvaranje biofilma, posebice ako se uzme u obzir činjenica da je potrebno manje od 24 sata da se od inicijalne adhezije MDR patogena na površini stvori biofilm [64].

### **1.2.2. Uloga zraka u širenju višestruko otpornih mikroorganizama**

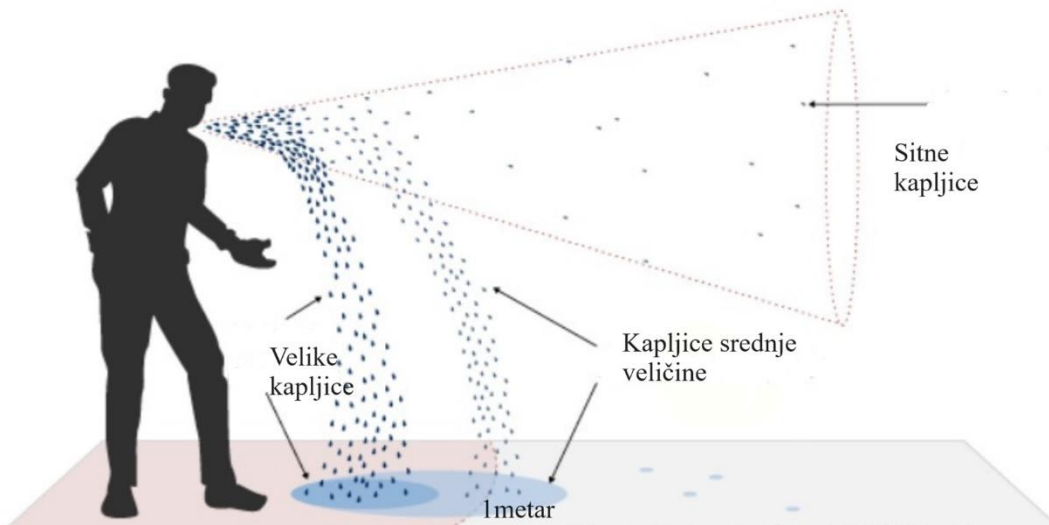
Zrak kao nedvojbena dio okoliša u bolničkoj sredini može izravno i neizravno utjecati na širenje MDR patogena. Mikroorganizmi u zraku se nalaze u obliku krutih čestica ili kapljica [88–90] veličine od 5 do 100  $\mu\text{m}$ , a u zrak dospijevaju preko zaražene osobe. Krute čestice mikroorganizama u zraku najčešće nastaju ljuštenjem kože pacijenata ili preko čestica prašine, dok kapljice nastaju kašljanjem, kihanjem, pričanjem, povraćanjem, uporabom toaleta, tuševa i standardnih medicinskih pregleda [88,90].

Ispuštanjem čestica ili kapljica MDR patogena u zrak na udaljenosti i čak do 3 m od izvora dolazi do njihove disperzije u zraku (**Slika 5.**) [91]. Jednom disperzirane čestice ili kapljice u zraku se isušuju te ovisno o veličini ostaju trajno disperzirane u zraku ili padaju na nežive površine. Kapljice disperzirane u zraku se strujanjem zraka (prirodnim ili mehaničkim) kao i kretanjem osoblja, pacijenata, uređaja, opreme mogu lako prenijeti u udaljenije dijelove bolnice [91]. Osim toga, kapljice disperzirane u zraku se mogu prenositi putem odjeće i obuće osoblja [92].

Kontaminacija zraka kao medija za širenje MDR patogena ovisi o nekoliko čimbenika poput količine mikroorganizama ispuštenog u zrak, fizikalno – kemijskim uvjetima u prostoru (prosječna vlaga zraka, temperatura, ultraljubičasto zračenje (eng., *ultra violet*, UV), prisustvo atmosferskih onečišćivača), ventilaciji prostora, okupiranosti prostora pacijentima i osobljem, učestalosti ulazaka u prostor [88]. Iako se o izravnom utjecaju zraka kao medija za širenje bolničkih infekcija još uvijek debatira, podaci iz dostupne literature navode da je širenje zrakom potencijalno uzrok oko 10-20% svih endemskih bolničkih infekcija [61,90], odnosno da je u 1/3 svih bolničkih infekcija zrak kao medij sudjelovao u nekoj razini širenja između izvora zaraze i domaćina [90,93].

Osim toga, postoje dokazi izravne povezanosti kontaminacije zraka MDR patogenima

poput MRSA, *A. baumannii* i *K. pneumoniae* [83,89,92,94,95].



**Slika 5.** Prikaz prijenosa kapljica zrakom obzirom na veličinu, prilagođeno [96]

Studije provedene u bolničkom okolišu povezuju kontaminaciju zraka pojedinim MDR patogenima nakon spremanja bolesničkih kreveta te posljedični depozit bakterije na nežive bolničke površine, kao i kontaminaciju zraka nakon zauzetosti sobe koloniziranim pacijentom [91,92,95]. Razina kontaminacije zraka može ovisiti i o primarnom izvoru kolonizacije ili zaraze osobe [95].

### **1.3. Uloga biofilma u kontaminaciji neživih površina višestruko otpornim mikroorganizmima**

#### ***1.3.1. Biofilm***

Povijesno gledano, otkriće biofilma se može pripisati nizozemskom znanstveniku Antony Van Leeuwenhoek-u koji je prvi opisao strukture slične modernom pojmu biofilma [97]. Heukelekian i Heller su opisali stanje morskih mikroorganizama poznato pod nazivom “učinak boce”, tj. uočili su da mikroorganizmi bolje preživljavaju i rastu pričvršćeni za površinu. Slično opažanje opisao je i Zobell koji je uočio da u slobodnom mediju ima manje mikroorganizama nego na površinama [98]. Tek se otkrićem i razvojem elektronske mikroskopije biofilm mogao vizualizirati i opisati. Jones je sa suradnicima prvi opisao biofilm

na filterima uređaja za pročišćivanje voda koristeći pretražnu elektronsku mikroskopiju i tada ga definirao kao nakupinu raznih mikroorganizama [98].

Iako danas postoje raznolike definicije biofilma, biofilm se ukratko može opisati kao organizirana nakupina mikroorganizama okruženih izvanstaničnim polimernim matriksom koji sami proizvode te ireverzibilno pričvršćena za živu ili neživu površinu [97–99]. Zajedničke karakteristike bakterija u biofilmu su dugotrajno preživljavanje na površinama, otpornost na antibiotike i smanjena osjetljivost i otpornost na dezinfekcijska sredstva [100–103].

#### **1.3.1.1.    *Struktura biofilma***

Biofilm u najvećem dijelu sačinjavaju stanice mikroorganizama i izvanstanična polimerna tvar (eng., *extracellular polymeric substance*, EPS) koju sintetiziraju bakterijske stanice u biofilmu [38,100].

EPS ima glavnu povezujuću ulogu unutar biofilma i sadržava oko 50-90% ukupnog ugljika organskog porijekla u biofilmu [98]. Iako sastav polisaharida u EPS varira ovisno o vrsti mikroorganizama, većinom je sastavljen od egzopolisaharida, proteina i nukleinskih kiselina (ekstracelularna DNK) [100].

Polisaharidi u EPS, ovisno o tome jesu li bakterije Gram-pozitivne ili Gram-negativne mogu imati neutralna, anionska ili kationska svojstva što utječe na čvrstoću vezivanja unutar biofilma [104]. EPS također sadržava veliku količinu vode, a može izražavati hidrofилna i hidrofobna svojstva.

Velike količine vode u EPS štite bakterijske stanice u biofilmu od isušivanja [104]. EPS ima i ulogu u prikupljanju i distribuciji minerala i nutrijenata iz okolne sredine do bakterijskih stanica u biofilmu [97].

#### **1.3.1.2.    *Mehanizam stvaranja biofilma***

Stvaranje biofilma kompleksan je događaj koji uključuje specifičnu suradnju između bakterijskih stanica u biofilmu kroz vrstu međustanične komunikacije nazvanu detekcija kvoruma [97,100].

Većina autora se slaže da se proces stvaranja biofilma može podijeliti u 4 faze: inicijalni kontakt s površinom (adhezija); stvaranje mikro-kolonija (proliferacija); sazrijevanje i stvaranje specifične arhitekture biofilma i odvajanje (**Slika 6.**).

a) *Inicijalni kontakt s površinom (adhezija)*

Početni stadij stvaranja biofilma je inicijalna adhezija bakterijskih stanica na živu ili neživu površinu. Bakterijske stanice se na površinu pričvrste ili uz pomoć vlastitih struktura (fimbrije ili bičevi) ili uz pomoć Van der Waalsovih sila ili elektrostatskih interakcija. Prilikom adhezije, fizikalno – kemijske osobine površine, poput hidrofobnosti i polarnosti uvelike utječu na sposobnost prijanjanja i kasnijeg stvaranja biofilma [97].

b) *Stvaranje mikro-kolonija (proliferacija)*

Nakon stvaranja stabilnih veza između bakterijskih stanica i površine, dolazi do proliferacije bakterijskih stanica i stvaranja mikro-kolonija. Mladi biofilm se sastoji od velikog broja mikro-kolonija koje međusobno koordiniraju radi razmjene supstrata, distribucije i izlučivanja raznih metabolita. Osim toga, bakterijske stanice izlučuju izvanstanični polimerni matriks koji povezuje bakterijske stanice, učvršćuje ih i omogućuje sazrijevanje i izgradnju specifične arhitekture biofilma [97,100].

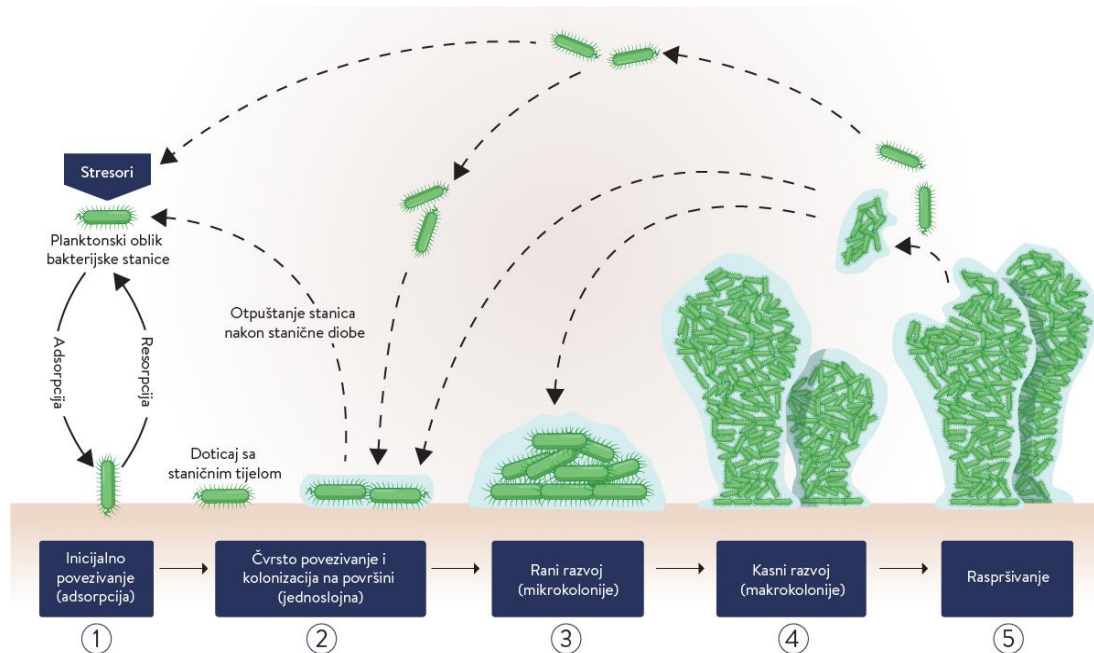
c) *Sazrijevanje biofilma i stvaranje specifične arhitekture biofilma*

U ovoj fazi dolazi do sazrijevanja biofilma i stvaranja višeslojne trodimenzionalne strukture učvršćene EPS-om. Bakterijske stanice u ovoj fazi komuniciraju putem auto induciranih signala koji olakšavaju detekciju kvoruma [97,100].

d) *Otpuštanje*

Zadnja faza u stvaranju biofilma je otpuštanje bakterijskih stanica te njihov prelazak iz sesilnog u planktonski oblik. Do otpuštanja dolazi snažnom proizvodnjom primarno surfaktanata u obliku različitih saharolitičkih enzima koji omogućuju otpuštanje mikroorganizama s površine. Detekcija kvoruma kontrolira proizvodnju surfaktanata u ovoj fazi [100], dok bakterijske stanice reguliraju ekspresiju gena odgovornih za proizvodnju bičeva. Jednom otpušteni planktonski oblici bakterija slobodni su opet se povezati za dostupnu površinu [97].





**Slika 6.** Mehanizam i faze u stvaranju biofilma, izvor [105]

### ***1.3.2. Kontaminacija neživih površina biofilmom višestruko otpornih mikroorganizama u bolničkom okolišu***

Biofilm u bolničkom okolišu najčešće nalazimo u tri oblika: biofilm povezan s vlažnim područjima poput tuševa i umivaonika, biofilm na suhim površinama te biofilm na kirurškim instrumentima i medicinskim uređajima [101].

Kontaminacija bolničkog okoliša biofilmom, posebice MDR patogena ima veliki javnozdravstveni značaj iz razloga što se biofilm povezuje s gotovo 65% bolničkih infekcija, 80% kroničnih infekcija i 60% ukupnih bakterijskih infekcija u čovjeka [99,106]. Posebno je značajno otkriće biofilma MDR patogena na suhim površinama koje se često dotiču i što je ukazalo je na važnost utjecaja neživog okoliša u širenju MDR patogena [99,101,102,106–108].

Osim što povećavaju rizik zaraze za pacijente i osoblje, biofilmovi u bolničkom okolišu predstavljaju i visoko infektivan izvor zaraze zbog velikog broja bakterija koje su nakupljene u biofilmu [108], a prisutnost biofilma je ponekad detektirana i nakon provedenog temeljitog čišćenja i terminalne dezinfekcije površina [74,81,101,102,107].

Navedeno ističe važno svojstva biofilma MDR patogena - mogućnost dugotrajnog preživljavanja u nepovoljnom okolišnim uvjetima bez prisutnosti vode i nutrijenata poput suhih bolničkih površina [101,102,109], ali i smanjenu osjetljivost i otpornost na neka postojeća dezinfekcijska sredstva [19,20,74,81,102,103,110,111].



Obje osobine biofilma MDR patogeni su od iznimne važnosti u pogledu kontaminacije bolničkog okoliša MDR patogenima i njihovog širenja.

### ***1.3.3. Smanjena osjetljivost i otpornost biofilma višestruko otpornih mikroorganizama na dezinfekcijska sredstva***

Biofilm MDR patogeni pokazuje karakteristike smanjene osjetljivosti ili čak otpornosti na neke od postojećih dezinfekcijskih sredstava koja se rutinski koriste u dezinfekciji bolničkih površina [19,20,74,81,102,103,110,111]. Kada se koristi pojam otpornosti biofilma na dezinfekcijska sredstva, onda otpornost biofilma označava otpornost u usporedbi s planktonskim oblikom bakterije [112,113], iako neki autori navode da je prigodniji pojam “smanjena osjetljivost” iz razloga što je otpornost u smislu antimikrobne otpornosti teže moguća zbog nespecifičnog djelovanja dezinficijensa i velikog broja ciljnih mjesta te toksičnih efekata biocida [114–116].

Bakterijska otpornost prema biocidnim aktivnim tvarima u dezinfekcijskim sredstvima može biti intrinzična, stečena horizontalnim transferom gena ili mutacijom te otpornost nastala kao rezultat prilagodbe okolišnim uvjetima [114,115,117]. Primjeri intrinzične otpornosti bakterija na dezinficijense su sporulirajuće bakterije *Bacillus* spp. ili *Clostridium* spp., Gram-negativne bakterije ili *Mycobacterium* spp., zbog kompleksne građe staničnog zida [70,114,116].

Bakterije mogu razviti razne mehanizme poput efluks-pumpi koje mogu izbacivati iz stanice biocidne aktivne tvari. Također mogu posjedovati enzime poput katalaze koja posjeduje sposobnost razaranja veza u vodikovom peroksidu [114]. Bakterije u biofilmu razvijaju različite strategije smanjene osjetljivosti/otpornosti prema dezinfekcijskim sredstvima uključujući otežanu penetraciju dezinfekcijskog sredstva u dublje dijelove biofilma zbog prisutnosti EPS-a te interakcijom biocidne aktivne tvari s organskom tvari unutar EPS-a što rezultira smanjenom učinkovitom dozom biocida [4,112,117,118].

Biofilm je karakterističan i po postojanju tzv. perzistera, male populacije bakterijskih stanica smanjene metaboličke aktivnosti (oko 1%) koje ispoljavaju veliku otpornost prema antibioticima i dezinficijensima [38]. Prisutne u dubljim slojevima često su izložene malim dozama i subletalnim koncentracijama što posljedično može rezultirati razvojem prilagodbe subletalnim dozama biocida [112].

Prisustvo EPS-a omogućuje i olakšava razmjenu genetskog materijala horizontalnim transferom putem plazmida, a time i širenje gena otpornosti [106]. Osim toga, bakterijske

stanice u biofilmu razvijaju razne fenotipske prilagodbe rezultirajući povećanom otpornosti na dezinfekcijska sredstva kojima su izložena [112].

Antimikrobna otpornost MDR patogena je uzročno – posljedično dovela do povećane uporabe dezinficijensa u svrhu prevencije i kontrole širenja bolničkih infekcija. Široka uporaba dezinficijensa opravdano izaziva zabrinutost po pitanju razvoja smanjene osjetljivosti i otpornosti MDR patogena na određene postojeće dezinficijense [119]. Osim toga, zabrinjava i potencijalna veza između rastuće otpornosti na antibiotike s rastom otpornosti na dezinficijense [4,19,43,117,120].

Smanjena osjetljivost i otpornost biofilma MDR patogena na postojeća dezinfekcijska sredstva smanjuje učinkovitost čišćenja i dezinfekcije kao preporučenih mjera za prevenciju i kontrolu bolničkih infekcija [102] te doprinosi kontaminaciji neživih bolničkih površina, bolničkog osoblja i pacijenata [8,102].

#### **1.4. Dezinfekcija bolničkog okoliša kao mjera prevencije i kontrole širenja višestruko otpornih mikroorganizama**

Održavanje visoke razine osobne higijene bolničkog osoblja i higijene bolničkog okoliša nužno je za sprječavanje kontaminacije i širenja MDR patogena u bolničkim sredinama [78,121]. Temeljem navedenog, učinkovito održavanje bolničke higijene jedna je od važnih mjera za prevenciju i kontrolu bolničkih infekcija.

Pod pojmom higijene podrazumijeva se niz postupaka koji se provode s krajnjim ciljem promicanja, očuvanja i unapređenja zdravlja kako pojedinca tako i uže/šire društvene zajednice [122]. Bolnička higijena se odnosi na uži pojam povezan s higijenskim postupcima isključivo sa zdravstvenim sustavima i ubraja široki niz svakodnevnih i ciljanih aktivnosti dekontaminacije [122].

Dekontaminacija je pojam kojih obuhvaća sve postupke za postizanje higijene i uključuje čišćenje, dezinfekciju i sterilizaciju s ciljem postizanja sigurnih predmeta i površina za daljnje korištenje [3,122].

U praksi, bolnička higijena se provodi na temelju pisanih smjernica koje najčešće za države donose vlastita nadležna tijela u suradnji sa stručnjacima iz područja bolničkih infekcija, kliničkih mikrobiologa i predstavnika industrije [123–125]. Pisane smjernice služe kao polazna točka s jasno propisanom metodologijom, standardnim operativnim procedurama koje se primjenjuju, zaduženjima osoblja, procijenjenim rizicima i slično [122,124,126,127].

Primjena određenog postupka dekontaminacije za postizanje učinkovite razine higijene

ovisi o nekoliko čimbenika: vrsti površine/predmeta koja se čisti obzirom na rizik (visoki, srednji, niski i minimalni rizik) i fizikalno – kemijske karakteristike (vrsta materijala, poroznost, hrapavost, eventualno prisutna oštećenja), funkcionalnoj jedinici/području, kliničkom riziku, učestalosti mijene pacijenata te količini ljudi koje borave u određenom prostoru [82,122,128].

Predmeti visokog rizika (kritični predmeti po Spaulding klasifikaciji) podrazumijevaju sve predmete koji se uvode u sterilne prostore i po svojoj namjeni moraju biti sterilni jer dolaze u kontakt s oštećenom kožom ili sluznicom (kateteri, implantati, kirurški instrumenti) [114,128].

Predmeti srednjeg rizika obuhvaćaju predmete koji po svojoj namjeni dolaze u kontakt s neoštećenom kožom i sluznicom i ne trebaju biti sterilni, samo je nužno odsustvo vegetativnih oblika mikroorganizama (endoskopi, oprema za anesteziju i slično), pa je preporučena metoda dekontaminacije dezinfekcija [114].

Niski i minimalni rizik (nekritični predmeti po Spaulding klasifikaciji) obuhvaća predmete koji dolaze u doticaj s neoštećenom kožom, kao i predmete u neposrednoj okolini pacijenta, stoga je u većini slučajeva preporučena i dovoljna metoda dekontaminacije čišćenje i sušenje, osim u slučajevima infekcije i kolonizacije patogenom [114,122,128].

Osim predmeta, površine se također mogu klasificirati u kritične i nekritične. Kritične površine obuhvaćaju one površine koje se vrlo često dotiču od strane bolničkog osoblja i pacijenata, poput telefonskih slušalica, tipkovnica, kvaki, ručki, prekidača, slavina i slično te zahtijevaju metode dekontaminacije čišćenja i dezinfekcije, dok nekritične površine obuhvaćaju površine poput podova, hodnika, prozora, stolića, ormara i slično gdje je preporučena metoda dekontaminacije čišćenje [82,122,128].

Funkcionalna područja čišćenja obuhvaćaju 4 razine rizika obzirom na nastanak i širenje bolničkih infekcija (vrlo visoki, visoki, srednji i niski rizik).

#### ***1.4.1. Čišćenje kao metoda održavanja higijene bolničkog okoliša***

Čišćenje je uobičajeni postupak koji se provodi radi uklanjanja vidljive nečistoće s površina (organsko onečišćenje, prašina, kemijske tvari, mikroorganizmi) uporabom vode i sredstva za čišćenje [128,129]. Čišćenje najčešće uključuje ručno i mehaničko uklanjanje nečistoća uporabom određenih pomagala (krpe, spužve, maramice, metle, usisivač i kante). Sredstva za čišćenje podrazumijevaju tekuće sapune, enzimatska sredstva za čišćenje i deterdžente. Prednost pri uporabi imaju neutralni deterdženti (pH između 6 i 8) koji se lako

otapaju u toploj i hladnoj vodi [127].

Čišćenje toplom vodom i deterdžentom u praksi uklanja oko 80% ukupnog broja mikroorganizama s površina [82,128]. Čišćenje površina i predmeta se provodi prema rutinski utvrđenom rasporedu, a sukladno dostupnim smjernicama. Kod mehaničkog čišćenja prostora vrlo je važno voditi računa o načinu čišćenja kako bi čišćenje bilo učinkovito i kako bi se čišćenjem spriječila dodatna kontaminacija prostora patogenima [82]. Primjerice, voda koja služi za čišćenje i razrjeđivanje deterdženta se treba učestalo mijenjati, a pomoćna sredstva za čišćenje, posebice ako su višekratna (krpe, metle, brisači) redovito dekontaminirati jer mogu poslužiti kao rezervoar patogena i izazvati širenje kontaminacije [82].

Nadalje, preporuka kod čišćenja je da se provodi od vrha prema dnu i od čistog prema nečistom, kako bi se minimalizirala mogućnost širenja kontaminacije [130]. Ravne i široke površine bi se trebale čistiti imitirajući oblik pisanja slova "S" [130].

Čišćenje kao metoda dekontaminacije uvijek prethodi dezinfekciji kako bi se uklonila nečistoća i organska tvar s površina zbog potencijalne interakcije biocidne aktivne tvari iz dezinficijensa s organskom tvari, što dovodi do smanjenja učinkovitosti antimikrobnog učinka dezinficijensa [82,128].

#### ***1.4.2. Dezinfekcija kao metoda održavanja higijene bolničkog okoliša***

Dezinfekcija podrazumijeva metodu dekontaminacije kojom se selektivno uklanjaju mikroorganizmi s površina, predmeta, opreme, sluznice i kože pacijenata i bolničkog osoblja [128].

Obzirom na kontaminaciju i širenje patogenih mikroorganizama te opseg i učestalost bolničkih infekcija, razlikuju se sljedeće vrste dezinfekcije:

##### *a) Rutinska (profilaktička) dezinfekcija*

Svrha rutinske dezinfekcije je sprječavanje širenja patogena tijekom zdravstvene njege i liječenja, a provodi se svakodnevno prema utvrđenim protokolima i procedurama. Obuhvaća čišćenje i dezinfekciju prostora u neposrednoj blizini pacijenta, a za koje se može pretpostaviti da su kontaminirane patogenima [122,131].

##### *b) Ciljna dezinfekcija*

Ciljna dezinfekcija se provodi u tijeku trajanja zarazne bolesti, izolacijom patogenog mikroorganizma ili u slučaju vidljive kontaminacije površina, predmeta i prostora. Cilj joj je

spriječiti širenje uzročnika [122,131].

*c) Završna (terminalna) dezinfekcija*

Završna dezinfekcija se primjenjuje u slučajevima dokazane kolonizacije/zaraze pacijenta patogenom, a obuhvaća sve površine i predmete u blizini pacijenata za koje je očekivati da bi mogle biti kontaminirane patogenom [82,122,131].

Dezinfekcija se u bolničkom okolišu provodi mehaničkim, fizikalnim i kemijskim putem.

*a) Mehanička dezinfekcija*

Mehanička dezinfekcija obuhvaća postupke mehaničkog čišćenja, ventilacije i filtracije. Mehaničko čišćenje uključuje postupke struganja, metenja i pranja. Ventilacija prostora služi smanjenju broja mikroorganizama disperziranih u zraku u obliku čestica ili kapljica i provodi se prirodnim putem ili mehanički. Filtracija se provodi uporabom zračnih filtera koji smanjuju kontaminaciju i širenje mikroorganizama iz zraka. Mehanička dezinfekcija u pravilu dovodi do relativno manjeg smanjenja broja mikroorganizama s površina, a provodi se kao dopunska metoda fizikalnoj ili kemijskoj dezinfekciji [131].

*b) Fizikalna dezinfekcija*

Fizikalna dezinfekcija podrazumijevaju uporabu zračenja ili topline za smanjenje broja mikroorganizama na površinama ili disperziranih u zraku. Česta fizikalna metoda dezinfekcije je uporaba UV zračenja. Za postizanje optimalnog antimikrobnog učinka koristi se UVB i UVC u području spektra valne duljine između 220 i 315 nm. Najčešća metoda fizikalne dezinfekcije je uporaba topline iznad temperature od 60 °C. Najčešće korištene metode uporabe topline podrazumijevaju iskuhavanje, pasterizaciju, kuhanje i dezinfekciju vodenom parom [131].

*c) Kemijska dezinfekcija*

Najčešće korištena metoda dezinfekcije u bolničkoj sredini je kemijska dezinfekcija. Kemijska dezinfekcija obuhvaća uporabu kemijskih tvari i smjesa (biocidnih proizvoda) za smanjenje broja mikroorganizama s površina, predmeta, uređaja ili kože bolničkog osoblja i pacijenata [61,128].

Biocidni proizvodi koji se koriste u dezinfekciji mogu biti razvrstani u dvije kategorije: kategorija 1 koja obuhvaća antiseptike i dezinfekcijska sredstva koja se koriste na neoštećenoj koži te kategoriju 2 koja se koristi za dezinfekciju površina [113,132]. Obje vrste moraju biti

registrirane sukladno važećim propisima harmoniziranog europskog zakonodavstva [133].

Najčešće vrste korištenih dezinfekcijskih sredstava za dezinfekciju površina u bolničkom okolišu su kvarterni amonijevi spojevi, alkoholi (etilni alkohol 70% i izopropilni alkohol), aldehidi (formaldehid, glutaraldehid, paraformaldehid, orto-ftalaldehid (OPA) i dr.), klorni preparati, fenolni preparati, oksidansi (vodikov peroksid, peroctena kiselina) [128].

Navedeni dezinficijensi se vrlo često koriste i u kombinaciji radi postizanja aditivnog ili sinergističkog učinka, uglavnom imaju točno određenu namjenu obzirom na svojstva te se moraju koristiti sukladno uputama proizvođača [128].

Izbor dezinfekcijskog sredstva u dekontaminaciji bolničkog okoliša ovisi o razini dezinfekcije koja se želi postići ovisno o funkcionalnoj jedinici prostora ili vrsti rizika površine/predmeta (kritični i ne kritični predmeti) [128]. Niska razina dezinfekcije se provodi na predmetima, uređajima, površinama koji nisu kritični, ali dolaze u kontakt s kožom i često se dijele između osoblja ili se dotiču. Ova vrsta dezinfekcije uništava većinu vegetativnih oblika osim *Mycobacterium tuberculosis* i nekih vrsta gljiva. Uobičajeni izbor sredstava za nisku razinu dezinfekcije je uporaba niskih koncentracija klornih preparata, kvarterni amonijevi spojevi, niske koncentracije vodikovog peroksida, fenolni dezinficijensi i 70% etilni alkohol [113].

Srednja razina dezinfekcije provodi se na površinama, predmetima i uređajima kada je potrebno uništenje svih vegetativnih oblika mikroorganizama, uključujući i gljive. Provodi se uporabom dezinficijensa poput etilnog alkohola, izopropanola, više koncentracije klornih preparata i vodikovog peroksida. Ova vrsta dezinfekcije uklanja *M. tuberculosis*.

Visoka razina dezinfekcije se provodi na predmetima, površinama, uređajima koji mogu doći u kontakt s oštećenom kožom ili sluznicom. Visokom razinom dezinfekcije uništavaju se sve vegetativne vrste mikroorganizama, uključujući gljive i viruse, međutim ne uništavaju se bakterijske spore, koje se uništavaju tek kod produženog djelovanja dezinficijensa. Podrazumijeva korištenje glutaraldehida, viših koncentracija vodikovog peroksida, hipoklorita, peracetičnu kiselinu i OPA. Ponekad zahtijeva i korištenje osobne zaštitne opreme [113].

#### **1.4.2.1. Čimbenici koji utječu na učinkovitost kemijske dezinfekcije**

Na učinkovitost kemijske dezinfekcije i odabir optimalnog dezinficijensa utječe niz čimbenika koji uključuju lokaciju i brojnost patogena u bolničkom okolišu, fizikalno-kemijske utjecaje okoliša i intrinzične osobine ciljnog patogena [114,128].

Brojnost mikroorganizma na površinama utječe na učinkovitost dezinfekcije jer

povećani broj mikroorganizama zahtjeva duže vrijeme izloženosti i više koncentracije dezinficijensa kako bi se uklonili [114].

Lokacija također može otežavati postupak dezinfekcije ako se provodi na teško dostupnim mjestima, uređajima koji se moraju rastavljati te ako se provodi na uređajima i predmetima koji nemaju ravne i linearne površine pa dezinficijens ne može prodrijeti do svih dijelova.

Prigodna koncentracija i biocidni učinak različitih dezinficijenasa vezano za vrijeme izloženosti je također važan čimbenik u učinkovitosti dezinfekcije. Načelno je pravilo da se povišenjem koncentracije dezinficijensa skraćuje vrijeme izloženosti, tj. da se brže postiže biocidni učinak. Međutim, eksponenti koncentracije variraju ovisno o vrsti biocidne aktivne tvari [128].

Vrijeme izloženosti je nadalje važan čimbenik učinkovitosti dezinfekcijskog sredstva. U praksi, za dezinfekciju planktonskih oblika mikroorganizama potrebno je slijediti upute proizvođača kako bi se ostvario optimalni biocidni učinak [128].

Prisutstvo organske ili anorganske tvari na površinama također smanjuje učinkovitost dezinfekcijskog sredstva iz razloga što biocidna aktivna tvar može reagirati s prisutnom tvari i na taj način smanjiti dostupne količine biocidne aktivne tvari za djelovanje na patogene, a osim toga, organska tvar može poslužiti kao barijera i na taj način pružati fizičku zaštitu od djelovanja dezinficijensa [128].

Od fizikalno – kemijskih parametara koji utječu na učinkovitost dezinfekcijskog sredstva ističu se temperatura, vlažnost zraka, pH i tvrdoća vode.

Među najvažnije intrinzične osobine ciljnog patogena koje mogu umanjiti učinkovitost dezinfekcije jesu sposobnost stvaranja biofilma i smanjena osjetljivost/otpornost na biocidne aktivne tvari i [114,128].

### ***1.4.3. Sterilizacija***

Sterilizacija je metoda dekontaminacije kojom se uklanjaju i uništavaju svi oblici mikroorganizama, uključujući i bakterijske spore. Razlikujemo fizikalne, fizikalno – kemijske i kemijske postupke sterilizacije. U bolničkom okolišu, sterilizacija se kao mjera prevencije i kontrole širenja patogenih mikroorganizama provodi na visoko kritičnim predmetima i u visoko kritičnim funkcionalnim jedinicama (kirurške sale) [134].

#### ***1.4.4. Čimbenici koji utječu na učinkovitost postojećih metoda čišćenja i dezinfekcije u bolničkom okolišu***

Postojeće metode kemijske dezinfekcije uvelike doprinose prevenciji i kontroli širenja infekcija, posebice u izvanbolničkoj sredini, međutim u bolničkom okolišu prevladava specifična mješavina čimbenika koji učinkovitost postojećih metoda kemijske dezinfekcije uvelike otežavaju. Mnoge studije ukazuju na činjenicu da je unatoč intenzivnom provođenju sustavnih mjera čišćenja i dezinfekcije, bolnički okoliš i dalje kontaminiran mikroorganizmima [70].

Među dionicima u bolničkim sustavima, napose stručnjacima za prevenciju bolničkih infekcija postoji konsenzus za poboljšanjem postojećih metoda čišćenja i dezinfekcije, cilj koji nije lako ostvariti imajući na umu specifičnosti bolničkog okruženja [58]

Među raznim čimbenicima koji mogu utjecati na učinkovitost dezinfekcije u bolničkom okruženju najčešće se ističe problemi s osobljem, krivo provođenje dezinfekcijskih protokola i nepropisna uporaba dezinficijensa, toksični učinak postojećih kemijskih dezinficijensa na osoblje i okoliš, kontaminacija tekućih kemijskih dezinficijenasa MDR patogenima, smanjena osjetljivost i otpornost biofilma MDR patogena stvorenog na bolničkim površinama [59,82,114,128].

##### *a) Problemi s osobljem*

Vrlo čest problem koji se ističe kada je riječ o provedbi učinkovitih metoda dekontaminacije bolničkog okoliša, posebice čišćenja i dezinfekcije je nedostatak osoblja za provedbu dekontaminacije, posebice osoblja za čišćenje, nedostatak financijskih sredstava za zapošljavanje dodatnog osoblja, česte izmjene djelatnika zaposlenih na poslovima čišćenja i održavanja te nedostatak edukacije osoblja. Osim toga, podjela odgovornosti u provedbi čišćenja i dezinfekcije se pojavljuje kao problem prema dostupnoj literaturi [59,82] .

##### *b) Problemi povezani s dekontaminacijskim protokolima i praksom*

Čest uzrok neučinkovitog čišćenja ili dezinfekcije je uporaba nekompatibilnog dezinficijensa na određene materijale, kao i primjena neodgovarajućeg pomoćnog sredstva za čišćenje. Primjerice, neka istraživanja navode da je učinkovitost krpa od mikrofibre na materijalu od kojeg se proizvode okviri kreveta manje učinkovita od uporabe vlažnih maramica [59].

Osoblje zaduženo za čišćenje radi praktičnosti primjene može dezinfekcijsko sredstvo



ukloniti iz originalne ambalaže (u slučaju razrjeđivanja) i posljedično ga može primjenjivati protivno primjeni i načinu uporabe navedenom na naljepnici. Nadalje, dezinfekcijska sredstva se mogu neadekvatno razrijediti ili primjeniti uz prekratko vrijeme izloženosti, što također doprinosi smanjenju učinkovitosti [59,70,82,128].

Primjena nekompatibilnog dezinficijensa, kao i predugačko vrijeme izloženosti može rezultirati nagrizanjem površine, što dovodi do stvaranja oštećenja na površini materijala, a što naknadno može rezultirati kontaminacijom patogenima koje je teže ukloniti s hrapavih površina [77].

c) *Toksički utjecaj na osoblje i okoliš*

Postojeći kemijski dezinficijensi su prema svojoj prirodi opasne kemikalije koje ispoljavaju toksični učinak na ljude i okoliš te štetan učinak na materijale na koje se primjenjuju [70,77]. Toksični učinak koji uzrokuju biocidne aktivne tvari u dezinfekcijskim sredstvima ovisi o vrsti kemikalije, trajanju izloženosti, količini kemikalije, ruti izloženosti. Do akutne izloženosti najčešće dolazi prilikom nezgoda s kemikalijom zbog neopreznog rukovanja i može uključivati izloženost višim količinama kemikalije, a kronična izloženost nastaje ponavljanim izlaganjem nižih koncentracija toksične kemikalije [128].

Osim opasnosti za ljude, toksične rezidue dezinficijensa obično završavaju u otpadnim vodama, dok se plastični otpad koji nastaje praznom ambalažom također smatra opasim i potrebno ga je negdje odložiti.

d) *Kontaminacija dezinficijensa višestruko otpornim mikroorganizmima*

Tekuća dezinfekcijska sredstva mogu biti kontaminirana potencijalnim patogenom, najčešće *P. aeruginosa*. Dezinfekcijska sredstva se najčešće mogu kontaminirati u slučaju kontaminirane vode kojom se rade potrebna razrjeđenja, kontaminiranih spremnika za čuvanje dezinficijensa ili u slučaju široko raširene kontaminacije okoliša u kojem se dezinfekcijsko sredstvo koristi [128].

e) *Smanjena osjetljivost i otpornost na postojeća dezinfekcijska sredstva*

Smanjena osjetljivost MDR patogena na postojeća dezinfekcijska sredstva u velikoj mjeri otežava učinkovitu dezinfekciju postojećim kemijskim sredstvima te zahtijeva nove pristupe u metodama dezinfekcije kako bi se taj fenomen riješio, a u najvećoj je mjeri povezana sa stvaranjem biofilma [102].

f) *Stvaranje biofilma*

Strategije za uklanjanje biofilma s neživih bolničkih površina zahtijevaju multidisciplinarni pristup i obuhvaćaju metode koje izazivaju prvotni stres u stanicama biofilma što ga čini podložnijim djelovanju biocidne aktivne tvari u dezinfekcijskom sredstvu.

Nadalje, prisustvo perzistera u biofilmu omogućuje ponovni rast i stvaranje biofilma, stoga je potrebno onemogućiti njegovo ponovno stvaranje [106]. Takav multidisciplinarni pristup uključuje protokole čišćenja koji bi mehanički uklonili površinski sloj biofilma koristeći deterdžente i kelirajuće tvari te naknadno korištenje dezinficijensa [59].

## **1.5. Alternativne metode dezinfekcije i dekontaminacije bolničkog okoliša**

Kontaminacija neživih površina bolničkog okoliša biofilmom veliki je izazov iz aspekta prevencije i kontrole bolničkih infekcija, posebice zbog osobina koje mikroorganizmi u biofilmu ispoljavaju [64,135]. Osim toga, postojeća dezinfekcijska sredstva koja se koriste za dezinfekciju u bolničkim sredinama su opasne kemikalije, toksične za ljude i za okoliš.

Nadalje, kraj 20. i početak 21. stoljeća globalno obilježava i borba protiv klimatskih promjena koje zahtijevaju poduzimanje određenih koraka kako bi se smanjile emisije štetnih antropogenih utjecaja na okoliš. U to se može ubrojiti i održivi pristup korištenju opasnih kemikalija koje ispuštanjem u otpadne vode mogu ispoljavati toksični učinak na vodene organizme, a doprinose i problematici gospodarenja otpadom nastalim od ambalaže.

Europska unija je kao politička i gospodarska unija 2019. godine donijela iznimno važan strateški dokument naziva Europski zeleni plan koji sadržava niz prijedloga kako bi klimatska, energetska, prometna i porezna politika EU-a bila prikladna za smanjenje neto emisija stakleničkih plinova za najmanje 55% do 2030., u usporedbi s razinama iz 1990. Rezultat potpune primjene Europskog zelenog plana rezultirao bi da Europa do 2050. godine postane prvi klimatski neutralan kontinent [136].

Još jedan važan strateški dokument koji je podržava ciljeve Europskog zelenog plana je i usvajanje Strategije održivosti Europske unije u području kemikalija za prelazak na netoksični okoliš. Strategija, kao ključni dokument ističe važnost održivog pristupa korištenju opasnih kemikalija kako bi se omogućila zelena tranzicija te ističe važnost inovacija u industriji [137].

Jedan od načina postizanja ciljeva je i promicanje zamjene toksičnih kemikalija na manje toksične, kao i postupno ukidanje onih s najvećim utjecajem na zdravlje ljudi i stanje okoliša [137]. Nastavno na navedeno, primjena inovativnih i alternativnih rješenja za učinkovitu dezinfekciju bolničkog okoliša se može shvatiti i kao jedan od prioriteta kako bi se

ispunili ambiciozni ciljevi Strategije i Europskog zelenog plana.

Neke od novih alternativnih metoda za dezinfekciju bolničkog okoliša su:

### ***1.5.1. Nova tekuća dezinfekcijska sredstva***

Među nova tekuća dezinfekcijska sredstva ubrajamo poboljšani vodikov peroksid, dezinfekcijska sredstva koja sadržavaju kombinaciju vodikovog peroksida s drugim biocidnim aktivnim tvarima te elektroliziranu vodu [114].

#### ***1.5.1.1. Vodikov peroksid i dezinfekcijska sredstva bazirana na vodikovom peroksidu***

Primjena poboljšanog, 0.5% vodikovog peroksida, kao i kombinacije vodikovog peroksida s perocetnom kiselinom učinkovita je za dezinfekciju MDR patogena, čak i spora [114,128]. Među negativne aspekte primjene ovih metoda dezinfekcije je štetno djelovanje na materijale, cijena proizvoda, mogući toksični učinak na ljude prilikom akutne izloženosti i vrijeme potrebno da se provede učinkovita dezinfekcija [114].

#### ***1.5.1.2. Elektrolizirana voda***

Elektrolizirana voda se proizvodi elektrolizom natrijevog klorida u komori za elektrolizu koja sadrži membranu između anode i katode [138]. Glavne prednosti su kratko vrijeme primjene, netoksičnost i mogućnost primjene na površine blizu pacijenata, međutim neka istraživanja provedena na *Staphylococcus* spp. pokazuju da je nakon primjene moguć ponovni rast [114].

### ***1.5.2. Antimikrobne površine***

Antimikrobne površine su izrađene od raznih materijala tretiranih antimikrobnim sredstvom koje posljedično uništava ili inhibira rast mikroorganizama na njima. Prema načinu djelovanja razlikujemo antiadhezivne površine i antimikrobne premaze [82].

### **1.5.2.1. *Antiadhezivne površine***

Svrha antiadhezivnih površina je sprječavanje bakterijske adhezije na površine premazivanjem površine materijala antiadhezivnim sredstvom. Jedan od primjera je premaz polietilen glikola, ugljika poput dijamanta ili polimera sa zwitterionima koji stvara hidrofilnu površinu te otežava adheziju hidrofobnih površina bakterijske stanice na površinu. Nedostatak ove metode je izostajanje biocidnog učinka na mikroorganizme [82,114].

### **1.5.2.2. *Antimikrobne površine***

Antimikrobne površine su površine premazane antimikrobnim sredstvom, često srebrom ili bakrom. Ioni bakra i srebra se vežu na tiolne skupine bakterijskih enzima i proteina, inaktiviraju ih što posljedično dovodi do biocidnog učinka [82]. Nedostatak ove metode je mogućnost razvoja otpornosti na ione srebra i bakra [82,114].

### **1.5.3. *Biološka dezinfekcijska sredstva***

Biološka dezinfekcijska sredstva podrazumijevaju korištenje živih organizama i njihovih metabolita [114] u kontroli kontaminacije bakterijama. Metode koje se spominju u dostupnoj literaturi su korištenje bakteriofaga, enzima i bakteriocina. Primjena bakteriofaga podrazumijeva tretiranje površina medijem s bakteriofagima, metoda koja se pokazala uspješnom na kateterima [114] i u borbi protiv biofilma.

Nedostatak metode je mogućí razvoj bakterijske otpornosti [82,114] i nedostatak pravnog okvira za kliničku primjenu. Od dezinfekcijskih sredstava sa enzimima, najčešće je opisano korištenje enzima s hidrolitičkim i oksidacijskim djelovanjem (haloperoksidaze, perhidrolaze) [114], dok je primjena nisina, kao baktericina opisana da uspješno djeluje na biofilm MRSA-a [114,139].

### **1.5.4. *Fotosenzibilizatori***

Još jedna od alternativnih metoda dezinfekcije je uporaba fotosenzibilnih molekula na površinama koje pod djelovanjem svjetla stvaraju slobodne radikale [82]. Primjer fotosenzibilizatora je premazivanje površina katalizatorom koji sadrži titanov dioksid.

Pozitivna strana primjene ove metode je smanjeni negativni učinak na ljude i okoliš.

### ***1.5.5. Automatski sustavi za dekontaminaciju prostora***

Pod automatske sustave za dekontaminaciju prostora podrazumijevamo metode dekontaminacije prostora uporabom biocidne aktivne tvari aplicirane putem automatskog uređaja, ne ručno [60,79,82]. Dostupni podaci navode razne metode automatske dekontaminacije prostora, međutim najšesće korištene u praksi su dekontaminacija vodikovim peroksidom u obliku aerosola ili pare, dezinfekcija UV, vodena para, plazma, i plinoviti ozon.

Obično se koriste za završnu dezinfekciju [60,82]. Pozitivne strane korištenja automatskih sustava za dekontaminaciju su brzina ciklusa, mogućnost dekontaminacije zraka i površina koje se inače teško čiste ili do kojih je teško doći, povoljan utjecaj na okoliš jer njihovo korištenje podrazumijeva manje otpada [60].

Dezinfekcija putem automatskih sustava je učinkovita metoda dekontaminacije, međutim ne može zamijeniti rutinsko čišćenje, koje uvijek mora prethoditi dezinfekciji [82]. Osim toga, negativne strane ove vrste dezinfekcije su toksičan utjecaj pojedinih biocidnih aktivnih tvari na ljude (vodikov peroksid, ozon), zahtijevanje odsustva pacijenata i osoblja iz prostora.

#### ***1.5.5.1. Para i aerosol vodikovog peroksida (HPV)***

Jedna od češće korištenih automatskih metoda dezinfekcije u bolničkim sredinama je dezinfekcija parom ili suhim aerosolom vodikovog peroksida [18,77,82]. Dezinfekcija parom vodikovog peroksida podrazumijeva korištenje topline za stvaranje pare i vodikov peroksid u koncentracijskom rasponu od 30-35%, dok dezinfekcija suhim aerosolom vodikovog peroksida koristi ultrazvučni raspršivač i koncentracijski raspon vodikovog peroksida od 5-6% .

Vodikov peroksid je snažan oksidans koji djelovanjem na staničnu stijenku bakterija uzrokuje stvaranje slobodnih radikala koji oštećuju membrane lipida, DNK i ostale stanične komponente važne za preživljavanje bakterija [77]. Mnoge studije ukazuju na učinkovitost pare ili suhog aerosola protiv MDR patogena, s naglaskom na povećanu učinkovitost sustava koji koriste paru vodikovog peroksida (HPV) [18,60,82].

Pozitivne strane korištenja automatskog sustava za dezinfekciju s vodikovim peroksidom su učinkovitost na MDR patogene, manje negativni utjecaj na okoliš, izostajanje toksičnih rezidua, kompatibilnost s velikim rasponom materijala, dobra distribucija unutar prostora [18,60,82].

Među negativne karakteristike izdvaja se cijena uređaja, vrijeme potrebno za ciklus

dezinfekcije, potencijalno toksičan utjecaj vodikovog peroksida na ljude, prostor za dezinfekciju mora biti bez ljudi i osoblja, a osoblje koje provodi dezinfekciju stručno osposobljeno [60,82].

#### **1.5.5.2. UV-C uređaji**

Ultraljubičasto zračenje, posebice u dijelu spektra 200-270 nm (najčešća valna duljina 254 nm) ispoljava biocidni učinak na mikroorganizme djelujući na oštećenje veza između DNK [82]. U praksi UV-C se najčešće koristi za dezinfekciju zraka ili ravnih površina unutar bolničke sredine [77].

Iako su dostupna istraživanja pokazala učinkovitost UV-C sustava za dezinfekciju na bolničke patogene [82], prilikom korištenja treba voditi brigu o faktorima koji utječu na učinkovitost ovakvog sustava za dezinfekciju poput pozicije lampe naspram površina i opreme koja se dezinficira, vremenu izloženosti, potencijalnim fizikalnim preprekama između lampe i površine koja se dezinficira, intenzitetu emitiranog svjetla i strujanju zraka u prostoriji [82].

#### **1.5.5.3. Vodena para**

Dezinfekcija vodenom parom učinkovita je metoda za uklanjanje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih mikroorganizama s površina [64,82,114]. Među pozitivne strane ove metode ističu se smanjeni negativni utjecaj na okoliš, kratko vrijeme dezinfekcije naspram ručne dezinfekcije i 90% manji utrošak vode, dok negativne strane korištenja vodene pare mogu biti inkompatibilnost s električnim uređajima, rezidualna vlaga koja nastaje nakon procesa, a koja može predstavljati sigurnosni rizik za bolničko osoblje i pacijente (opasnost od padova), opasnost od opekline prilikom nesigurnog rukovanja uređajem te eventualno oštećenje predmeta prilikom neprikladne uporabe [82,114].

### **1.6. Dezinfekcija plinovitim ozonom kao alternativna automatska metoda**

Stoljećima prije formalnog otkrića ozona ljudi su bilježili pojavu neobičnog mirisa u zraku povezanu s atmosferskim elektrostatskim pražnjenjem tijekom oluja, dok je prvi opis neobičnog mirisa koji se pojavljivao prilikom rada električne naprave opisao Van Marum 1785., iako miris nije povezao s otkrićem novog plina [140].

Otkriće ozona pripisuje se njemačko-švicarskom znanstveniku Christianu Friedrich

Schönbeinu, koji je tijekom 1839. godine primijetio oslobađanje neobičnog mirisa na anodi prilikom provođenja eksperimenata s elektrolizom vode.

Detaljnije podatke o kemijskoj strukturi ozona pružio je Jacques-Louise Soret 1865. godine te je utvrdio da je ozon zapravo troatomna alotropska modifikacija kisika. Nakon otkrića kemijske strukture ozona nastavlja se niz istraživanja povezanih s ozonom i konstruiranje prvih ozonatora, koji se pripisuju Von Siemensu [140].

Od početka 19. stoljeća pa sve do sada uporaba ozona kao snažnog oksidansa se naširoko primjenjuje za dezinfekciju vode za ljudsku potrošnju, obradu otpadnih voda opterećenih organskim i anorganskim onečišćenjem, za dezinfekciju površina, pribora, opreme i uređaja u raznim vrstama industrije (prehrambena industrija, tekstilna industrija i akvakultura) [139,141–144].

Ozon osim biocidnog učinka ima i jaki deodoracijski učinak te izbjeljuje materijal, što proširuje vrste industrija u kojima se može primjenjivati [145,146]. Osim navedenog, ozon se kao sredstvo za dekontaminaciju koristi i bolničkim sustavima za dekontaminaciju medicinskih uređaja [147,148], organski opterećene otpadne vode i bolnica te u terapijske svrhe prilikom tretmana kroničnih rana [149].

Tijekom pandemije SARS-CoV-2 virusa 2021. – 2023. godine počela se ispitivati i njegova uloga u dekontaminaciji zraka velikih javnih prostora, kao i dekontaminaciji osobne zaštitne opreme bolničkog osoblja i zdravstvenih radnika [142,145,150–154].

### ***1.6.1. Ozon - kemijske osobine i toksikološki profil***

Ozon je visoko reaktivan plin snažnog specifičnog mirisa, plavičaste boje sa molekularnom masom 48 g/mol [142] (**Tablica 1.**). Molekula ozona sastavljena je od 3 atoma kisika i njegova je alotropska modifikacija. Na sobnoj temperaturi je vrlo nestabilan, ne akumulira se u prostoru i spontano se nakon određenog vremena raspada na kisik i hidroksilni radikal, ne ostavljajući druge komponente raspada [140]. Ima relativno kratko vrijeme poluraspada koje iznosi 20-1524 minute u zraku i 10-80 minuta u vodi [142].

Jedan je od najsnažnijih poznatih oksidansa s oksidacijskim potencijalom od 2,07 V, snažniji od vodikovog peroksida, peroctene kiseline, molekularnog kisika i klora [142]. Zbog iznimne reaktivnosti i snažnog oksidacijskog djelovanja ozon ima izraženi biocidni učinak i ono što doprinosi širini spektra njegovog biocidnog djelovanja je činjenica da se može primjenjivati u dva medija – zraku i vodi [142,155].

Snažno reagira s prisutnom organskom i anorganskom tvari prisutnom u zraku ili vodi

što posljedično dovodi i do njegovog toksičnog učinka na ljude i životinje.

Toksični učinci ozona na ljude ovise o ruti izloženosti, vremenu izloženosti i primljenoj dozi. Primarni toksični učinak ozona je na respiratorni sustav gdje ovisno o dozi i nekim intrinzičnim osobinama izložene osobe može uzrokovati iritaciju, smanjenje plućne funkcije, pogoršanje simptoma postojećih stanja poput astme [151]. Ozon također ima izraženi citotoksični i genotoksični učinak [151,156]. Toksični učinak ozon ostvaruje djelovanjem na stanične membrane uz stvaranje reaktivnih kisikovih vrsti (eng., *reactive oxygen species*, ROS). Ozon potiče peroksidaciju masnih kiselina u membrani što dovodi do stvaranja slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih vrsta koje izravno djeluju na staničnu membranu dovodeći do njezina uništenja ili promjene permeabilnosti. Ozon također uzrokuje oksidaciju proteina i funkcionalnih grupa poput tiola, alkohola, aldehida [156].

Zbog toksičnosti, ozon je na razini Europske unije pravno reguliran. Prema trenutno važećoj europskoj legislativi razvrstan je kao opasna tvar s predloženim rasvrstavanjem obzirom na utvrđene toksične učinke kao oksidirajući plin 1 kategorije, nagrizajuće za kožu 1B kategorije, uzrokuje oštećenja oka 1 kategorije, akutna toksičnost 1 kategorije, specifična toksičnost za ciljane organe - ponavljano izlaganje 1 kategorije i toksični učinak na vodeni okoliš 1 kategorije [132].

Zbog toksičnog učinka na ljude i pri manjim koncentracijama, izloženost ozonu na radnom mjestu je regulirana propisima zaštite na radu, a prilikom izloženosti je potrebno korištenje osobne zaštitne opreme. U Republici Hrvatskoj je primjerice sukladno trenutno važećem Pravilniku o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima ("Narodne novine" 91/18) kratkotrajna granična vrijednost izloženosti ozonu 0,2 ppm [157].

**Tablica 1.** Fizikalno-kemijska svojstva ozona, izvor: [142]

Fizikalno-kemijska svojstva ozona	
Svojstvo	Vrijednost
Molekularna težina (g/mol)	48
Oksidacijski potencijal (V)	2,07
Vrelište (°C)	-111,9 ±0,3
Talište (°C)	-192,5 ±0,4
Vrijeme poluživota – zrak (min)	20 – 1524
Vrijeme poluživota – voda (min)	10 – 80
Gustoća plina (kg/m <sup>3</sup> ) na 0 °C i 1 atmosferi	1728
Termalna vodljivost na -183 °C (°C/m)	0,000531



### 1.6.2. Stvaranje ozona

Ozon u okolišu nastaje elektrostatskim djelovanjem visoke jakosti na molekule kisika u zraku ili izravnim djelovanjem UV zračenja [134]. U kontroliranim uvjetima ozon nastaje putem *in-situ* generatora ozona koji mogu biti statični, kao dio većeg sustava ili mobilni [140]. Kontrolirani proces tehnologije stvaranja ozona se temelji na prolasku struje zraka ili čistog kisika između dvaju elektroda (8-10 kV) razmaknutih < 3,0 mm (jedna elektroda mora presvučena dielektrikom poput stakla ili keramike) što dovodi do stvaranja jakog električnog polja (korone) [158]. Jako električno polje dovodi do cijepanja određenih molekula kisika koje naknadno reagiraju s preostalim molekularnim kisikom prema sljedećoj formuli [158]:



gdje M označava česticu plina

Količina stvorenog ozona varira ovisno o tome da li je stvaran iz zraka ili čistog kisika. U slučaju korištenja zraka kao sirovine za proizvodnju nastaje oko 2 -4% ozona i otprilike 0,01 – 4,0 % dušika, dok korištenjem čistog kisika rezultira s 10 – 12 % stvorenog ozona uz nešto manju produkciju dušika [140].

### 1.6.3. Primjena ozona kao sredstva za dezinfekciju bolničkog okoliša

Visoki oksidacijski potencijal, snažno antimikrobno djelovanje, relativno kratko vrijeme poluraspada, mogućnost primjene u zračnom i vodenom mediju, niska cijena i povoljniji utjecaj na okoliš u usporedbi s klasičnim tekućim dezinfekcijskim sredstvima samo su neki od čimbenika koji idu u prilog uvođenju ozona kao sredstva za dekontaminaciju u bolničkom sustavu [78,159–163].

Ozon se u bolničkom sustavu može koristiti za sve metode dekontaminacije, uključujući čišćenje, dezinfekciju i sterilizaciju, ovisno o vrsti materijala na koji se primjenjuje i na primjenjenu koncentraciju [142,147]. Pojedina istraživanja ispitivala su i djelovanje ozona kao sredstva za dezinfekciju ruku bolničkog osoblja [164].

Iako postoje brojne studije o primjeni ozona kao sredstva za sterilizaciju opreme, pribora i uređaja u bolničkim sustavima [134,142,147], literatura o primjeni ozona kao sredstva za

dezinfekciju bolničke okoline relativno je rijetka.

Pandemija SARS-CoV-2 virusa znatnije je promijenila trend dostupnih istraživanja antimikrobnih svojstava ozona kao potencijalnog dezinficijensa bolničkog okoliša i osobne zaštitne opreme. Dostupna istraživanja provedena tijekom pandemije potvrdila su učinkovitost ozona protiv SARS-CoV-2 virusa i potvrdila su praktičnosti primjene ozoniranja kao metode dezinfekcije [142,150,151,153].

Dostupna istraživanja provedena o učinkovitosti ozona u bolničkoj sredini *in - situ* s MDR patogenima kao ciljnim organizmima ograničena su na podatke o uspješnoj dezinfekciji bolničkog rublja ozonom [145,165], uspješnom rješavanju prijenosa MRSA kod bolničkog osoblja [166], djelomično uspješnu dekontaminaciju soba kontaminiranih MRSA-om [167] uspješnoj dezinfekciji operacijske sale plinovitom ozonom koncentracije 5 ppm [168] te uporabu ozona kao završnog dekontaminanta [169].

Osim navedenog, dostupne su brojne studije koje ukazuju na učinkovitost ozona prema MDR patogenima provedene *in vitro* na planktonskim oblicima *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii* [78,159,161,170,171].

Neka istraživanja navode i učinkovitost plinovitog ozona korištenog u kombinaciji s drugim dezinfekcijskim sredstvima poput vodikovog peroksida i UV zračenja, gdje je antimikrobni učinak na ciljne patogene bio jači naspram korištenja samo jednog dezinfekcijskog sredstva [154,172].

Sva opisana istraživanja odnose se na dokazivanje antimikrobne učinkovitosti plinovitog ozona na planktonske oblike patogena koje ozon uspješno i u vrlo niskim koncentracijama inaktivira, inhibira ili eradicira [77,93,160,173–177]. Ozon ostvaruje biocidni učinak i na bakterijske spore [77,162,172,178].

#### ***1.6.4. Čimbenici koji utječu na učinkovitost ozona kao dezinfekcijskog sredstva***

Da bi biocidni učinak ozona i njegovo antimikrobno djelovanje bili učinkoviti, ozon bi se trebao primjenjivati u optimalnim uvjetima. Niz je čimbenika koji utječu na antimikrobnu učinkovitost ozona, ovisno o vrsti medija u kojemu se ozon primjenjuje (vodeni medij i zrak) [170]. Nadalje, čimbenike možemo podijeliti ovisno o okolišnim uvjetima, vrsti ciljnog materijala te operativnim okolnostima [142].

Okolišni čimbenici se razlikuju ovisno o tome da li se ozon primjenjuje u zračnom ili vodenom mediju. Najvažniji okolišni čimbenici ozonizacije u zračnom mediju su temperatura, prosječna vlažnost zraka, količina organskog onečišćenja u prostoru, prosječni tlak zraka,

strujanje zraka u prostoru, prisustvo određenih polutanata u zraku i količina svjetlosti (posebice UV zračenja) (**Tablica 2.**) [142,179].

U vodenom mediju učinkovitost ozona će ovisiti o pH vode, temperaturi, provodljivosti i koncentraciji otopljene organske i anorganske tvari. Vrsta materijala je također važan čimbenik, posebice njegova poroznost, hidrofilne/hidrofobne karakteristike i količina prisutnog organskog onečišćenja na samom materijalu te agregatno stanje kontaminacije (vlažna, suha, biofilm). Prema Rutala i sur. ozon je kompatibilan s većinom materijala koji su dostupni u bolničkom okolišu poput stakla, keramike, polimernih materijala (polipropilen, polivinil klorid, polietilen, akril, silika, silikon), nehrđajućeg čelika i teflona [61].

Pod operativne okolnosti podrazumijevaju se i same intrinzične osobine ciljnog organizma (vrsta i oblik mikroorganizma) te primjenjena koncentracija ozona, vrijeme izloženosti, metoda stvaranja ozona, količina stvorenih kisikovih radikala i penetrabilnost [142]. Učinkovitost ozona raste s porastom temperature i relativne vlažnosti zraka, a opada s rastom pH vrijednosti [171].

**Tablica 2.** Čimbenici koji utječu na učinkovitost ozona kao dezinfekcijskog sredstva, izvor: [142]

Okolišni čimbenici	Vrsta materijala	Operativni
pH	Poroznost	Vrsta mikroorganizma
Provodljivost	Mikrobne kontaminacija	Koncentracija ozona
Temperatura	Suhi ili tekući supstrat	Vrijeme izlaganja
Vlažnost zraka	Biofilm	Metoda generiranja ozona
Tlak	Kvasivost	Penetrabilnost
Prisutnost organske tvari	Hidrofilnost/hidrofobnost	Koncentracija homogenizacije

#### 1.6.5. Biocidni učinak ozona

Ozon biocidni učinak na mikroorganizme može ostvarivati izravno i neizravno [141]. Pod izravnim biocidnim učinkom podrazumijeva se izravna elektrofilna inaktivacija, a neizravni učinak podrazumijeva stvaranje niza reaktivnih kisikovih vrsta koje nastaju spontanom raspadanjem ozona u zraku ili vodi. Ovisno da li ozon djeluje u vodenom ili zračnom

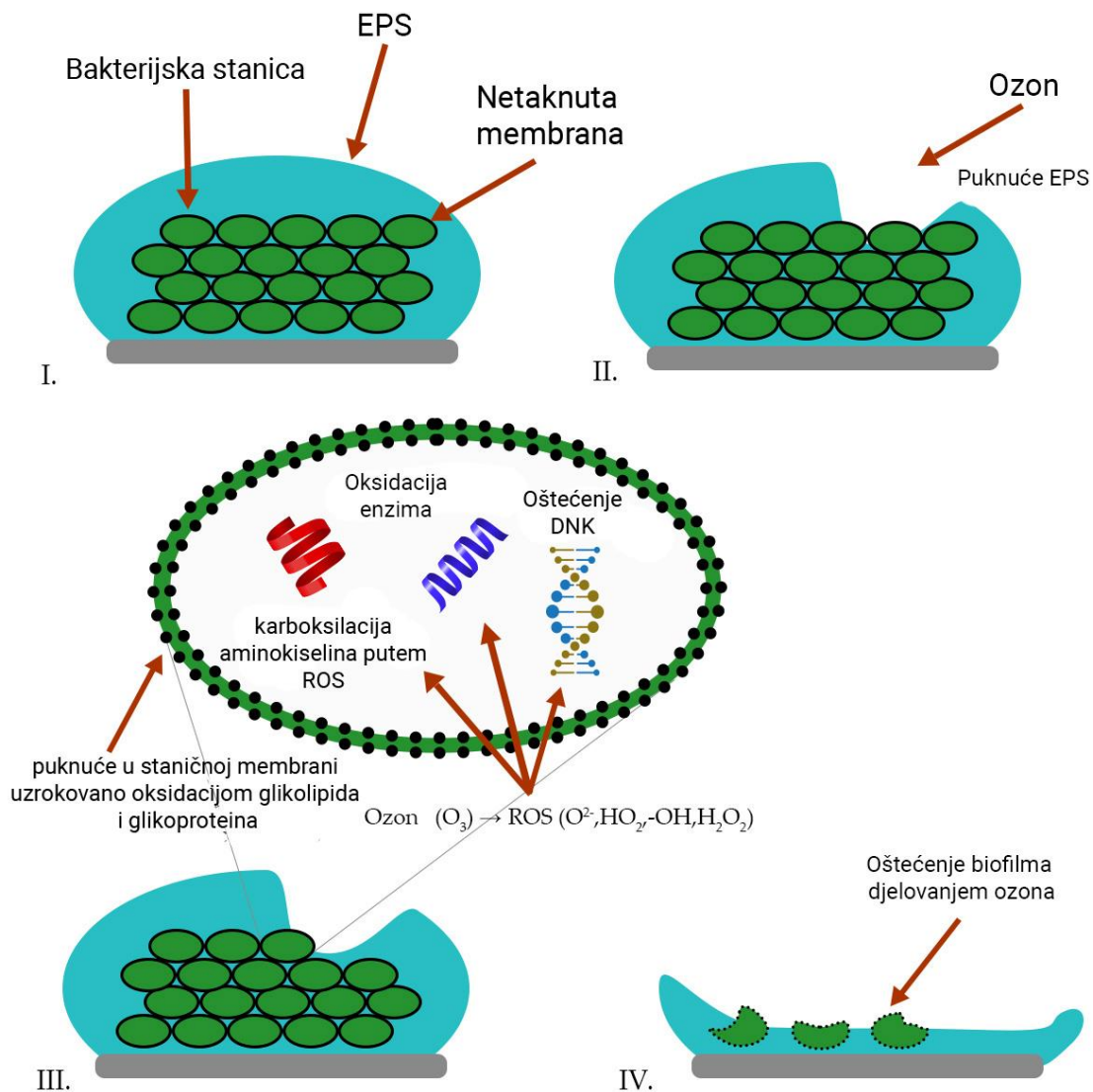
mediju variraju i stvorene reaktivne kisikove vrste koje mogu uključivati sljedeće radikale: hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), hidroperoksil ( $\text{HO}_2^\cdot$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^\cdot$ ),  $\text{O}_3^-$ , vodikov ozonid ( $\text{HO}_3$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singlet kisik  $^1\text{O}_2$  [140,142,180].

Opće prihvaćeni predloženi mehanizam djelovanja ozona jest peroksidacija lipida djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta oksidacijom aminokiselina i peroksidacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina stanične membrane [141,142,156,171,178,180]. Ozon također djeluje na lipoproteine i lipopolisaharide Gram-negativnih bakterija [141,178], a kod Gram-pozitivnih djeluje i na peptidoglikan u staničnoj stijenci (**Slika 7.**) [178].

Suprotno istraživanjima koja ukazuju na povećanu otpornost Gram-negativnih bakterija prema klasičnim tekućim kemijskim dezinfekcijskim sredstvima zbog deblje stanične membrane, dokazana je povećana osjetljivost Gram-negativnih bakterija na djelovanje ozona naspram Gram-pozitivnih zbog biocidnog učinka ozona na lipopolisaharid [178].

Oksidacija aminokiselina dovodi do preinake strukture proteina te promjena u staničnim funkcijama (promjena permeabilnosti membrane, curenje staničnog sadržaja, edemi). Peroksidacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina stvaraju se sekundarni produkti poput aldehida, peroksida i hidroksilnih radikala. Ti produkti su topivi u vodi i mogu prodrijeti u citosol te uzrokovati daljnju oksidaciju aminokiselina i proteina [156]. Stanična liza i posljedično curenje staničnog sadržaja uz deformacije stanične membrane često su uočeni rezultati biocidnog djelovanja ozona na staničnu membranu [141,181].

Osim peroksidacije lipida stanične stijenske, ozon oštećuje i nukleinske kiseline, brzo reagira s nukleotidnim bazama, posebice timinom, uracilom i gvaninom prilikom čega se oslobađaju fosfatni ion i/ili ugljikovodik [141,171]. Ozon uzrokuje oštećenje DNK izravno djelovanjem molekularnog ozona ili putem hidroksilnog radikala ili singlet kisika [182]. Ozon se veže na sulfhidrilne skupine enzima što dovodi do poremećaja enzimatske aktivnosti [171].



**Slika 7.** Biocidni učinak ozona na biofilm, autorski rad

#### 1.6.5.1. Oksidativni stres uzrokovan ozonom

Djelovanjem ozona sa strukturama stanične membrane mikroorganizma dolazi do raspada ozona i stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje uključuju niz slobodnih radikala od kojih je najreaktivniji hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ). Hidroksilni radikal djeluje i kao propagator daljnjih lančanih reakcija u stanici [141,180]. Hidroksilni radikal reagira neselektivno s većinom biomolekula te prolazi staničnu membranu i ulazi u stanicu gdje nastavlja s lančanim reakcijama [180]. Singlet kisik ( $^1\text{O}_2$ ) je također reaktivn i intermedijer u reakcijama reaktivnih kisikovih vrsta te vrlo brzo reagira s aminokiselinama, nezasićenim lipidima i nukleinskim kiselinama [141,180].

Reaktivne kisikove vrste specifične su po njihovoj reaktivnosti s drugim biomolekulama te između sebe. Međusobnim reagiranjem stvaraju intermedijere, propagatore daljnjih lančanih reakcija [180]. Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i njihova akumulacija unutar stanice mikroorganizma uzrokuje stanje oksidativnog stresa u kojemu dolazi do oštećenja lipida, proteina, DNK i posljedično stanične smrti [180].

#### ***1.6.6. Ozon i biofilm***

Podaci o biocinom učinku plinovitog ozona na biofilm patogena su u literaturi slabo dostupni.

Većina dostupnih istraživanja odnosi na utjecaj ozonirane vode na biofilm MDR patogena [139,164,183–186] ili se odnosi na biofilm patogena iz hrane [143,187–189] gdje ukazuje na antimikrobni učinak plinovitog ozona na biofilm ciljnih patogena, međutim potpuna eradikacija u većini studija izostaje [189–193].

U **Tablici 3.** je predložen prikaz automatskih metoda dezinfekcije kako na biofilmu, tako i na planktonskim oblicima mikroorganizama.

**Tablica 3.** Prikaz automatskih metoda dezinfekcije s prednostima i nedostacima, autorski rad

TEHNOLOGIJA	PREDNOSTI	NEDOSTACI	UČINKOVITOST PLANKTONSKI OBLICI	UČINKOVITOST BIOFILM
<b>PLINOVITI OZON</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ekološki prihvatljiv</li> <li>- ne ostavlja toksične rezidue</li> <li>- jeftin za uporabu</li> <li>- odlična distribucija po prostoru odlična protorna distribucija</li> <li>- dobar za dekontaminaciju površina koje se teško čiste</li> <li>- kompatibilan s raznim materijalima u bolničkoj okolini (keramika, staklo, nehrđajući čelik, PVC, PS, PE, silika, silikon, Teflon</li> <li>- kratko vrijeme poluraspada</li> <li>- primjenjiv za sve metode dekontaminacije (čišćenje, dezinfekcija, sterilizacija)</li> <li>- primjenjiv u zračnom i vodenom mediju</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prostor mora biti bez osoblja/pacijenata i potpuno zatvoren</li> <li>- zahtijeva prethodno mehaničko čišćenje</li> <li>- izrazita reaktivnost s organskom tvari</li> <li>- bolje djeluje pri većoj vlažnosti zraka</li> <li>- nekompatibilnost s gumenim materijalima</li> <li>- educirano osoblje</li> <li>- neugodan miris</li> <li>- toksičan za ljude</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rangel i sur., 2022. [73]</li> <li>- Epelle i sur., 2022. [152]</li> <li>- Epelle et al., 2022. [170]</li> <li>- Epelle i sur., 2023. [147]</li> <li>- Epelle i sur., 2023. [145]</li> <li>- Moccia i sur., 2020. [150]</li> <li>- Hoang Tu i sur., 2020. [168]</li> <li>- Giuliani i sur., 2018. [171]</li> <li>- Megahead i sur., 2018. [175]</li> <li>- Martinelli i sur., 2017. [155]</li> <li>- Doan i sur., 2012. [169]</li> <li>- Fontes i sur., 2012. [161]</li> <li>- Moat i sur., 2009. [78]</li> <li>- Jung Jung i sur., 2008. [172]</li> <li>- Sharma i sur., 2007. [159]</li> <li>- de Boer i sur. 2006. [166]</li> <li>- Aydogan i sur., 2006. [162]</li> <li>- Li i sur. , 2003. [160]</li> <li>- Kowalski i sur., 2003. [93]</li> <li>- Kowalski i sur., 1998. [174]</li> <li>- Cardoso i sur., 2000. [165]</li> <li>- Berrington i sur., 1998. [167]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ibanez – Cervantes i sur., 2022. [190]</li> <li>- Panebianco i sur., 2022.[188]</li> <li>- Panebianco i sur. 2021. [194]</li> <li>- Harada i sur., 2021. [189]</li> <li>- Marino i sur., 2018. [143]</li> <li>- Boch i sur., 2015. [192]</li> <li>- Bialoszewski i sur., 2011. [191]</li> <li>- Huth i sur., 2008. [195]</li> <li>- Kovač i sur., 2022. [196]</li> <li>- Kovač i sur., 2022. [197]</li> <li>- Nicholas i sur., [198]</li> <li>- Pajak – Zajac i sur., 2023. [199]</li> <li>- Martinelli i sur., 2017. [155]</li> </ul>

<b>VODIKOV PEROKSID (PARA I AEROSOL)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ekološki prihvatljiv</li> <li>- nema toksičnih rezidua</li> <li>- kompatibilan s raznim materijalima</li> <li>- dobra prostorna distribucija</li> <li>- kratko vrijeme ciklusa dekontaminacije</li> <li>- primjenjiv za sve metode dekontaminacije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cijena uređaja</li> <li>- educirano osoblje</li> <li>- zahtijeva prethodno mehaničko čišćenje</li> <li>- toksičan za ljude</li> <li>- prostor mora biti bez osoblja/pacijenata i potpuno zatvoren</li> <li>- reagira s organskom tvari</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fernandez i sur. 2020. [114]</li> <li>- Rutala i sur., 2019. [68]</li> <li>- Weber i sur., 2016. [60]</li> <li>- Dancer S.J., 2014. [82]</li> <li>- Abreu i sur., 2013. [64]</li> <li>- Chmielarczyk et al., 2012.</li> <li>- Doan i sur., 2012. [169]</li> <li>- Passaretti i sur., 2012. [75]</li> <li>- Linley i sur., 2012. [200]</li> <li>- Davies et al., 2011. [77]</li> <li>- French i sur., 2004. [18]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tachikawa i sur., 2014. [186]</li> <li>- Vankerckhoven i sur., 2011. [201]</li> <li>- Robbins i sur., 2004.[202]</li> <li>- Hassett i sur., 1999. [111]</li> </ul>
<b>UV-C ZRAČENJE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ekološki prihvatljiva</li> <li>- jednostavna metoda za primjenu</li> <li>- relativno jeftini uređaji</li> <li>- primjenjiv za dezinfekciju</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pravocrtno djelovanje UV svjetla</li> <li>- nije pogodno za osjenčane ili zakrivljene površine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fernandez i sur., 2020. [114]</li> <li>- Rutala i sur., 2019. [68]</li> <li>- Danceri sur., 2014. [82]</li> <li>- Abreu i sur, 2013. [64]</li> <li>- Boyce i sur., 2016. [59]</li> <li>- Rutala i sur., 2013. [70]</li> <li>- Davies i sur., 2011. [77]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sigler Zekanović i sur., 2022. [203]</li> <li>- Torzkadeh i sur., 2021. [204]</li> </ul>
<b>VODENA PARA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- jednostavna primjena</li> <li>- relativno kraće vrijeme dezinfekcije naspram ručne dezinfekcije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nekompatibilnost s električnim uređajima</li> <li>- opasnost od opekline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fernandezi sur., 2020. [114]</li> <li>- Rutala i sur., 2019. [68]</li> <li>- Dancer i sur., 2014. [82]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hua i sur., 2021. [205]</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"><li>- manji ukupni utrošak vode za dezinfekciju</li><li>- ekološki prihvatljivo</li><li>- primjenivo na sve metode dekontaminacije</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- ostavlja rezidualnu vlagu po površinama, opasnost od pada</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Abreu i sur., 2013. [64]</li></ul>	
--	--	---	--	--

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2.1. Hipoteze istraživanja

Hipoteze istraživanja jesu:

1. Odabrani patogeni stvoriti će veću količinu biofilma na polistirenu u odnosu na keramiku čemu će dodatno pogodovati organsko opterećenje
2. Učinkovitost antimikrobnog učinka ozona ovisi o vrsti tretiranog odabranog patogena, njegovoj sposobnosti stvaranja biofilma i otpornosti na oksidativni stres
3. Primjena odabrane ciljne koncentracija ozona i vremena izloženosti utvrđene *in vitro* pokusima učinkovito će reducirati broj bakterija u biofilmu *in situ*, kao i broj bakterija u zraku i na površinama

## 2.2. Ciljevi istraživanja

1. Odabrati najučestalije MDR patogene iz rutinskog rada OB Dr. Ivo Pedišić, Sisak (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*) te ispitati njihovu sposobnost stvaranja biofilma na polistirenu i keramici uz različito organsko opterećenje (Muller Hinton bujon (MHB), fiziološka otopina + MHB (1:1))
2. Utvrditi povezanost između sposobnosti stvaranja biofilma i fizikalno – kemijskih karakteristika (hidrofobnost/hidrofilnost i hrapavost nežive površine (keramika i polistiren) te hidrofobnosti/hidrofilnosti površine odabranih patogena
3. Uspostaviti eksperimentalni model za *in vitro* ispitivanje učinka plinovitog ozona na biofilmu odabranih standardnih sojeva i kliničkih izolata na polistirenu i keramici (model zatvorene kutije) te odrediti ciljnu koncentraciju i vrijeme izloženosti plinovitom ozonu koje djeluje na biofilm
4. U bolničkom okruženju *in situ* ispitati učinak plinovitog ozona ciljnom koncentracijom i vremenom izlaganja na biofilm odabranih patogena na polistirenu i keramici uz popratno praćenje učinkovitosti na bakterije u zraku i površinama
5. Utvrditi mehanizam djelovanja plinovitog ozona kojim ostvaruje antimikrobni učinak na biofilm odabranih MDR patogena praćenjem morfoloških promjena na strukturi biofilma, pojedinačnih bakterijskih stanica te praćenjem razine oksidativnog stresa u ispitivanih bakterija

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Model zatvorene kutije

Za potrebe provođenja *in vitro* dijela istraživanja izrađen je model zatvorene kutije. Dimenzije kutije su bile 50 cm x 50 cm x 50 cm, ukupnog volumena 125 L. Stranice kutije su izrađene od transparentnog polistirena, a podnica i pomični poklopac od bijelog iverala (**Slika 8.**). Na poklopcu je izveden ulaz za upuhivanje mješavine ozona/kisika ( $O_3/O_2$ ) putem silikonske cijevi promjera 6 mm.



**Slika 8.** Kutija za provođenje *in vitro* tretmana plinovitim ozonom, autorski rad

#### 3.1.2. Generator ozona

Za generiranje ozona korišten je mobilni generator ozona model Mozon GPF 8008 (Mozon, Sisak, Republika Hrvatska) doniran za potrebe izvođenja istraživanja od tvrtke Mozon d.o.o., Sisak, Republika Hrvatska (**Slika 9.**). Uređaj je pri maksimalnom kapacitetu i optimalnim uvjetima primjene sposoban stvarati 5 g mješavine  $O_3/O_2$  po satu.



**Slika 9.** Mobilni generator ozona model Mozon GPF 8008, autorski rad

### **3.1.3. Mjerni instrumenti za praćenje parametara u zatvorenoj kutiji**

Koncentracija ozona je kontinuirano praćena mobilnim mjeracem koncentracije ozona Keernuo GT901 (Keernuo, Kina), a relativna vlažnost zraka i temperatura zraka uz pomoć mobilne meteorološke stanice model Auriol 4-LD5531 (Munchen, Njemačka).

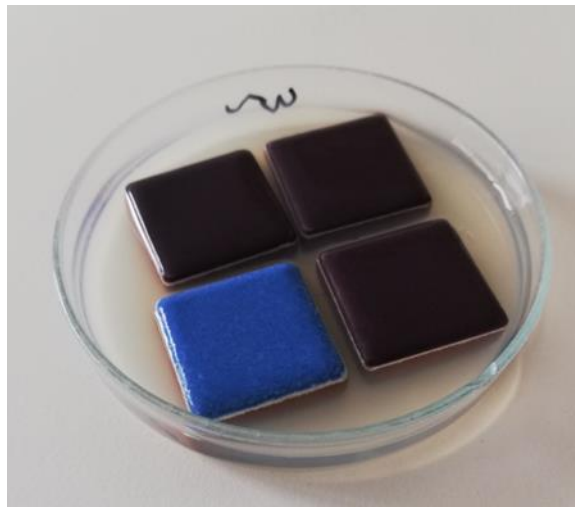
### **3.1.4. Bakterijski sojevi – model organizmi**

Kao model organizmi u istraživanju su se koristili sljedeći patogeni klasificirani kao MDR patogeni: *Klebsiella pneumoniae* 14, 15, 16, 33 i 34, *Acinetobacter baumannii* 23, 24, 40, 43, 44 i *Staphylococcus aureus* 2, 4, 6, 27 i 28 pribavljeni tijekom rutinskog rada Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak, Republika Hrvatska. Osim kliničkih sojeva u istraživanju su korišteni i sljedeći referentni bakterijski sojevi: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *A. baumannii* ATCC BAA1605, *A. baumannii* ATCC 19606, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 pribavljeni iz kolekcije kultura Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Rijeci.

### 3.1.5. Podloge za stvaranje biofilma

Podloge koje su se koristile za stvaranje biofilma su mozaične keramičke pločice dimenzija 2.5 cm x 2.5 cm koje su služile kao model keramičke površine (**Slika 10.**), a mikrotitarske pločice sa 12 jažica (Sigma Aldrich, TC treated, TPP® tissue culture plates, Merck, Njemačka) su se koristile kao model polistirenske površine za stvaranje biofilma.

Prije korištenja keramičke pločice su mehanički očetkane, oprane deterdžentom te sterilizirane u suhom sterilizatoru (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) na 160 °C tijekom 1,5 sata.



**Slika 10.** Keramičke pločice u Petrijevoj zdjelici, autorski rad

### 3.1.6. Bolnička soba –model za *in situ* istraživanje

*In situ* dio istraživanja proveden je u bolničkoj sobi za postoperativni oporavak pri Općoj bolnici dr. Ivo Pedišić, Josipa Juraja Strossmayera, Sisak, Republika Hrvatska. Soba se nalazi u prizemlju novog bolničkog krila, dimenzija 4 m x 3 m x 2,7 m, ukupnog volumena 32,4 m<sup>3</sup> i u trenutku provođenja istraživanja opremljena stretcher kolicima, stolom, stolicom, ormarom od iverala, keramičkim umivaonikom te telefonom (**Slika 11.**). Ventilacija u sobi je osigurana prirodnim putem (prozori) i putem centraliziranog ventilacijskog sustava.



Slika 11. Soba za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak, autorski rad

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Prikupljanje kliničkih MDR patogena

Sojevi MDR patogena korišteni kao model organizmi u ovom istraživanju prikupljeni su prilikom rutinskog rada Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak u Zavodu za javno zdravstvo Sisačko-moslavačke županije koji vrši uslugu mikrobiološkog laboratorija i analiza za potrebe Opće bolnice dr. Ivo Pedišić. Prikupljeno je ukupno 40 izolata iz krvi i urina pacijenata koji su pohranjeni na Felix agaru dostavljeni za potrebe istraživanja.

Identifikacija patogena utvrđena je pomoću uređaja VITEK 2 (Biomérieux, SAD). Podaci o identitetu, spolu, mjestu prebivališta datumu rođenja i drugi osobni podaci pacijenata od kojih su sojevi pribavljeni istraživaču su bili nedostupni. Prije početka prikupljanja patogena, ishodena je suglasnost Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak.



### **3.2.2. Antimikrobna karakterizacija prikupljenih kliničkih MDR patogena**

Svi prikupljeni sojevi MDR sojevi su testirani na osjetljivost na antibiotike primjenom disk difuzijske metode prema važećim EUCAST standardima u trenutku uzorkovanja, verzija 12.0. Kriterij za daljnji odabir MDR patogena koji su se koristili kao model organizmi u nastavku istraživanja bila je prisutnost višestruke rezistencije na antibiotike, sukladno postojećim standardima (stečena otpornost na najmanje jedan lijek u tri ili više klasa antibiotika) [6]. Svi sojevi su pohranjeni na -80 °C u glicerol bujonu (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

### **3.2.3. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma model organizama na keramici i polistirenu uz različito organsko opterećenje**

Za stvaranje biofilma korišteni su sljedeći model organizmi: referentni sojevi *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *A. baumannii* ATCC BAA1605, *A. baumannii* ATCC 19606, *K. pneumoniae* ATCC 700603 i *K. pneumoniae* NCTC 13442 i sljedeći klinički sojevi: *K. pneumoniae* 14, 15, 16, 33, 34, *A. baumannii* 23, 24, 40, 43 i 44 i *S. aureus* MRSA 2, 4, 6, 27 i 28. Stvaranju biofilma prethodila je priprema keramičkih pločica (mehaničko četkanje, pranje u deterdžentu i suha sterilizacija) te priprema hranjive podloge. Hranjiva podloga pripremila se na način da se 2% agar dodao u destiliranu vodu, otopio u autoklavu te privremeno skladištio u vodenoj kupelji (BactoSonik - Bandelin, Berlin, Njemačka) na 50 °C.

Sterilne keramičke pločice postavile su se u sterilne staklene petrijeve zdjelice te su zalivene agarom na način da je gornja površina pločica ostala neznatno iznad agara. Prekonoćna bakterijska suspenzija pripremljena je dan prije na način da se mala količina bakterijske kulture suspendirala u 5 mL Muller Hinton bujona (MHB) te ostavila na inkubaciji na 37 °C u inkubatoru (Binder, Njemačka). Potom je prekonoćna bakterijska suspenzija razrijeđena u Muller Hinton bujonu (MHB), ali i u mediju omjera 1:1 MHB: fiziološka otopina kako bi se stvorili uvjeti različite količine organskog opterećenja, homogenizirana te je izmjerena optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm na spektrofotometru (Eppendorf, Biophotometer, model#6131, Hamburg, Njemačka).

Optička gustoća uzoraka namještena je između 0,100 i 0,250, što odgovara broju bakterija od  $10^8$  CFU/mL. Na keramičke pločice i polistirenske mikrotitarske pločice preneseno je  $10^5$  CFU/mL, koncentracija dobivena naknadnim razrjeđenjem inicijalne bakterijske suspenzije.

Nakon prijenosa suspenzije na keramiku, uzorci su inkubirani na  $25\pm 2$  °C uz lagano miješanje, 30 – 50 RPM u kupelji (Heidolph Unimax 1010, Njemačka), a polistiren u inkubatoru (Binder, Njemačka) na  $25\pm 2$  °C.

Nakon inkubacije određivan je ukupan broj bakterija u biofilmu na način da su se keramičke pločice sterilnom hvataljkom uklonile iz agara, dva puta isprale fiziološkom otopinom te prebacile u Falcon tubu koja je sadržavala 10 mL sterilne fiziološke otopine.

Sadržaj jažica mikrotitarskih polistirenskih pločica je također dva puta ispran fiziološkom otopinom. Zatim se pristupilo soniciranju keramičkih pločica i polistirenskih mikrotitarskih pločica u ultrazvučnoj kupelji (BactoSonik - Bandelin, Berlin, Njemačka) 1 minutu na 40 Hz kako bi se potaklo odvajanje biofilma od površine. Nakon homogenizacije, izrađena su deseterostruka razrijeđenja koja su nasadena na Muller Hinton agar i inkubirana 24 sata na  $35\pm 2$ °C u inkubatoru (Binder, Njemačka). Nakon inkubacije određen je ukupni broj bakterija u biofilmu izražen kao CFU/cm<sup>2</sup> brojanjem poraslih kolonija (eng. *colony forming units*, CFU).

### **3.2.4. Fizikalno kemijska karakterizacija materijala**

#### **3.2.4.1. Određivanje hidrofилnosti i hidrofobnosti keramike i polistirena**

Klasične mozaik pločica za kupaonicu (2.5 cm x 2.5 cm) u triplikatu su se koristile kao keramička površina, dok su se mikrotitarske pločice sa 12 jažica (Sigma Aldrich, TC treated, TPP® tissue culture plates, Merck, Njemačka) koristile kao model polistirenske podloge. Na sterilnim keramičkim pločicama i mikrotitarskim jažicama određivano je fizikalno svojstvo hidrofилnosti i hidrofobnosti površine.

Hidrofилnost i hidrofobnost se određivala uporabom goniometra (Data Physics OCA 20 Instruments GmbH, Njemačka) i mjerenjem kontaktnog kuta koristeći metodu sesilne kapljice volumena 2 µm (eng. *contact angle measurements*, CAM). Svako pojedinačno mjerenje je ponavljano 5 puta. Mjerenja su vršena na temperaturi od 25 °C.

#### **3.2.4.2. Određivanje hrapavosti keramike i polistirena**

Topologija površine keramičkih pločica i polistirenskih mikrotitarskih pločica (hrapavost) se analizirala uporabom mikroskopa atomske sile (eng. *atomic force microscopy*, AFM) Dimension Icon koristeći „tapkajuću“ metodu (Bruker, Billerica, MA, SAD).

„Tapkajuća“ metoda se koristila za dobivanje skenirane površine pločica uz korištenje Bruker SNL-10 tip D konzole od silicij nitrida sa silicijevim vrhom radijusa vrha od 2 nm. Skeniranje je provedeno s dimenzijama 2 i 5  $\mu\text{m}^2$  sa 512 skenirajućih linija. Svaka linija je imala 512 točaka sa kojih su prikupljeni podaci za analiziranje. Podaci dobiveni mjerenjem su obrađeni putem korisničkog softvera Bruker Nanoscope Analysis kako bi se izvršila korekcija nagiba i pramca.

### **3.2.5. Određivanje fizikalno – kemijskih svojstava površine model organizama**

Korištenjem mikrobne adhezije prema otapalima (eng. *microbial adhesion to solvents*, MATS) određivana su fizikalno-kemijska svojstva hidrofobnosti/hidrofilnosti te kiselo-bazna svojstva površine odabranih model organizama (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*). Korištena otapala su: kloroform, heksan i dietil eter, svako zasebno. Suspenzija bakterija u NaCl 0,15 mol L<sup>-1</sup> približno 10<sup>8</sup> CFU/mL i odabrano otapalo homogenizirano je u vorteksu 2 minute da se dobije emulzija. Nakon 15 minuta inkubacije, izmjerena je apsorpcija vodene faze na 400 nm. Postotak vezanih stanica za svako pojedinačno otapalo izračunao se putem sljedeće jednadžbe:

$$\%Adh = 1 - A0/A1 \quad (4)$$

gdje je A0 absorbancija bakterijske suspenzije prije miješanja s otapalom, a A1 absorbancija nakon miješanja s otapalom.

### **3.2.6. Uspostava modela za in vitro istraživanje i određivanje ciljne koncentracije ozona**

Model za *in vitro* dio istraživanja se uspostavio na način da je izrađena eksperimentalna zatvorena kutija koja je služila za tretiranje keramičkih pločica i polistirenskih mikrotitarskih pločica s biofilmom model organizama radi određivanja ciljne koncentracije ozona i ciljnog vremena izloženosti.

Ciljna koncentracija ozona u uspostavi modela bila je najniža koncentracija koja je ostvarivala ponovljive rezultate i značajnu redukciju biofilma – 25 ppm. Ciljno vrijeme izloženosti utvrđeno je kao najkraće vrijeme izloženosti koje ostvaruje ponovljive rezultate i značajnu redukciju biofilma – 1 sat.

Za određivanje ciljne koncentracije i ciljnog vremena izloženosti koristili su se referentni sojevi *K. pneumoniae*. 24- satni biofilm referentnih sojeva model organizama na keramici i polistirenu tretiran je različitim koncentracijama ozona (5 ppm, 10 ppm, 15 ppm and

25 ppm) kroz različito vrijeme izlaganja (10 minuta, 20 minuta, 30 minuta i 1 sat). Kod svih pokusa, vlažnost unutar kutije je bila 56% - 58% a temperatura  $23 \pm 2$  °C. Detalji *in vitro* tretmana ozonom biofilma model organizama na keramici i polistirenu su objašnjeni u dijelovima 3.2.7. i 3.2.8.

Nakon što se prvotno utvrdila ciljna koncentracija ozona (25 ppm) i ciljno vrijeme izloženosti (1 sat) pristupilo se *in vitro* dijelu ispitivanja na svim referentnim i kliničkim sojevima model organizama.

### ***3.2.7. In vitro tretman biofilma model organizama na keramici plinovitim ozonom***

Prije tretmana ozonom, keramičke pločice s 24-satnim biofilmom (3 pločice po soju/3 ponavljanja) su se isprale s 10 mL sterilne fiziološke otopine te su posušene u digestoru tijekom 1 minute. Potom su se otklopljene petrijeve zdjelice s pločicama razmjestile na različita mjesta unutar eksperimentalne kutije. Mjerač koncentracije ozona, kao i meteorološka stanica su također smještene unutar kutije. Nakon toga, kutija se hermetički zatvorila i pohranila u komoru digestora.

Biofilm keramičkih pločica se tretirao ciljnom koncentracijom ozona (25 ppm) kroz 1 sat izlaganja. Svi tretmani su obavljani pri sobnoj vlažnosti zraka (oko 56%) i sobnoj temperaturi od 23°C kako bi se postigli praktični uvjeti primjene.

Nakon tretmana ozonom, keramičke pločice su sterilnom pincetom izvađene iz petrijeve zdjelice, isprane s 10 mL sterilne fiziološke otopine te su prebačene u Falcon tube koje su sadržavale 10 mL sterilne fiziološke otopine. Tube sa keramičkim pločicama su potom sonicirane u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin-BactoSonic, Germany) tijekom 1 minute na 40 Hz.

Nakon homogenizacije, izrađena su deseterostruka razrijeđenja koja su nasadena na MH agar te inkubirana tijekom 24 - 48 sati na  $35 \pm 2$ °C u inkubatoru (Binder, Njemačka). Nakon inkubacije određen je ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu te izražen kao CFU/cm<sup>2</sup>.

Sva mjerenja i kontrole su rađene u triplicatu. Kontrola se osigurala na način da su se prilikom tretmana keramičke pločice s biofilmom model organizama u istim uvjetima držale u komori digestora bez tretmana ozonom.

### ***3.2.8. In vitro tretman biofilma model organizama na polistirenu plinovitim ozonom***

Prije tretmana s 25 ppm ozona tijekom 1 sat, jažice mikrotitarske pločice s formiranim 24-satnim biofilmom model organizama (5 jažica po soju/3 ponavljanja) su isprane s 200 µL

sterilne fiziološke otopine. Zatim je uklonjena sva preostala tekuća faza, a mikrotitratske pločice su posušene u digestoru tijekom 1 minute te izložene djelovanju ozona u eksperimentalnoj kutiji.

Nakon završetka vremena izlaganja, mikrotitratske pločice su izvađene iz kutije, isprane s 200  $\mu\text{L}$  sterilne fiziološke otopine te sonicirane u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin-BactoSonic, Germany) 1 min na 40Hz i naposljetku homogenizirane.

Nakon što su se izradila deseterostruka razrjeđenja, 10  $\mu\text{L}$  suspenzije (6 kapi) se nasadilo na MH agar i inkubiralo 24 - 48 sati na  $35\pm 2$  °C.

Po završetku inkubacije, pristupilo se određivanju ukupnog broja kultivabilnih bakterija izraženih kao CFU/cm<sup>2</sup>. Sva mjerenja i kontrole su rađena u triplikatu.

Kontrola se osigurala na način da se prilikom tretmana mikrotitratske pločice s biofilmom model organizama u istim uvjetima držala u komori digestora bez tretmana ozonom.

### ***3.2.9. Određivanje ukupne biomase metodom kristal violet bojenja***

Kao metoda određivanja ukupne biomase u biofilmu model organizama, tretirani biofilm na polistirenu, keramici i kontrole su se podvrgnule metodi kristal violet bojenja.

Ozonom tretirane mikrotitratske pločice i kontrolne mikrotitratske pločice (5 jažica po soju/3 ponavljanja) s biofilmom model organizama su se dva puta isprale s 10 mL fiziološke otopine i osušile.

Nakon toga je u svaku jažicu dodano 0,02% kristal violeta i ostavljeno da stoji 10-15 minuta na zraku. Dodana boja se potom isprala dva puta s 10 mL fiziološke otopine i posušila na zraku. Za kvantifikaciju biomase se u svaku polistirensku jažicu dodalo 3 mL 30% octene kiseline te se pristupilo mjerenju na 600 nm na spektrofotometru (Eppendorf, Biophotometer, model #6131, Njemačka).

Kod keramičkih pločica, tretirane pločice i kontrole su sterilno uklonjene iz agara s pincetom, dva puta isprane s fiziološkom otopinom i stavljene u petrijevu zdjelicu. Nakon toga, keramičke pločice su fiksirane 30 minuta na 80° C u sterilizatoru na suhi zrak (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska), obojane s 0,1% kristal violetom te ostavljene da stoje tijekom 30 minuta. Nakon toga, obojane pločice su se isprale s 20 mL sterilne fiziološke otopine, tretirale s 95% etanolom tijekom 15 minuta uz intenzivno miješanje te se potom pristupilo mjerenju na spektrofotometru (Eppendorf, Biophotometer, model #6131, Njemačka) na valnoj duljini od 600 nm.

### 3.2.10. Utvrđivanje vijabilnosti model organizama metodom ATP bioluminiscencije

ATP bioluminiscencija se također koristila kao dodatna metoda za utvrđivanje vijabilnih bakterija u biofilmu model organizama. Kod ove metode, mjerena je količina produciranog svjetla iz ATP-a putem luminometra 3M Clean-Trace™ (3M, SAD) (Slika 12.), a metoda je korištena samo na keramičkim pločicama.

Cjelokupna površina tretiranih keramičkih pločica i kontrola s biofilmom model organizama (3 pločice po soju/3 ponavljanja) je prebrisana brisnim štapićem 3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100 (3M, SAD) koji je prethodno uronjen u reagens luciferina i luciferaze tijekom 1 minute. Nakon jedne minute inkubacije, brisni štapić se stavio u 3M Clean-Trace™ luminometar. Očitana količina produciranog svjetla je izražena u RLU jedinicama (eng. *relative light units*,RLU).



Slika 12. Luminometar 3M Clean-Trace™ (lijevo) i keramička pločica u agaru (desno), autorski rad

### 3.2.11. Određivanje vijabilnosti model organizama Dead Live bojenjem

Za određivanje vijabilnosti model organizama korišten je LIVE/DEAD®BacLight™ Bacterial Viability Kit solution (Molecular Probes, Eugene, Oregon, SAD) prema naputku proizvođača. Nakon tretmana plinovitim ozonom, keramičke pločice i polistiren s formiranim biofilmom reprezentativnih sojeva model organizama (*K. pneumoniae* OXA NCTC 13442, *A. baumannii* ATCC BAA1605 i *S. aureus* MRSA ATCC 43300) (2 uzorka po soju/3 ponavljanja)

su se pažljivo isprale fiziološkom otopinom.

Istovremeno je pripravljena radna otopina fluorescentnih boja (SYTO-9 i propidium jodod (PI)) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, SAD) koja je nanešena na površine keramike i polistirena te inkubirana u mraku tijekom 15 minuta. Uzorci su se zatim isprali sterilnom fiziološkom otopinom radi uklanjanja viška boje.

Fluorescencija iz obojenih stanica promatrana je pomoću Olympusovog konfokalnog mikroskopa FV300 (Olympus Optical Company, Tokio, Japan) s 40x LCPlanF objektivom.

Maksimumi emisije za boje su određeni oko 480/500 nm za SYTO® 9 boju i 490/635 nm za PI boju. Simultano dvokanalno snimanje korišteno je za prikaz zelene i crvene fluorescencije.

Dobivene slike pohranjene su u TIFF formatu te dalje obrađene pomoću ImageJ 1.47 (National Institute of Health, Bethesda, MA, SAD).

Uzorci i kontrole su rađene u triplikatu. Kontrole su osigurane provođenjem identičnog postupka Dead/Live bojenja na netretiranom biofilmu model organizama.

### ***3.2.12. Utvrđivanje morfoloških promjena u biofilmu model organizama***

#### ***3.2.12.1. Digitalna mikroskopija***

Ozonom tretirani i kontrolni biofilm model organizama (*K. pneumoniae* OXA NCTC 13442) na keramičkim pločicama prethodno je tretiran kristal-violetom sukladno protokolu opisanom u točki 6. te je podvrgnut digitalnoj mikroskopiji korištenjem digitalnog mikroskopa DSX1000 (Olympus, Tokyo, Japan) uz povećanje od 20 puta. Mikroskopiranje je provedeno na 3 različita mjesta (1mm×1mm) na površini biofilma model organizama. Digitalna mikroskopija je služila za prikaz 2-dimenzionalne i 3-dimenzionalne strukture biofilma reprezentativnog soja model organizama na analiziranim mjestima.

#### ***3.2.12.2. Mikroskopija atomskih sila***

Prethodno ozonom tretirane keramičke pločice s biofilmom reprezentativnog soja model organizma (*K. pneumoniae* OXA NCTC 13442) su radi određivanja topologije površine biofilma podvrgnute mikroskopiji atomskih sila. Topologija površine keramičkih pločica se analizirala uz pomoć AFM Bruker Dimension Icon koristeći „tapkajuću“ metodu.

„Tapkajuća“ metoda se koristila za dobivanje skenirane površine keramičkih pločica

uz korištenje Bruker SNL-10 tip D konzole od silicij nitrida sa silicijevim vrhom radijusa vrha od 2 nm. Dobiveni podaci su se obradili s ciljem dobivanja vrijednosti parametara hrapavosti površine nakon korekcija nagiba i pramca korištenjem vlasničkog softvera Bruker Nanoscope Analysis.

### 3.2.12.3. *Pretražna elektronska mikroskopija*

Za provedbu analize morfoloških promjena ozonom tretiranog biofilma model organizama na keramičkim pločicama korišten je pretražni elektronski mikroskop model Quanta 250 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (**Slika 13.**). Snimanje je provedeno na keramičkim pločicama sa tretiranim biofilmom reprezentativnog soja model organizma (*K. pneumoniae* OXA NCTC 13442, *A. baumannii* ATCC BAA1605 i *S. aureus* MRSA ATCC 43300) (2 pločice po soju/3 ponavljanja) koje su prethodno fiksirane 4% otopinom glutaraldehida i dehidrirane dvostrukim ispiranjem u puferu i po 20 minuta u otopini etanola (50 - 100%).

Dobivene slike su detektirane putem Everhart – Thornley detektora u visokom vakumu (0.0915 Pa) s izvorom elektrona jakosti 5,0 kV, na udaljenosti 10 mm, dok je veličina točke bila 3,0 nm.





**Slika 13.** Pretražni mikroskop Quanta 250, autorski rad

#### **3.2.12.4. Utvrđivanje oksidativnog stresa**

Za određivanje razine oksidativnog stresa u biofilmu ozonom tretiranih model organizama kao i u kontrolama mjerena je razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Nakon ispiranja mikrotitarskih pločica s kontrolnim i ozonom tretiranim biofilmom model organizama, dodano je 2,5  $\mu$ l 2 mM 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) otopljenog u etanolu te je mješavina inkubirana na mješalici (15 rpm) (Heidolph Unimax 1010, Njemačka) na sobnoj temperaturi u mraku tijekom 1 sata.

Nakon 1 sata inkubacije spektrofotometrijska analiza intenziteta fluorescencije mjerena je na spektrofotometru Fluoromax 3 (Horiba, Japan) ( $\lambda_{exc}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 600 nm). Za fluorescentnu mikroskopiju 30  $\mu$ L kulture je stavljeno na stakalce i pokriveno pokrovnim stakalcem. Stanice su vizualizirane pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus IX51, Tokyo, Japan) korištenjem ekscitacijske valne duljine od 488 nm, a emisija je detektirana u rasponu od 500-600 nm.

### ***3.2.13. Ispitivanje učinka na kvalitetu zraka, mikrobiološku čistoću i biofilm model organizama in situ***

*In situ* dio istraživanja se provodio u sobi za postoperativni tretman pacijenata Opće bolnice „dr. Ivo Pedišić“, Sisak. Soba se prije korištenja mehanički očistila i hermetički zatvorila. Potom se pristupilo određivanju kvalitete zraka i mikrobiološke čistoće prostora.

Kvaliteta zraka se odredila uzorkovanjem zraka na tri različite lokacije unutar sobe (stol, prozorska daska, ormar) korištenjem uređaja za uzorkovanje MAS-100 Merck (Merck, Massachusetts 1803, SAD) (**Slika 14.**) prije i poslije tretmana ozonom.

Mikrobiološka čistoća prostora se određivala uzimanjem uzoraka metodom otiska i obriska na 5 lokacija u sobi prije i poslije tretmana ozonom (radni stol, ormar, ormar, prozorska daska, telefonska slušalica).

Uzorci keramičkih pločica (5 pločica po soju na odabranom mjestu u sobi) i polistirenskih mikrotitarskih pločica (5 pločica po soju na odabranom mjestu u sobi) s biofilmom referentnih sojeva model organizama starih 24 sata su postavljene u sobu.

Ozon je stvaran uz pomoć mobilnog generatora ozona model Mozon GPF 8008 (Mozon, Sisak, Hrvatska). Biofilmovi referentnih sojeva model organizama na polistirenu i keramici su izlagani ciljnoj koncentraciji ozona od 25 ppm tijekom 1 sat, pri sobnoj temperaturi 23,3°C i vlažnosti zraka od 52%. Koncentracija ozona je kontinuirano mjerena putem mobilnog senzora Keernuo GT901 (Keernuo, Kina), a temperatura i vlažnost zraka preko meteorološke postaje model Auriol 4-LD5531 (Auriol, Munchen, Njemačka).

Poslije tretmana ozonom, uzorci zraka na petrijevim zdjelicama i pločice za otiske su inkubirani na 35±2°C u inkubatoru (Binder, Njemačka).

Poslije inkubacije, izbrojane su porasle kolonije te se odredio ukupan broj bakterija izražen kao CFU/250L zraka i CFU/cm<sup>2</sup>. Uzorci biofilma referentnih model organizama na keramici, polistirenu i pripadajuće kontrole su se nakon tretmana ozonom obradili na način prethodno opisan u točkama 3.2.7. i 3.2.8.

Kontrola je osigurana na način da se se prilikom tretmana mikrotitarske pločice i keramika s biofilmom model organizama u istim uvjetima držale u susjednoj sobi za pacijente bez tretmana ozonom. Pokus je ponovljen u triplikatu.



**Slika 14.** Uređaj za uzorkovanje zraka MAS Merck (lijevo), soba za postoperativni tretman sa biofilmom model organizama (sredina) i pločice za određivanje mikrobiološke čistoće prostora (desno), autorski rad

### **3.2.14. Etički aspekti istraživanja**

Istraživanje je provedeno u skladu sa svim smjernicama glede etičkih aspekata. Prethodno su ishođene sve potrebne suglasnosti i dobivena su pozitivna mišljenja Etičkog povjerenstva Opće bolnice „dr. Ivo Pedišić“ iz Siska, gdje se provodio *in situ* dio istraživanja i prikupljali klinički uzorci MDR patogena. Uzorci su prikupljeni tijekom rutinskog rada i istraživač niti u jednom trenutku nije imao pristupa osobnim podacima pacijenata. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Rijeci.

### **3.2.15. Statistička obrada podataka**

Kategorijski podaci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom. Kontinuirani podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ili medijanom i granicama interkvartilnog raspona, u ovisnosti o normalnosti raspodjele.

Razlike kontinuiranih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirale su se t-testom (uz iskazanu razliku i 95% raspon pouzdanosti razlike), a između tri i više nezavisnih skupina analizom varijance (ANOVA) uz Student-Newman-Keuls post hoc test. Razlike u kontinuiranim varijablama između dva mjerenja testirane su Wilcoxonovim testom (iskazana razlika i 95% raspon pouzdanosti razlike).

Razina značajnosti je postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 22.016 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023) i SPSS (ver.23.0, SPSS Inc., SAD).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Osjetljivost model organizama na antibiotike

U **Tablici 4.** prikazana je osjetljivost odabranih sojeva *K. pneumoniae* na antibiotike.

Svi odabrani sojevi model organizama su otporni na amoksicilin, amoksicilin-klavulansku kiselinu, zatim na cefalosporinske antibiotike cefuroksim, cefaleksin, ceftazidim, cefpodoksim te na sulfonamidski antibiotik sulfametoksazol trimetoprim. Pojedinačno, svaki odabrani soj model organizma *K. pneumoniae* je otporan na 3 ili više klasa testiranih antibiotika. Najosjetljiviji soj je referentni soj KP ATCC 7006, dok su najotporniji klinički sojevi KP14 i KP 33. Svi sojevi osim soja KP 33 su bili osjetljivi na kolistin.

**Tablica 4.** Osjetljivost model organizma *K. pneumoniae* na antibiotike

Izolat	KP 14	KP 15	KP 16	KP 33	KP 34	KPATCC 700603	KPNCTC 13442
Uzorak	Urin	Urin	Urin	Krv	Urin	Urin	Nepoznat
Antibiotik	Osjetljivost izolata <i>K. pneumoniae</i>						
AMX	R	R	R	R	R	R	R
AMX-C	R	R	R	R	R	R	R
TZP	R	R	R	R	R	S	R
CEX	R	R	R	R	R	R	R
CXM	R	R	R	R	R	R	R
CRO	R	R	R	R	R	R	S
CAZ	R	R	R	R	R	R	R
CDP	R	R	R	R	R	R	R
CFIX	R	R	R	R	R	R	S
CFMP	R	R	R	R	R	R	S
IMP	R	S	I	R	I	S	S
MEM	R	I	R	R	R	I	R
ETP	R	R	R	R	R	S	R
GEN	R	S	R	R	R	R	S
AMK	S	S	S	R	S	S	S
NRFX	R	R	R	R	R	S	R
CIX	R	R	R	R	R	I	R
SXT	R	R	R	R	R	R	R
TC	R	R	R	S	R	R	R
COL	S	S	S	R	S	S	S
COL MIC microdillution µg/mL	0.500	0.250	0.500	64.00	0.250	0.500	0.125

R – otporan (eng., *resistant*, R); S – osjetljiv (eng., *sensitive*, S); I – intermedijarno (eng., *intermediate*, I), AMX – amoksicilin, AMX-C – amoksicilin klavulanska kiselina; TZP – piperacili tazobactam; CEX – cefaleksin; CXM – cerufoksim; CRO – ceftriakson; ceftazidim; CAZ – ceftazidim; CDP – cefpodoksim; CFIX – cefiksim; CFIMP – cefepim; IMP – imipenem; MEM – meropenem; ETP – ertapenem; GEN – gentamicin; AMK – amikacin; NRFX – norfloksacin; CIX – ciprofloksacin; SXT – sulfametoksazol trimetoprim; TC – tigeciklin; COL – kolistin; MIC - mikrorazrjeđenje

U **Tablici 5.** prikazani su rezultati osjetljivosti odabranih sojeva model organizma *A. baumannii* na antibiotike. Svi odabrani sojevi model organizma *A. baumannii* su pokazali otpornost na meropenem, gentamicin te na sulfonamidski antibiotik sulfametoksazol-trimetoprem. Pojedinačno, svaki odabrani soj model organizma *A. baumannii* je otporan na 3 ili više klasa testiranih antibiotika. Najosjetljiviji soj je referentni soj AB ATCC 19606, dok je najotporniji soj bio klinički AB 23.

**Tablica 5.** Osjetljivost odabranih sojeva model organizma *A. baumannii* na antibiotike

Izolat	AB 23	AB 24	AB 40	AB 43	AB 44	AB ATCC 1605	AB ATCC 19606
Uzorak	Aspirat traheje	Urin	Urin	Urin	Urin	Sputum	Urin
Antibiotik	Osjetljivost izolata <i>A. baumannii</i>						
IPM	R	R	R	R	R	R	S
MER	R	R	R	R	R	R	R
SAM	I	R	S	S	R	R	R
GEN	R	R	R	R	R	R	R
AMK	R	R	R	R	R	S	R
CIP	R	R	R	R	R	R	S
STX	R	R	R	R	R	R	R
COL	R	S	S	S	S	R	S

R – otporan (eng., *resistant*, R); S – osjetljiv (eng., *sensitive*, S); I – intermedijarno (eng., *intermediate*, I); IPM – imipenem; MER – meropenem; SAM – ampicilin + sulbaktam; GEN – gentamicin; AMK – amikacin; CIP – ciprofloksacin; STX – sulfametoksazol + trimetoprim; COL - kolistin

U **Tablici 6.** prikazana je osjetljivost odabranih kliničkih i referentnih sojeva model organizma *S. aureus* na antibiotike. Svi odabrani klinički sojevi model organizama *S. aureus* su bili otporni na penicilin, klindamicin, kloksacilin, azitromicin i klaritromicin. Pojedinačno, svaki odabrani klinički soj model organizma *S. aureus* je otporan na 3 ili više klasa testiranih antibiotika. Najosjetljiviji soj je referentni soj SA ATCC 29213, dok je najotporniji soj bio referentni SA ATCC 43300. Svi sojevi su bili osjetljivi na vankomicin.

**Tablica 6.** Osjetljivost odabranih sojeva model organizma *S. aureus* na antibiotike

Izolat	MRSA 2	MRSA 4	MRSA 6	MRSA 27	MRSA 28	SA ATCC 29213	SA ATCC 43300
Uzorak	Obrisak nazofarinksa	Krv	Krv	Krv	Urin	Rana	Nepoznato
Antibiotik	Osjetljivost izolata <i>S. aureus</i>						
PEN	R	R	R	R	R	S	R
CLN	R	R	R	R	R	S	R
CLOX	R	R	R	R	R	S	R
GEN	S	S	S	S	S	S	R
AZM	R	R	R	R	R	S	R
CLA	R	R	R	R	R	S	R
CIP	R	R	R	R	I	I	I
SXT	S	S	S	S	S	S	R
LZD	S	S	S	S	S	S	R
TC	S	S	S	S	S	S	S
VAN	S	S	S	S	S	S	S

R – otporan (eng., *resistant*, R); S – osjetljiv (eng., *sensitive*, S); I – intermedijarno (eng., *intermediate*, I); PEN – penicilin; CLN – klindamicin; CLOX – kloksacilin; GEN – gentamicin; AZM – azitromicin; CLA – klaritromicin; CIP – ciprofloksacin; SXT – sulfametoksazol + trimetoprim; VAN – vankomicin; LZD – linezolid; TC – tigeciklin

#### 4.2. Afinitet prema otapalima model organizama

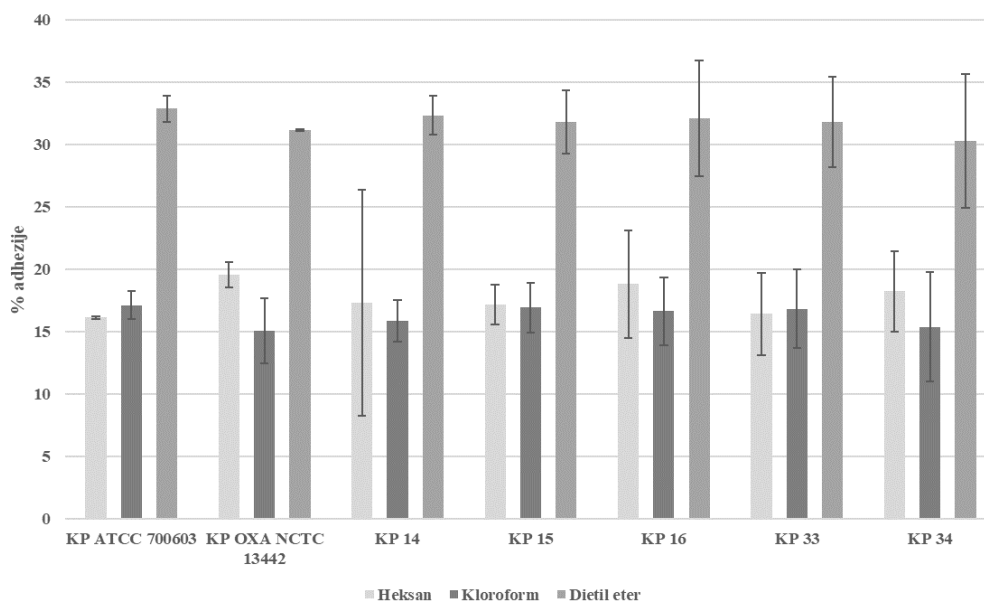
Afinitet odabranih sojeva *K. pneumoniae* prema polarnim, apolarnim i baznim otapalima izražen kao postotak adhezije prikazan je na **Slici 15**.

Sojevi *K. pneumoniae* pokazuju relativno malen postotak adhezije prema heksanu u rasponu od 16,15% (0,11) za KP ATCC 700603 do 19,57% (1,02) za KP OXA NCTC 13442 ukazujući na hidrofilna svojstva svih sojeva.

Afinitet prema kloroformu varira od 15,07% (2,59) za KP OXA NCTC 13442 do 17,0% (1,1) za KP ATCC 700603 ukazujući na slaba bazična svojstva odnosno elektron-donorska svojstva svih sojeva *K. pneumoniae*.

Postotak adhezije prema dietil eteru u rasponu od 30,21% (5,34) za KP 34 do 32,74% (1,04) za KP ATCC 700603 ukazuje na relativno slaba kisela (elektron-akceptorska) svojstva odabranih sojeva *K. pneumoniae*.

Svi odabrani sojevi *K. pneumoniae* pokazuju nešto više kisela (elektron-akceptorska) svojstva nego bazična (elektron-donorska svojstva).

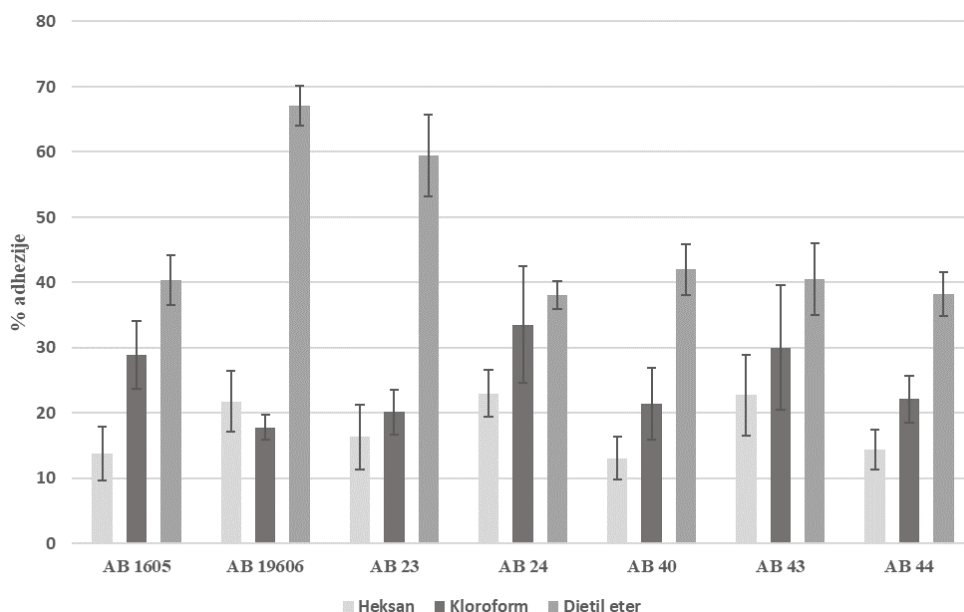


**Slika 15.** Postotak adhezije prema heksanu, kloroformu i dietil eteru za odabrane sojeve *K. pneumoniae*. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju.

Na **Slici 16.** prikazan je afinitet odabranih sojeva *A. baumannii* prema heksanu, kloroformu i dietil eteru izražen kao postotak adhezije. Postotak adhezije prema heksanu za *A. baumannii* varira od 13,11% (3,33) za AB 40 do 23,02% (3,61) za AB 24 ukazujući na hidrofilna do umjereno hidrofobna svojstva. Raspon postotka adhezije prema kloroformu varira od 17,8% (1,9) za AB 19606 do 33,52% (8,93) AB 24 pokazujući slaba bazična (elektron-donorska) svojstva odabranih sojeva.

Postotak adhezije prema dietil eteru za odabrane sojeve *A. baumannii* varira između 38,11% (2,15) za AB 24 do 67,09% (2,99) za AB 19606 ukazujući na umjereno kisela do kisela (elektron-akceptorska) svojstva.



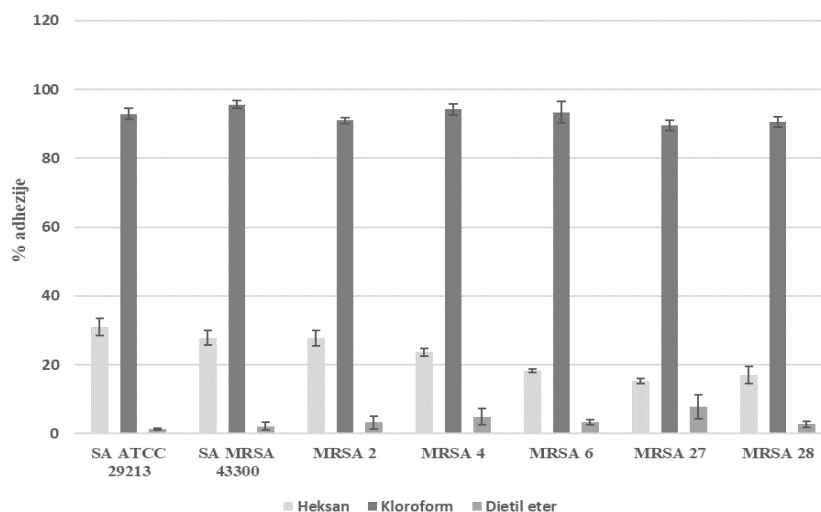


**Slika 16.** Postotak adhezije prema heksanu, kloroformu i dietil eteru za odabrane sojeve *A. baumannii*. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju.

Odabrani sojevi *S. aureus* prema postotku adhezije na heksan pokazuju pretežito umjereno hidrofobna svojstva, osim izuzetaka sojeva MRSA 6, MRSA 27 i MRSA 28 koji pokazuju hidrofila svojstva (**Slika 17.**).

Svi sojevi *S. aureus* pokazuju snažan afinitet prema kloroformu s rasponom postotka adhezije od 89,49% (1,54) za MRSA 27 do 95,64% (1,04) za SA MRSA 43300, ukazujući na snažna bazična (elektron-donorska svojstva).

S druge strane, afinitet prema dietil eteru za sve sojeve *S. aureus* je iznimno slab (raspon od 1,45% (0,27) za SA ATCC 29213 do 7,79% (3,53) za MRSA 27) indicirajući slaba kisela (elektron-akceptorska) svojstva.



**Slika 17.** Postotak adhezije prema heksanu, kloroformu i dietil eteru za odabrane sojeve *S. aureus*. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju.

### 4.3. Hidrofobnost, hidrofilnost i hrapavost keramike i polistirena

Hidrofobnost, hidrofilnost i hrapavost kao važna fizikalno - kemijska svojstva za adheriranje bakterija na keramičku i polistirensku površinu prikazana su u **Tablici 7**.

Kontaktni kut izmjeren za keramiku iznosi  $33,43^\circ(6,62)$ , a za polistiren  $3,82^\circ(0,58)$  indicirajući snažna hidrofilna svojstva obje vrste materijala. Kvadratna sredina (eng. *root mean square*, RMS) kao mjera hrapavosti površine za keramiku iznosila je 8,41 nm (0,18), a za polistiren 19,11 nm (1,94) ukazujući na glatku površinu odabranih materijala.

**Tablica 7.** Hidrofobnost/hidrofilnost i hrapavost keramike i polistirena. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju

		Aritmetička sredina (SD)
<b>Hidrofobnost / hidrofilnost (CAM)</b>		
	Keramika	33,43° (6,62)
	Polistiren	3,82° (0,58)
<b>Hrapavost površine RMS</b>		
	Keramika	8,41 nm (0,18)
	Polistiren	19,11 nm (1,94)

CAM – kontaktni kut (eng., *contact angle measurement*); RMS – kvadratna sredina (eng., *root mean square*), SD – standardna devijacija

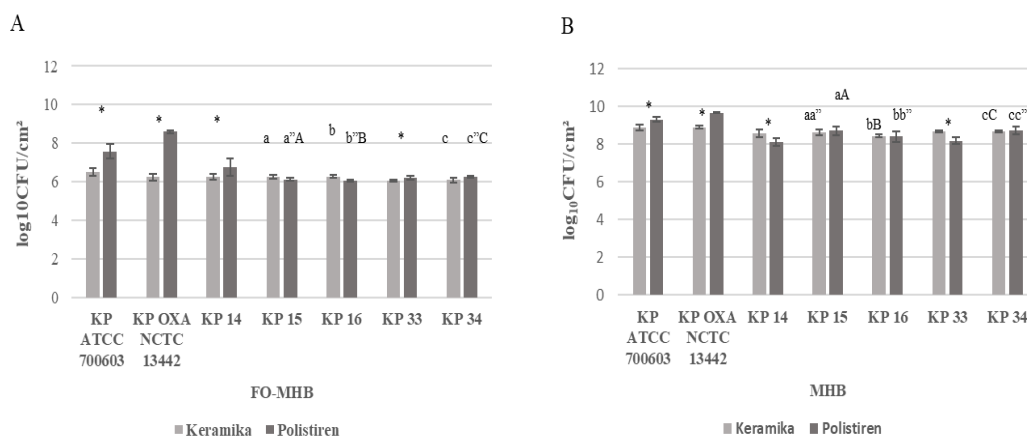
#### 4.4. Sposobnost stvaranja biofilma model organizama na keramici i polistirenu uz različito organsko opterećenje

Sposobnost stvaranja biofilma odabranih model organizama (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*) ispitivana je na dva različita materijala (keramika i polistiren) te uz dva različita organska opterećenja po svakom odabranom materijalu. Manje organsko opterećenje je predstavljala suspenzija Muller Hinton bujona (MHB) i fiziološke otopine (FO) u omjeru 1:1, a veće organsko opterećenje MHB.

Na **Slici 18.** A i B prikazana je sposobnost stvaranja biofilma odabranih sojeva model organizma *K. pneumoniae* na keramici i polistirenu za obje vrste organskog opterećenja.

Količina stvorenog biofilma varira od 6,03 (0,05)  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> do 9,69 (0,04)  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup>, ovisno o vrsti materijala i organskog opterećenja. *K. pneumoniae* stvara više biofilma pod povećanim organskim opterećenjem u svim slučajevim te u 4 od 7 odabranih sojeva stvara više biofilma na polistirenu.

Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u količini stvorenog biofilma unutar jednog bakterijskog soja utvrđene su između svih vrsta materijala i organskog opterećenja kod KP ATCC 700603, KP OXA NCTC 13442, KP 14 i KP 33, dok je kod sojeva KP 15, KP 16 i KP 34 utvrđena statistički značajna razlika između količina stvorenog biofilma na keramici nasuprot keramici MHB, keramici nasuprot polistirenu MHB; keramici MHB i polistirena te polistirena i polistirena MHB.

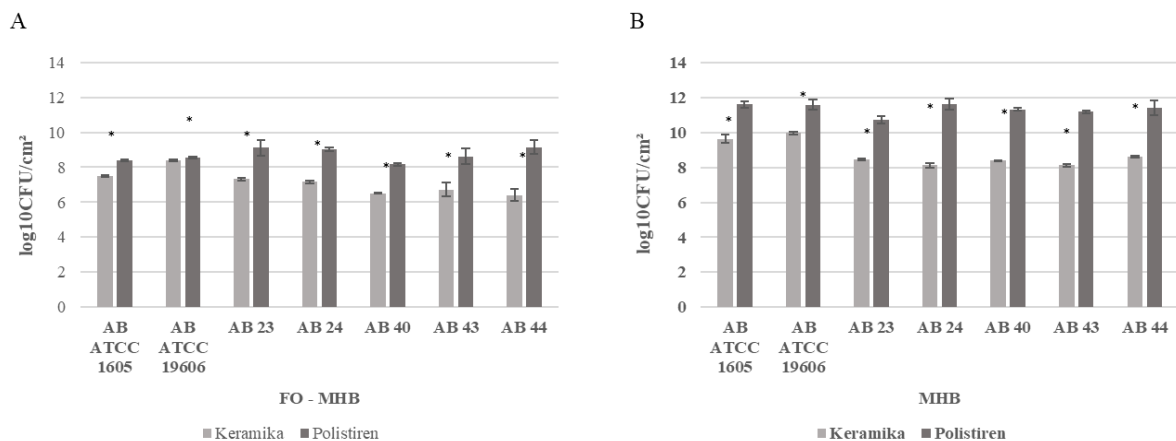


**Slika 18.** Sposobnost stvaranja biofilma model organizma *K. pneumoniae* na keramici i polistirenu izražena kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za manje (A) i veće organsko opterećenje (B). FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon, \* označava statistički značajnu razliku unutar bakterijskog soja između svih vrsta materijala i organskog opterećenja (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ) a, b, c, a<sup>“</sup>, b<sup>“</sup>, c<sup>“</sup>, A, B, C označava statistički značajnu razliku unutar bakterijskog soja između pojedinih vrsta materijala i organskog opterećenja

Na **Slici 19.** A i B prikazana je sposobnost stvaranja biofilma model organizama *A. baumannii* za keramiku i polistiren ovisno o dvije vrste organskog opterećenja. Svi odabrani sojevi *A. baumannii* stvaraju veću količinu biofilma uz veće organsko opterećenje naspram manjem organskom opterećenju i to u rasponu od 10,74 (0,21)  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za AB 23 do 11,62  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  (0,3) za AB 24 na polistirenu te u rasponu od 8,12 (0,14)  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za AB 24 do 9,98 (0,08) za AB 19606 za keramiku.

Količina stvorenog biofilma za manje organsko opterećenje iznosila je od 6,41 (0,34)  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za AB 44 do 8,38 (0,05)  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za AB 19606 za keramiku te 8,17 (0,09)  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za AB 40 do 9,16 (0,18)  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za AB 44 na polistirenu.

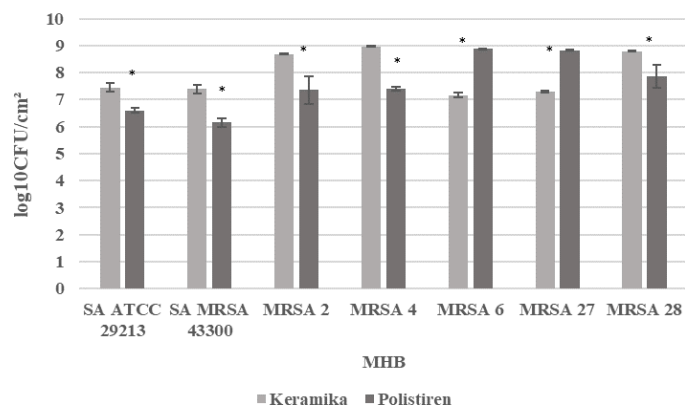
Utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u količini stvorenog biofilma između obje vrste materijala i organskog opterećenja za svaki pojedinačni ispitivani soj *A. baumannii*.



**Slika 19.** - Sposobnost stvaranja biofilma na keramici i polistirenu model organizma *A. baumannii* izraženog kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon, \* označava statistički značajnu razliku unutar bakterijskog soja između vrsta materijala i organskog opterećenja (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Sposobnost stvaranja biofilma za *S. aureus* je ispitivana isključivo uz veće organsko opterećenje iz razloga što je sposobnost adhezije i stvaranja biofilma iz manjeg organskog opterećenja tijekom inicijalnih pokusa bila vrlo mala s manje od 2 log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> stvorenog biofilma.

Na prikazana je sposobnost stvaranja biofilma odabranih sojeva *S. aureus* na keramici i polistirenu.



**Slika 20.** Sposobnost stvaranja biofilma model organizma *S. aureus* izraženog kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup>. MHB označava Muller Hinton bujon, \* označava statistički značajnu razliku unutar bakterijskog soja između vrsta materijala (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Količina stvorenog biofilma odabranih sojeva *S. aureus* varirala je od 7,16 (0,09)  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> za MRSA 6 do 8,97 (0,02) za MRSA 4 na keramici, a od 6,15 (0,16)  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> za SA MRSA 43300 do 8,87 (0,02)  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> za MRSA 6 na polistirenu.

U ukupno 4 od 7 sojeva (SA ATCC 29213, SA MRSA 43300, MRSA 2 i MRSA 4) količina stvorenog biofilma bila je viša na keramici. Postoji statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između stvorene količine biofilma između keramike i polistirena unutar svih pojedinačnih sojeva *S. aureus*.

Međusobne razlike između sposobnosti stvaranja biofilma za odabrane model organizme (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*) prikazane su u **Tablici 8**.

**Tablica 8.** Usporedba sposobnosti stvaranja biofilma odabranih model organizama izražena kao  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup>. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika između pojedinačnih model organizama utvrđena testom ANOVA i t-testom za *S. aureus* keramika i polistiren, dok su razlike između vrste materijala i organskog opterećenja unutar jednog soja dodatno utvrđene Student-Newman-Keuls post hoc testom (\*).

	Aritmetička sredina (SD) količine stvorenog biofilma ( $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> )			<i>P</i> *
	<i>Klebsiella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	
	<i>pneumoniae</i> (KP)	<i>baumannii</i> (AB)	<i>aureus</i> (SA)	
Keramika FO-MHB	6,24 (0,20)	7,19 (0,71)	-	<0,001
Keramika MHB	8,72 (0,19)	8,89 (0,75)	8,00 (0,70)	<0,001*
Polistiren FO-MHB	6,84 (0,93)	8,67 (0,41)	-	<0,001
Polistiren MHB	8,73 (0,57)	11,35 (0,38)	7,58 (0,99)	<0,001*

FO – fiziološka otopina, MHB – Muller-Hinton bujon, SD – standardna devijacija

Međusobnom usporedbom svih model organizama (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*) ovisno o vrsti materijala i organskog opterećenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u sposobnosti stvaranja biofilma između *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na keramici i polistirenu uz manje organsko opterećenje; značajna razlika u sposobnosti stvaranja biofilma *A. baumannii* naspram *K. pneumoniae* i *S. aureus* na keramici uz veće organsko opterećenje te statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u količini stvorenog biofilma između svih vrsta model organizama na polistirenu uz veće organsko opterećenje.

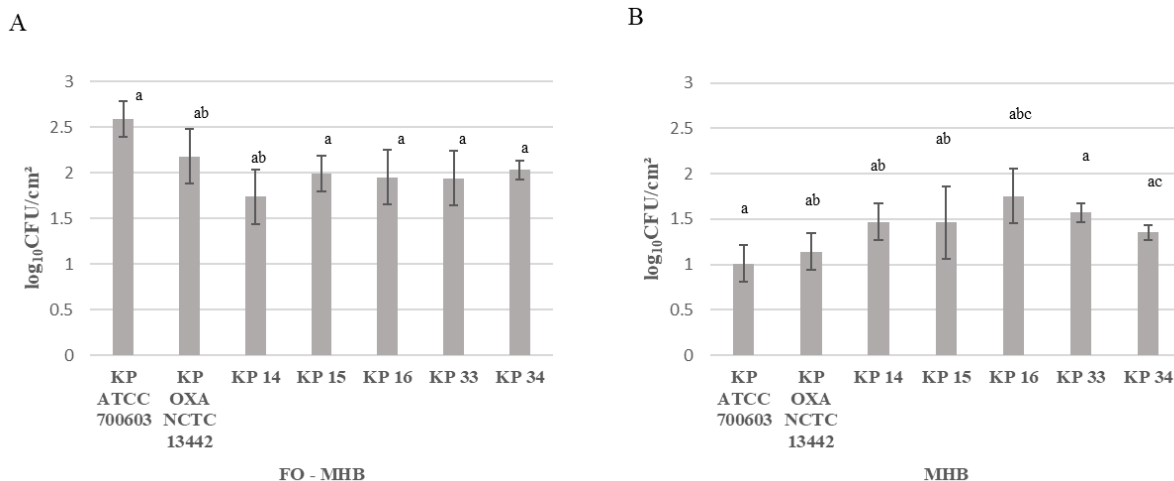
#### 4.5. Učinkovitost plinovitog ozona na biofilm model organizma *K. pneumoniae*

Učinkovitost plinovitog ozona na biofilm model organizma *K. pneumoniae* ispitivana je određivanjem ukupnog broja kultivabilnih bakterija (CFU/cm<sup>2</sup>) te dodatnim metodama za određivanje ukupne biomase (kristal violet bojenjem) i broja vijabilnih bakterija (ATP bioluminiscencija).

##### 4.5.1. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu *K. pneumoniae*

Na Slici 21. A i B prikazan je učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukcija (log redukcija) za obje količine organskog opterećenja. Log redukcija za sojeve kod manjeg organskog opterećenja iznosila je od 1,74 (0,3) za KP 14 do 2,59 (0,2) za KP ATCC 700603.

Uočena je manja log redukcija ukupnog broja kultivabilnih bakterija u biofilmu *K. pneumoniae* na keramici kod većeg organskog opterećenja u rasponu od 1,01 (0,2) za KP ATCC 700603 do 1,75 (0,3) za KP 16.



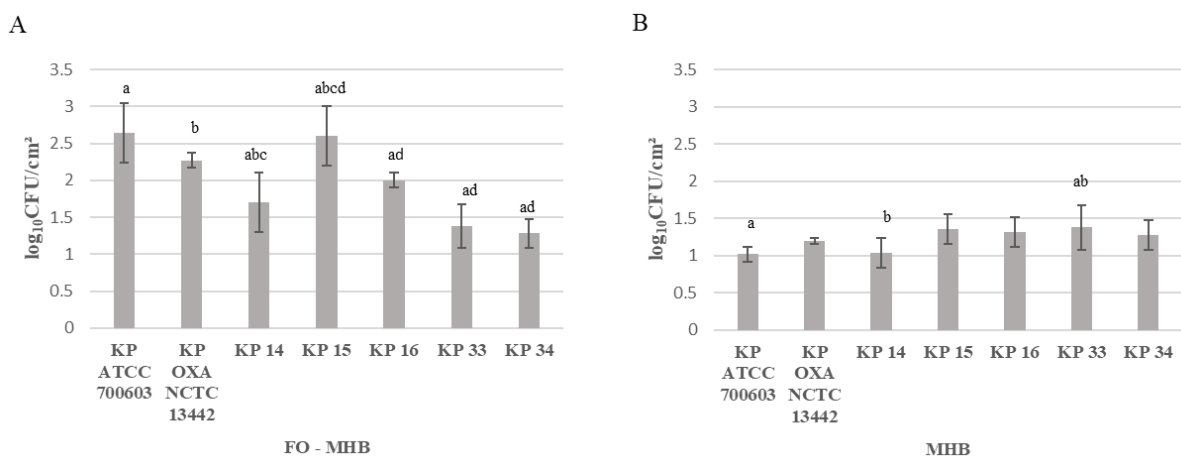
**Slika 21.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *K. pneumoniae* na keramici izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukcije za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; a; b; c - označavaju statistički značajnu razliku između sojeva (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test, p<0,05).

Ovisno o vrsti organskog opterećenja, za biofilm *K. pneumoniae* na keramici stvoren iz manjeg organskog opterećenja, utvrđena je statistički značajna razlika (p<0.05) u redukciji između KP ATCC i ostalih sojeva te između KP OXA NCTC 13442 i KP 14.

Kod većeg organskog opterećenja, utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u redukciji između KP ATCC i ostalih sojeva, između KP OXA NCTC 13442 i KP 14, KP 15, KP 16 te između KP 16 i KP 34.

Utjecaj plinovitog ozona na biofilm *K. pneumoniae* stvoren na polistirenu ovisno o dvije vrste organskog opterećenja prikazan je na **Slici 22 A i B**.

Kao i u prethodnom slučaju na keramici, veća log redukcija je uočena kod biofilma *K. pneumoniae* stvorenog iz manjeg organskog opterećenja (**Slika 22. A**) gdje je uočena redukcija varirala od 1,28 (0,2) log za KP 34 do 2,64 (0,4) log za KP ATCC 700603.



**Slika 22.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *K. pneumoniae* na polistirenu izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukcija za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon, a, b, c, d - označavaju statistički značajnu razliku između sojeva (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u log redukciji biofilma *K. pneumoniae* kod manjeg organskog opterećenja, a nakon uporabe plinovitog ozona uočena je između KP ATCC 700603 i KP 14, KP 15, KP 16, KP 33 i KP 34; između KP OXA NCTC 13442 te KP 14 i KP 15; KP 14 i KP 15 te između KP 15 i KP 16, KP 33 i KP 34.

Kod većeg organskog opterećenja, statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u log redukciji biofilma uočena je između KP ATCC 700603 i KP 33 te u slučaju KP 14 i KP 33.



**Tablica 9.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *K. pneumoniae* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu  $\log_{10}\text{CFU}^2$  redukcija uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i količini organskog opterećenja po bakterijskom soju utvrđena testom ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test (\*).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aritmetička sredina (SD) $\log_{10}\text{CFU}^2$ redukcija				<i>P</i> *
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
KP ATCC 700603	2,59(0,2)	1,01 (0,2)	2,64 (0,4)	1,02 (0,1)	<0,001*
KP NCTC 13442 OXA	2,18 (0,3)	1,14 (0,2)	2,27 (0,1)	1,20 (0,04)	<0,001*
KP 14	1,74 (0,3)	1,47 (0,2)	1,70 (0,4)	1,03 (0,2)	0,002*
KP 15	1,99 (0,2)	1,46 (0,4)	2,60 (0,4)	1,35 (0,2)	<0,001*
KP 16	1,95 (0,3)	1,75 (0,3)	2,00 (0,1)	1,31 (0,3)	<0,001*
KP 33	1,94 (0,3)	1,57 (0,1)	1,96 (0,2)	1,38 (0,3)	<0,001*
KP 34	2,03 (0,1)	1,35 (0,08)	2,11 (0,2)	1,28 (0,2)	<0,001*

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD- standardna devijacija

Statistički značajna razlika između odabranih materijala i različite količine organskog opterećenja je prikazana na **Tablici 9**.

Za sojeve KP ATCC 700603, KP NCTC 13442, KP 33 i KP 34 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u log redukciji između biofilma stvorenog na keramici uz manje i veće organsko opterećenje, keramike uz manje organsko opterećenje i polistirena uz veće organsko opterećenje; razlika između keramike uz veće organsko opterećenje i polistirena (manje opterećenje) te polistirena (manje opterećenje) naspram polistirena uz veće organsko opterećenje.

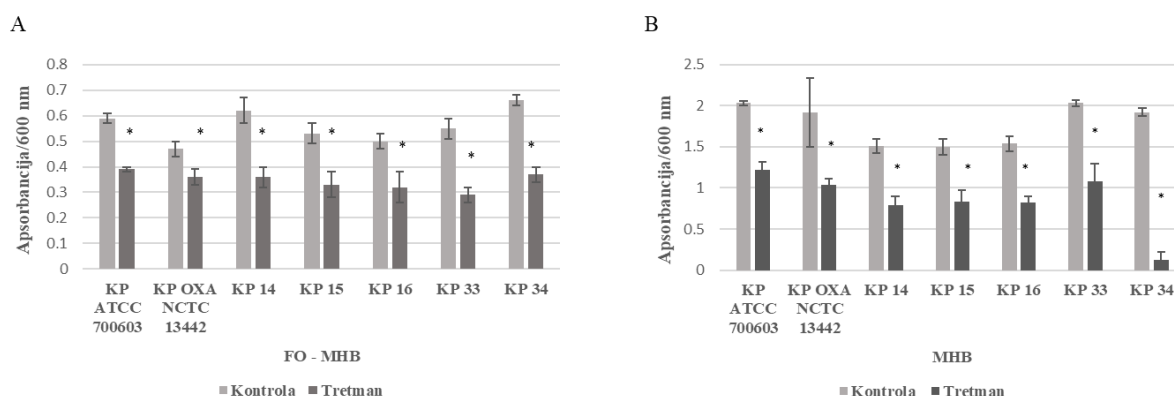
Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u log redukciji za sojeve KP 14 i KP 16 uvrđena je između polistirena (veće organsko opterećenje) naspram svih ostalih kategorija. Za soj KP 15 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između keramike (manje opterećenje) naspram svih ostalih kategorija, razlika između keramika (veće opterećenje) naspram polistirena (veće opterećenje) te razlika između polistirena (manje opterećenje) i polistirena uz veće organsko opterećenje.

#### 4.5.2. Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu *K. pneumoniae*

Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici ovisno o količini organskog opterećenja prikazan je na **Slici 23**. A i B. Kod manjeg organskog opterećenja (**Slika 23**. A) uočena je redukcija ukupne biomase nakon tretmana plinovitim ozonom za sve sojeve *K. pneumoniae*.

Razlika između kontrole i tretmana je za sve sojeve statistički značajna ( $p < 0.05$ ). Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ ) uočena je i kod većeg organskog opterećenja (**Slika 23**. B).

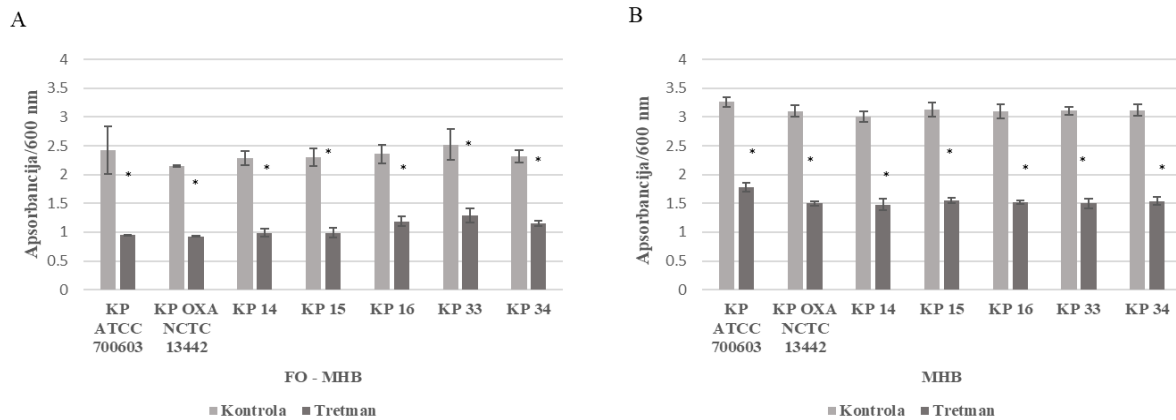
Do najveće redukcije ukupne biomase na keramici dolazi kod soja KP 33, dok je najmanja redukcija ukupne biomase utvrđena za soj KP OXA NCTC 13442 kod manjeg organskog opterećenja. Za veće organsko opterećenje na keramici, najveća redukcija ukupne biomase izmjerena je za KP 34, a najmanja za soj KP ATCC 700603. Veća redukcija je uočena kod sojeva *K. pneumoniae* iz većeg organskog opterećenja u usporedbi s manjim organskim opterećenjem.



**Slika 23.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbancije na 600 nm uz standardnu devijaciju. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; \* - označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , ANOVA, t-test).

Rezultati kristal violet bojenja biofilma odabranih sojeva *K. pneumoniae* na polistirenu uz manje i veće organsko opterećenje prikazani su na **Slici 24**. A i B. Nakon tretmana ozonom dolazi do statistički značajne ( $p < 0.05$ ) redukcije ukupne biomase svih odabranih sojeva *K. pneumoniae* kod manjeg i većeg organskog opterećenja. Najveća redukcija ukupne biomase kod manjeg organskog opterećenja utvrđena je za soj KP ATCC 700603 te za KP 33 kod većeg organskog opterećenja. Najmanja redukcija ukupne biomase uočena je kod sojeva KP 33 za

manje organsko opterećenje te za soj KP ATCC 700603 kod većeg organskog opterećenja. Općenito, veća redukcija uočena je kod sojeva *K. pneumoniae* uz veće organsko opterećenje.



**Slika 24.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *K. pneumoniae* na polistirenu kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbancije na 600 nm uz standardnu devijaciju. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , ANOVA, t-test).

Obzirom na postotak inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom za biofilm odabranih sojeva *K. pneumoniae* stvoren na keramici uz manje organsko opterećenje, a korištenjem metode kristal violet bojenja uočena je statistički značajna razlika između soja KP OXA NCTC 13442 naspram sojeva KP ATCC 700603, KP 14, KP 15, KP 16, KP 33, KP 34 te razlika između soja KP 16 i KP33 (**Tablica 10.**).

Kod biofilma odabranih sojeva *K. pneumoniae* stvorenog na polistirenu iz manjeg organskog opterećenja statistički značajna razlika u postotku inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom uočena je između soja KP ATCC 700603 i KP 15, KP 16, KP 33, KP 34, zatim između sojeva KP OXA NCTC 13442 i KP 15, KP 33, KP 34.

Kod biofilma stvorenog na polistirenu uz veće organsko opterećenje statistički značajna razlika u postotku inhibicije uočena je između sojeva KP ATCC 700603 i KP NCTC 13442, KP 14, KP 15, KP 16, KP 33, KP 34.

**Tablica 10.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *K. pneumoniae* korištenjem kristal violet bojenja. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju (SD) izračunatog postotka inhibicije. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test (\*)).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije							<i>P</i> *
	KP	KP OXA	KP 14	KP 15	KP 16	KP 33	KP 34	
	ATCC 700603	NCTC 13442						
Keramika	34,61	21,78	40,29	38,61	35,79	48,22	44,16	<b>&lt;0,001*</b>
FO-MHB	(4,8)	(9,7)	(10,3)	(9,2)	(10,9)	(8,1)	(3,3)	
Keramika	40,46	43,63	46,75	45,83	46,92	47,04	45,26	0,73
MHB	(5,6)	(14,1)	(8,4)	(8,2)	(2,5)	(9,7)	(2,8)	
Polistiren FO-	68,89	77,94 (2,5)	56,34	56,96	49,41	48,41	50,41	<b>&lt;0,001*</b>
MHB	(24,1)		(2,8)	(1,5)	(2,2)	(6,6)	(1,7)	
Polistiren	45,24	51,71 (2)	50,99	50,41	51,05	51,8	50,75	<b>&lt;0,001*</b>
MHB	(3,5)		(2,5)	(1,1)	(1,1)	(2,1)	(1,2)	

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

Na **Tablici 11.** prikazan je učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *K. pneumoniae* izražen kao postotak inhibicije utvrđen uporabom kristal violet bojenja, a ovisno o odabranom materijalu (keramika i polistiren) i količini organskog opterećenja.

Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana ozonom kod soja KP ATCC 700603 utvrđena je između biofilma stvorenog na polistirenu uz manje organsko opterećenje i polistirena uz veće opterećenje, keramike (veće opterećenje) te keramike (manje opterećenje).

Kod sojeva KP OXA NCTC 13442 i KP 16 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana ozonom između biofilma stvorenog na polistirenu (manje opterećenje) i keramike (veće opterećenje) te polistirena (veće opterećenje).

Za KP 14 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između biofilma stvorenog na keramici uz manje organsko opterećenje naspram biofilma stvorenog na polistirenu (manje opterećenje) te polistirena (veće opterećenje), dok je za soj KP 34 statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena između keramike (manje opterećenje) naspram polistiren (manje opterećenje) i polistiren (veće opterećenje).

Sojevi KP 15 i 33 pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u postocima inhibicije biofilma stvorenog na keramici (manje opterećenje) naspram biofilma na polistirenu (manje opterećenje), polistirenu (veće opterećenje) te između biofilma na polistirenu (manje opterećenje) i polistirenu (veće opterećenje).

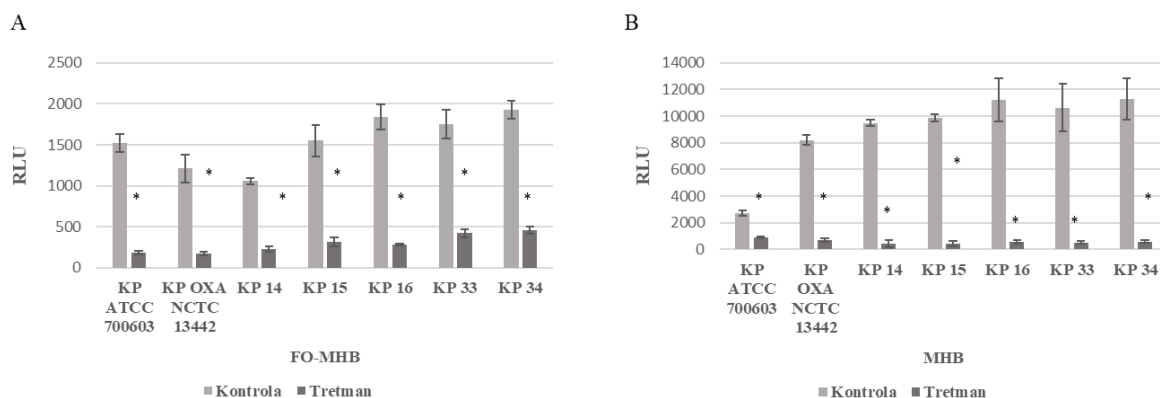
**Tablica 11.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *K. pneumoniae* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja korištenjem kristal violet bojenja. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu postotka inhibicije redukcije uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i količini organskog opterećenja po bakterijskom soju utvrđena testom ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test(\*)).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije				P*
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
KP ATCC	34,61(4,8)	40,46 (5,6)	68,89 (24,1)	45,24 (3,5)	<0,001*
KP OXA	21,78 (9,7)	43,63 (14,1)	77,94 (2,5)	51,71 (2)	<0,001*
KP 14	40,3 (10,3)	46,75 (8,4)	56,34 (2,8)	50,99 (2,5)	<0,001*
KP 15	38,61 (9,2)	45,83 (8,2)	56,96 (1,5)	50,41 (1,1)	<0,001*
KP 16	35,8 (10,9)	46,92 (2,5)	49,41 (2,2)	51,05 (1,1)	<0,001*
KP 33	48,22 (8,1)	47,04 (9,7)	48,41 (6,6)	51,8 (2,1)	<0,001*
KP 34	44,16 (3,3)	45,26 (2,8)	50,41 (1,7)	50,75 (1,2)	<0,001*

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

#### 4.5.3. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu *K. pneumoniae*

Učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici ovisno o manjem i većem organskom opterećenju, a korištenjem ATP bioluminiscencije prikazan je na **Slici 25.** A i B.



**Slika 25.** Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja određen uporabom APT bioluminiscencije. Rezultat je izražen kao aritmetička sredina RLU uz standardnu devijaciju. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , ANOVA, t-test).

Nakon tretmana plinovitim ozonom dolazi do statistički značajne redukcije ukupnog broja vijabilnih bakterija ( $p < 0.05$ ) mjereno metodom ATP bioluminiscencije za sve odabrane sojeve *K. pneumoniae* na obje vrste organskog opterećenja.

Kod soja KP 34 utvrđena je najveća redukcija ukupnog broja vijabilnih bakterija za manje organsko opterećenje, dok je najmanja redukcija vijabilnih bakterija i biomase utvrđena kod soja KP 14 za manje organsko opterećenje, a kod soja KP ATCC 700603 za veće organskog opterećenja.

Obzirom na postotak inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom za biofilm odabranih sojeva *K. pneumoniae* stvoren na keramici uz manje organsko opterećenje, a korištenjem metode ATP bioluminiscencije statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u postotku inhibicije uočena je između sojeva KP ATCC 700603 i sojeva KP OXA NCTC 13442, KP 14, KP 15, KP 16, KP 33, KP 34, zatim između sojeva KP OXA NCTC 13442 i KP 14, KP 15, KP 33, KP 34, između sojeva KP 14 naspram KP 16 i KP 33; između soja KP 15 naspram KP 16 i KP 33 te naposljetku između soja KP 16 naspram KP 33 i KP 34 (**Tablica 12.**).

Biofilm stvoren na keramici uz veće organsko opterećenje pokazuje statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom između sojeva KP ATCC 700603 i svih ostalih sojeva, te između soja KP OXA NCTC i svih ostalih sojeva (**Tablica 12.**).

**Tablica 12.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *K. pneumoniae* korištenjem ATP bioluminiscencije. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju izračunatog postotka inhibicije. Statistički značajna razlika između sojeva po materijalu/organskom opterećenju ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test(\*)).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije							<i>P</i> *
	KP ATCC 700603	KP OXA NCTC 13442	KP 14	KP 15	KP 16	KP 33	KP 34	
Keramika FO-MHB	88,09 (0,9)	85,68 (2,1)	78,33 (3,1)	79,79 (1,9)	84,69 (1,1)	75,96 (1,3)	78,56 (1,04)	<0,001*
Keramika MHB	65,79 (2,5)	91,41 (1,6)	95,98 (1,8)	95,66 (1,1)	94,81 (0,4)	94,97 (0,3)	94,81 (0,4)	

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

**Tablica 13.** prikazuje učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih sojeva *K. pneumoniae* izražen kao postotak inhibicije korištenjem ATP bioluminiscencije u ovisnosti o vrsti materijala i količini organskog opterećenja.

Utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije biofilma svih odabranih sojeva *K. pneumoniae* između biofilma stvorenog na keramici uz manje organsko opterećenje nasram biofilma stvorenog na keramici uz veće organsko opterećenje.

**Tablica 13.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *K. pneumoniae* ovisno o materijalu (keramika) i količini organskog opterećenja korištenjem ATP bioluminiscencije. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu postotka inhibicije redukcije uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i količini organskog opterećenja po bakterijskom soju utvrđena testom ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test (\*)).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije				P*
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
KP ATCC	88,09 (0,9)	65,79 (2,5)	-	-	<0,001*
KP OXA	85,68 (2,1)	91,41 (1,6)	-	-	<0,001*
KP 14	78,33 (3,1)	95,98 (1,8)	-	-	<0,001*
KP 15	79,79 (1,9)	95,66 (1,1)	-	-	<0,001*
KP 16	84,69 (1,1)	94,81 (0,4)	-	-	<0,001*
KP 33	75,95 (1,3)	94,97 (0,3)	-	-	<0,001*
KP 34	78,56 (1,0)	94,81 (0,4)	-	-	<0,001*

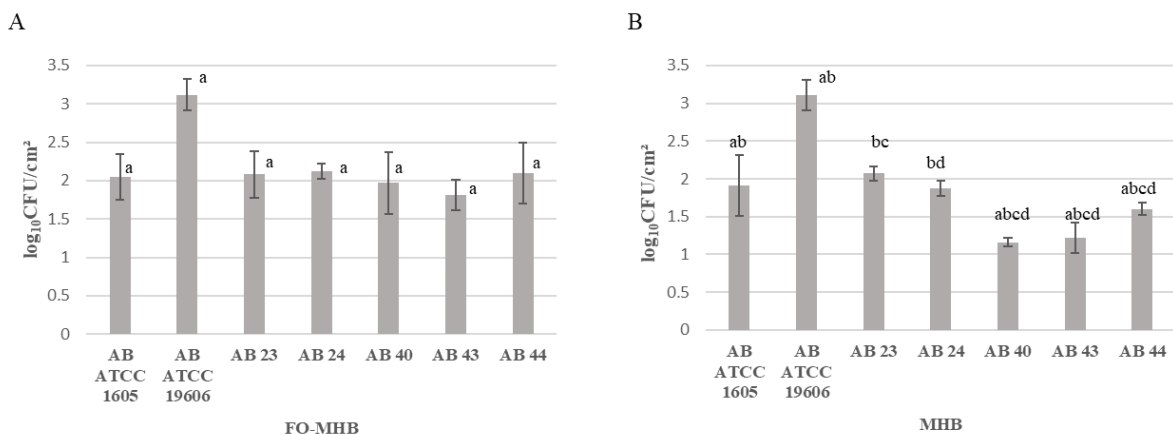
FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

#### 4.5.4. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu *A. baumannii*

Na **Slici 26.** prikazan je učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici ovisno o manjoj i većoj količini organskog opterećenja (**Slika 26. A i B**) izražen kao  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> redukcija. Najveća log redukcija kod manjeg organskog opterećenja (**Slika 26. A**) iznosila je 3,12 (0,2) za soj AB ATCC 19606, a najmanja 1,81 (0,2) za soj AB 43.

Kod većeg organskog opterećenja najveća  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> redukcija iznosila je 3,11 (0,2) za soj AB ATCC 19606, a najmanja 1,16 (0,06) za soj AB 40 (**Slika 26. B**).

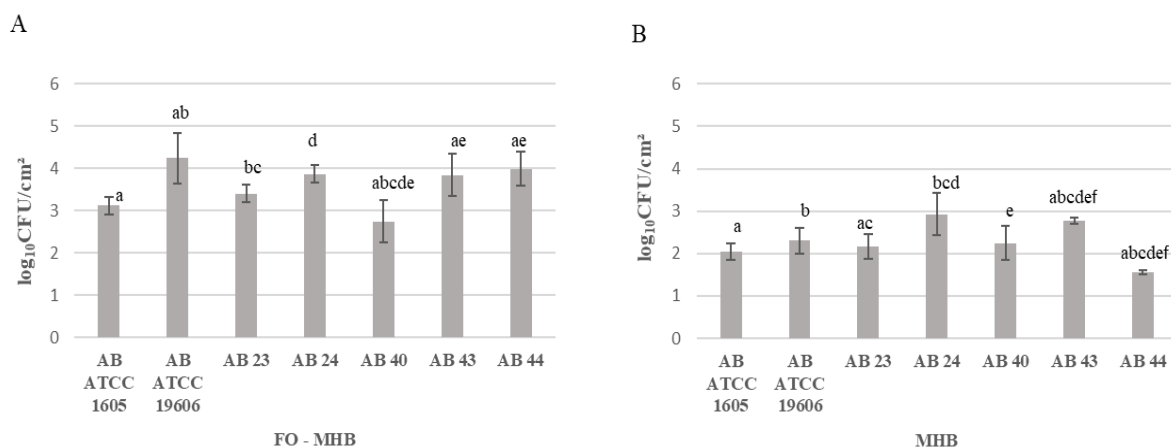




**Slika 26.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *A. baumannii* na keramici izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; a, b, c, d - označavaju statistički značajnu razliku između sojeva (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Statistički značajna log redukcija ( $p < 0,05$ ) kod manjeg organskog opterećenja na keramici uočena je između soja AB ATCC 19606 naspram AB ATCC 1605, AB 23, AB 24, AB 40, AB 43 i AB 44. Kod većeg organskog opterećenja statistički značajna log redukcija ( $p < 0,05$ ) uočena je između sojeva AB ATCC 1605 naspram AB ATCC 19606, AB 40, AB 43 i AB 44, zatim između AB ATCC 19606 naspram AB ATCC 1605, AB 23, AB 24, AB 40, AB 43 i AB 44, između AB 23 naspram AB 40, AB 43, AB 44 te između AB 24 i AB 40, AB 43 i AB 44.

Na **Slici 27.** A i B prikazan je učinak plinovitog ozona izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukcija na biofilm odabranih sojeva model organizma *A. baumannii* na polistirenu uz manje i veće organsko opterećenje. Najmanja log redukcija kod manjeg organskog opterećenja je uočena za soj AB 40 (2,74 (0,5)), a najveća za soj AB ATCC 19606 (4,25 (0,6)). Kod većeg organskog opterećenja, najveća log redukcija uočena je kod soja AB 24 (2,93 (0,5)), a najmanja za soj AB 44 (1,56 (0,05)).



**Slika 27.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *A. baumannii* na polistirenu izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; a, b, c, d, e, f - označavaju statistički značajnu razliku između sojeva (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Kod manjeg organskog opterećenja, statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u redukciji uočene su između sljedećih sojeva *A. baumannii*: AB ATCC 1605 nasuprot AB ATCC 19606, AB 40, AB 43, AB 44; zatim između AB ATCC 19606 sa AB 23 i AB 40; AB 23 i AB 40; AB 24 i AB 40 te najzad AB 40 i AB 43 i AB 44.

Za veće organsko opterećenje, statistički značajne razlike u log redukciji uočene su između sljedećih sojeva AB ATCC 1605 i AB 24, AB 43 AB 44; između AB ATCC 19606 i AB 24, AB 43, AB 44; AB 23 i AB 24, AB 43, AB 44; AB 24 sa AB 43 i AB 44; između AB 40 i AB 43 i AB 44 te najzad između AB 43 i AB 44.

Međusobne razlike u log redukciji nakon tretmana plinovitim ozonom između odabranih materijala i različite količine organskog opterećenja za vrstu *A. baumannii* prikazane su u **Tablici 14**.

Za sojeve AB ATCC 1605 i AB 23 statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u log redukciji uočena je između polistirena (manje organsko opterećenje) naspram svih ostalih kategorija.

Kod sojeva AB ATCC 19606 i AB 24 statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u log redukciji uočena je između keramike (manje opterećenje) nasuprot polistiren (manje opterećenje) i polistiren (veće opterećenje); zatim između keramike (veće opterećenje) i polistiren (manje opterećenje) te polistiren (veće opterećenje).

Za soj AB 40 statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u log redukciji utvrđene su između keramika (manje opterećenje) nasuprot keramika (veće opterećenje) te polistiren (manje opterećenje), zatim između keramika (veće opterećenje) i polistiren (manje opterećenje) te

polistiren (veće opterećenje) i između polistiren (manje opterećenje) i polistiren (veće opterećenje).

Nadalje, statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između svih materijala i vrsta organskog opterećenja utvrđene su za soj AB 43, dok su za soj AB 44 utvrđene značajne razlike između keramika (manje opterećenje) nasuprot keramika (veće opterećenje), polistiren (manje opterećenje) i polistiren (veće opterećenje); zatim keramika (veće opterećenje) i polistiren (manje opterećenje) te najzad između polistiren (manje opterećenje) i polistiren (veće opterećenje).

**Tablica 14.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *A. baumannii* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> redukcije uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i količini organskog opterećenja po bakterijskom soju utvrđena testom ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test (\*)).

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aritmetička sredina (SD) $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> redukcija				<i>P</i> *
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
AB ATCC 1605	2,05 (0,3)	1,91 (0,4)	3,12 (0,2)	2,04 (0,2)	<0,001*
AB ATCC 19606	3,12 (0,2)	3,11 (0,2)	14,24 (0,6)	2,30 (0,3)	<0,001*
AB 23	2,07 (0,3)	2,06 (0,1)	3,41 (0,2)	1,16 (0,3)	0,002*
AB 24	1,12 (0,1)	1,87 (0,1)	3,87 (0,2)	2,93 (0,5)	<0,001*
AB 40	1,97 (0,4)	1,16 (0,06)	2,74 (0,06)	2,24 (0,4)	<0,001*
AB 43	1,81 (0,2)	1,24 (0,2)	3,84 (0,5)	2,77 (0,08)	<0,001*
AB 44	2,11 (0,4)	1,61 (0,08)	3,99 (0,4)	1,56 (0,5)	<0,001††

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

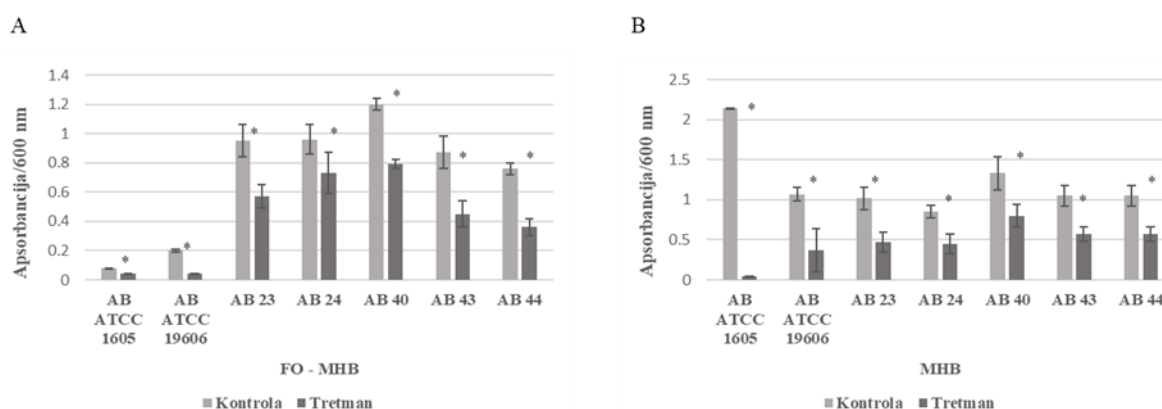
#### 4.5.5. Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu *A. baumannii*

**Slika 28.** A i B prikazuje učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici, ovisno o količini organskog opterećenja.

Nakon tretmana plinovitim ozonom odabranih sojeva *A. baumannii* dolazi do statistički značajne ( $p < 0,05$ ) redukcije ukupne biomase kod svih sojeva, na obje količine organskog opterećenja.

Kod manjeg organskog opterećenja (**Slika 28. A**) do najveće redukcije ukupne biomase dolazi kod soja AB ATCC 19606, dok je najmanja redukcija ukupne biomase uočena kod soja AB 24.

Najveća redukcija ukupne biomase kod većeg organskog opterećenja (**Slika 28. B**) izmjerena je za soj AB ATCC 1605, najmanja za soj AB 40.

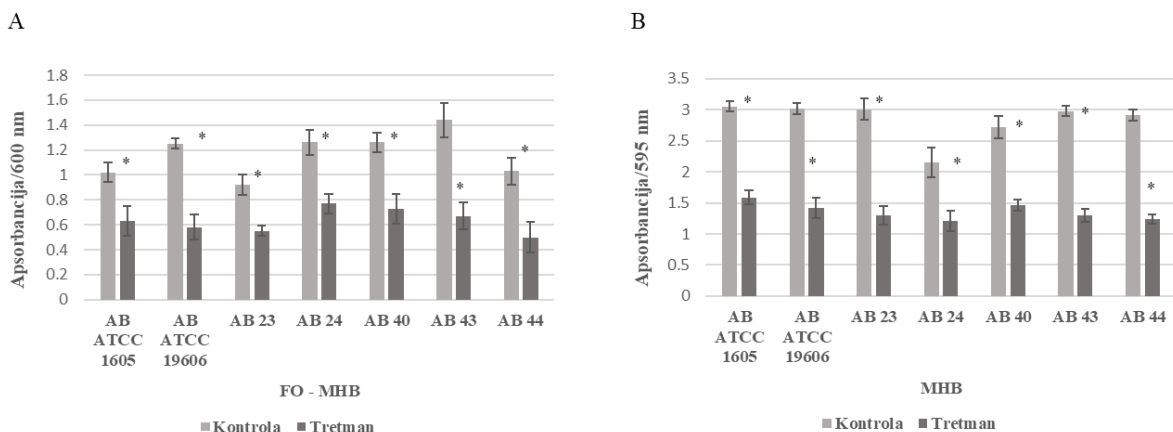


**Slika 28.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbancije na 600 nm uz standardnu devijaciju. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; \* - označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , ANOVA, t-test).

Na **Slici 29. A i B** prikazan je učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu *A. baumannii* na polistirenu uporabom kristal violet bojenja, a ovisno o dvije vrste organskog opterećenja.

Za obje vrste organskog opterećenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u redukciji ukupne biomase svih odabranih sojeva *A. baumannii* na polistirenu nakon tretmana plinovitim ozonom.

Najveća redukcija ukupne biomase kod manjeg organskog opterećenja izmjerena je kod soja AB ATCC 19606, a najmanje kod soja AB ATCC 1605. Za veće organsko opterećenje, najveća redukcija ukupne biomase izmjerena je za AB 44, najmanja za AB 24.



**Slika 29.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *A. baumannii* na polistirenu kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbancije na 600 nm uz standardnu devijaciju. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; \* - označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , ANOVA, t-test).

Obzirom na postotak inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom za biofilm odabranih sojeva *A. baumannii* stvoren na keramici uz manje organsko opterećenje, a korištenjem kristal violet bojenja uočena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između svih sojeva (**Tablica 15.**), dok je kod većeg organskog opterećenja na keramici statistički značajna razlika uočena između sojeva AB ATCC 1605 i AB 40.

Kod biofilma odabranih sojeva *A. baumannii* stvorenog na polistirenu uz manje organsko opterećenje statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom uočena je između soja AB ATCC 1605 i AB ATCC 19606, AB 43, AB 44, zatim sojeva AB ATCC 19606 i AB 23, AB 24, AB 40.

Nadalje, razlika je uočena između soja AB 23, AB 43 i AB 44, sojeva AB 24 naspram AB 43 i AB 44. Kod biofilma stvorenog na polistirenu uz veće organsko opterećenje statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u postotku inhibicije uočena je između sojeva AB 24 naspram svih ostalih sojeva, zatim između soja AB 40 i svih ostalih sojeva te između soja AB ATCC 1605 sa AB 44.

**Tablica 15.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *A. baumannii* korištenjem kristal violet bojenja. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju (SD) izračunatog postotka inhibicije. Statistički značajna razlika između sojeva po materijalu/organskom opterećenju ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test(\*)).

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije							<i>P</i> *
	AB ATCC 1605	AB ATCC 19606	AB 23	AB 24	Ab 40	AB 43	AB 44	
Keramika	47,65	79,76	39,88	24,58	34,41	49,03	51,59	<0,001*
FO-MHB	(3,3)	(1,0)	(8,2)	(11,4)	(2,4)	(5,8)	(5,3)	
Keramika	42,31	64,67	54,17	47,61	40,44	45,16	39,99	0,04*
MHB	(6,3)	(26,9)	(8,7)	(10,8)	(7,9)	(11,0)	(12,1)	
Polistiren FO-	38,46	54,14	39,94	38,79	42,55	53,39	51,86	<0,001*
MHB	(7,5)	(6,9)	(4,3)	(3,6)	(7,8)	(3,9)	(8,9)	
Polistiren	51,77	52,85	55,74	43,83	46,34	56,62	57,37	<0,001*
MHB	(3,5)	(4,8)	(2,9)	(3,8)	(2,6)	(2,7)	(2,4)	

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

**Tablica 16.** prikazuje učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih sojeva *A. baumannii* stvoren na keramici i polistirenu iz različitog organskog opterećenja, a prikazan kao postotak inhibicije nakon korištenja kristal violet bojenja.

Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom za soj AB ATCC 1605 uočena je između biofilma stvorenog na polistirenu (manje organsko opterećenje) i keramike (manje opterećenje) i polistirena uz veće organsko opterećenje.

Kod sojeva AB ATCC 19606 i AB 40 statistički je značajna ( $p < 0,05$ ) razlika inhibicije između biofilma stvorenog na keramici (manje opterećenje) naspram polistirena (manje opterećenje) i polistirena (veće opterećenje). Kod soja AB 23 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između keramike (manje opterećenje) i keramike i polistirena uz veće organsko opterećenje.

Sojevi AB 24 i AB 43 pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u postocima inhibicije nakon tretmana ozonom između biofilma stvorenog na keramici (manje organsko opterećenje) i svih ostalih materijala/organskog opterećenja.

Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u inhibiciji za soj AB 44 utvrđena je između keramike (manje opterećenje) naspram svih ostalih, između keramika (veće opterećenje) i

polistiren (manje opterećenje) te između biofilma stvorenog na polistirenu (manje opterećenje) i polistiren (veće opterećenje).

**Tablica 16.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *A. baumannii* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja korištenjem kristal violet bojenja. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju izračunatog postotka inhibicije. Statistički značajna razlika između sojeva po materijalu/organskom opterećenju ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test(\*)).

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije				<i>P</i> *
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
AB 1605	47,65 (3,3)	42,31 (6,3)	38,46 (7,5)	51,78 (3,5)	<b>0,002*</b>
AB 19606	79,76 (1,1)	64,67 (26,9)	54,14 (6,9)	52,85 (4,8)	<b>0,007*</b>
AB 23	39,88 (8,2)	54,17 (8,7)	39,94 (4,3)	55,74 (2,9)	<b>&lt;0,001*</b>
AB 24	24,58 (11,4)	47,61 (10,8)	38,79 (3,6)	43,83 (3,8)	<b>&lt;0,001*</b>
AB 40	34,41 (2,4)	40,44 (7,9)	42,55 (7,8)	46,34 (2,6)	<b>0,009*</b>
AB 43	49,03 (5,8)	45,16 (11,0)	53,39 (3,9)	51,86 (8,9)	<b>&lt;0,001*</b>
AB 44	51,59 (5,3)	39,99 (12,1)	56,62 (2,7)	57,37 (2,4)	<b>&lt;0,001*</b>

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

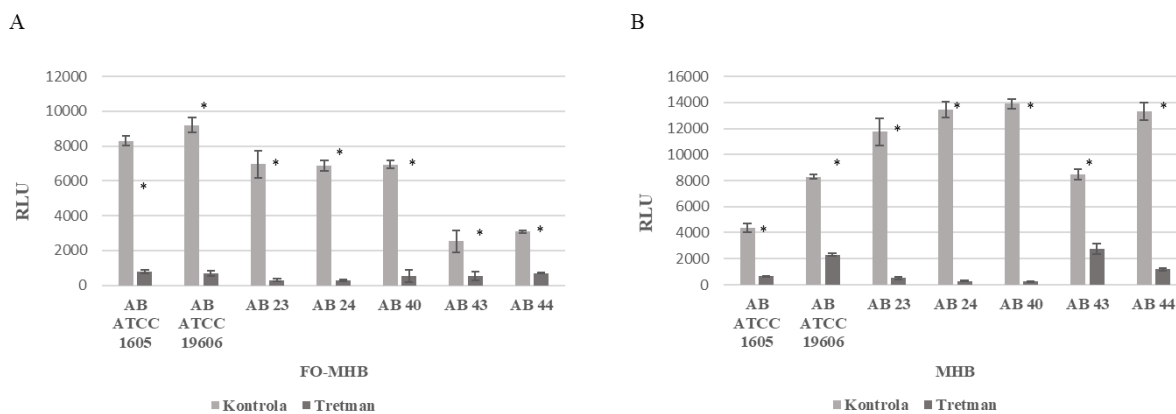
#### 4.5.6. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu *A. baumannii*

Na **Slici 30.** A i B prikazan je učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici ovisno o manjem i većem organskom opterećenju utvrđeno metodom ATP bioluminiscencije.

Nakon tretmana biofilma odabranih sojeva *A. baumannii* plinovitim ozonom došlo je do statistički značajne ( $p < 0,05$ ) redukcije ukupnog broja vijabilnih bakterija u biofilmu za sve sojeve kod manjeg i većeg organskog opterećenja.

Najveća redukcija u slučaju manjeg organskog opterećenja izmjerena je kod soja AB 24, a najmanja kod soja AB 44.

U slučaju većeg organskog opterećenja, najveća redukcija uočena je kod soja AB 24, a najmanja kod AB 43.



**Slika 30.** Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja uporabom metode APT bioluminiscencije. Rezultat je izražen kao izražen kao aritmetička sredina RLU uz standardnu devijaciju. FO označava fiziološku otopinu; MHB označava Muller Hinton bujon; \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0,05$ , ANOVA, t-test).

Obzirom na postotak inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom za biofilm odabranih sojeva model organizma *A. baumannii* stvoren na keramici uz manje organsko opterećenje, a korištenjem metode ATP bioluminiscencije statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije uočena je između sojeva AB 43 naspram svih ostalih te soja AB 44 naspram svih ostalih (**Tablica 17.**).

Biofilm stvoren na keramici uz veće organsko opterećenje pokazuje statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom između sojeva AB ATCC 1605 naspram svih ostalih, soja AB ATCC 19606 naspram svih ostalih, soja AB 43 naspram svih ostalih, soja AB 44 naspram svih ostalih, zatim između soja AB 23 i AB 43, AB 44 te između soja AB 24 sa AB 43 i AB 44.



**Tablica 17.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *A. baumannii* korištenjem ATP bioluminiscencije. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju izračunatog postotka inhibicije. Statistički značajna razlika između sojeva po materijalu/organskom opterećenju ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test (\*)).

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije							<i>p</i> *
	AB ATCC 1605	AB ATCC 19606	AB 23	AB 24	AB 40	AB 43	AB 44	
Keramika FO-MHB	93,98 (1,4)	96,60 (1,3)	95,84 (0,7)	95,90 (0,4)	92,54 (4,6)	80,12 (6,5)	77,36 (0,9)	<0,001*
Keramika MHB	85,04 (0,4)	72,13 (1,9)	95,62 (0,5)	97,84 (0,09)	98,30 (0,04)	67,34 (5,01)	91,08 (1,01)	<0,001*

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

U **Tablici 18.** prikazan je učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih sojeva *A. baumannii* izražen kao postotak inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom ovisno o količini organskog opterećenja po pojedinačnom soju. Ovisno o količini organskog opterećenja, statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena je između svih odabranih sojeva *A. baumannii*, osim soja AB 23.

**Tablica 18.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *A. baumannii* ovisno o materijalu (keramika) i količini organskog opterećenja korištenjem ATP bioluminiscencije. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu postotka inhibicije redukcije uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i količini organskog opterećenja po bakterijskom soju utvrđena testom ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test (\*)).

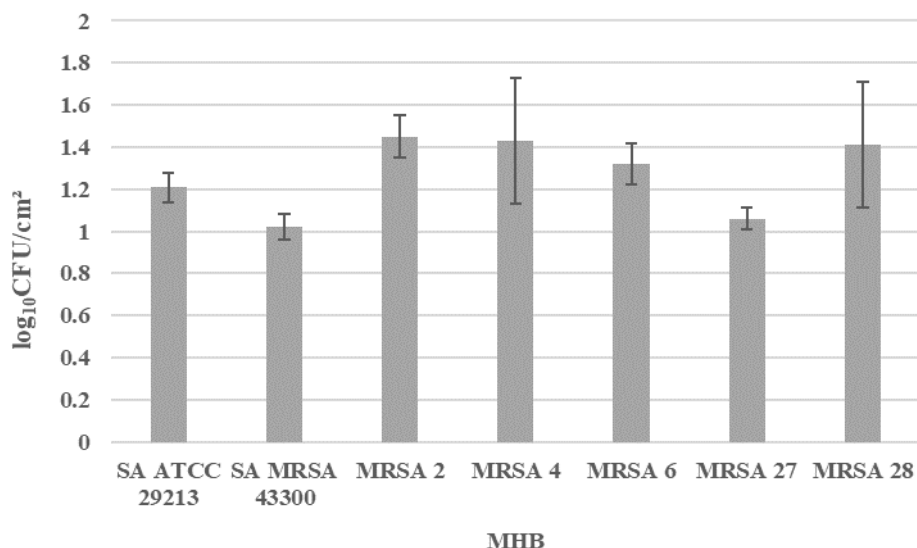
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije				<i>P</i> *
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
AB 1605	93,98 (1,4)	85,04 (0,4)	-	-	<0,001*
AB 19606	96,60 (1,3)	72,13 (1,9)	-	-	<0,001*
AB 23	95,84 (0,7)	95,62 (0,5)	-	-	0,57*
AB 24	95,90 (0,4)	97,84 (0,09)	-	-	<0,001*
AB 40	92,54 (4,6)	98,30 (0,04)	-	-	0,02*
AB 43	80,12 (6,5)	67,34 (5,01)	-	-	0,004*
AB 44	77,36 (0,9)	91,08 (1,01)	-	-	<0,001*

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

#### 4.5.7. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu *S. aureus*

Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *S. aureus* izražen kao  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> redukcija na keramici isključivo uz veće organsko opterećenje prikazan je na **Slici 31**.

Prethodnim ispitivanjima uz manje i veće organsko opterećenje za model organizam *S. aureus* utvrđeno je da kod stvaranje biofilma uz manje organsko opterećenje ne daje dovoljnu količinu biofilma i ponovljive rezultate, stoga su sva daljnja ispitivanja rađena samo uz veće organsko opterećenje.



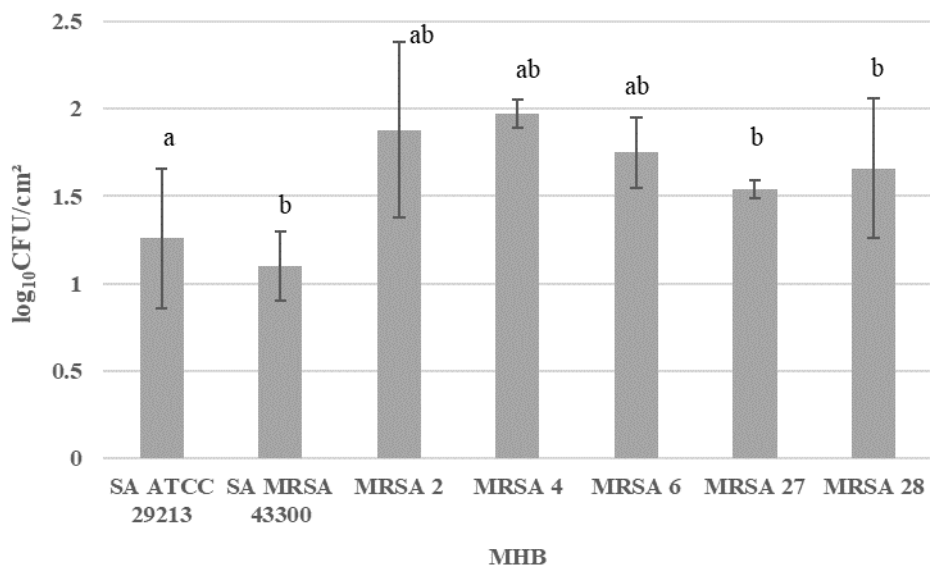
**Slika 31.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *S. aureus* na keramici izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukcija uz standardnu devijaciju za veće organsko opterećenje. MHB označava Muller Hinton bujon; statistički značajna razlika utvrđivana (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Izmjerena log redukcija na keramici za odabrane sojeve *S. aureus* nakon tretmana plinovitim ozonom iznosila je od 1,02 (0,06) za soj SA MRSA 43300 do 1,45 (0,1) za soj MRSA 2.

Iako je za svaki pojedinačni soj utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u smanjenju ukupnog broja kultivabilnih bakterija nakon uporabe plinovitog ozona (nije prikazano), statistički značajna razlika u log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukciji između pojedinačnih sojeva na keramici nije utvrđena.

Na **Slici 32.** prikazana je redukcija ukupnog broja kultivabilnih bakterija odabranih sojeva *S. aureus* na polistirenu nakon tretmana plinovitim ozonom. Najosjetljiviji soj na djelovanje plinovitog ozona bio je MRSA 4 s redukcijom od 1,97 (0,08), a najmanje osjetljivi soj bio je SA MRSA 43300 s log redukcijom od 1,1 (0,2).

Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u iznosu log redukcije uočene su između SA ATCC 29213 i MRSA 2, MRSA 4, MRSA 6 te između SA MRSA 43300 i MRSA 2, MRSA 4, MRSA 6, MRSA 27 i MRSA 28.



**Slika 32.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *S. aureus* na polistirenu izražen kao log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> redukcija uz standardnu devijaciju za veće organsko opterećenje. MHB označava Muller Hinton bujon; a, b označavaju statistički značajnu razliku između sojeva (ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i odabranih sojeva *S. aureus* prikazane su u **Tablici 19**.

Kod sojeva MRSA 4, MRSA 6 i MRSA 27 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u log redukciji između keramike i polistirena nakon tretmana plinovitim ozonom.

Za sojeve SA ATCC 29213, SA MRSA 43300, MRSA 2 i MRSA 28 nije utvrđena statistički značajna razlika u log redukciji između keramike i polistirena.

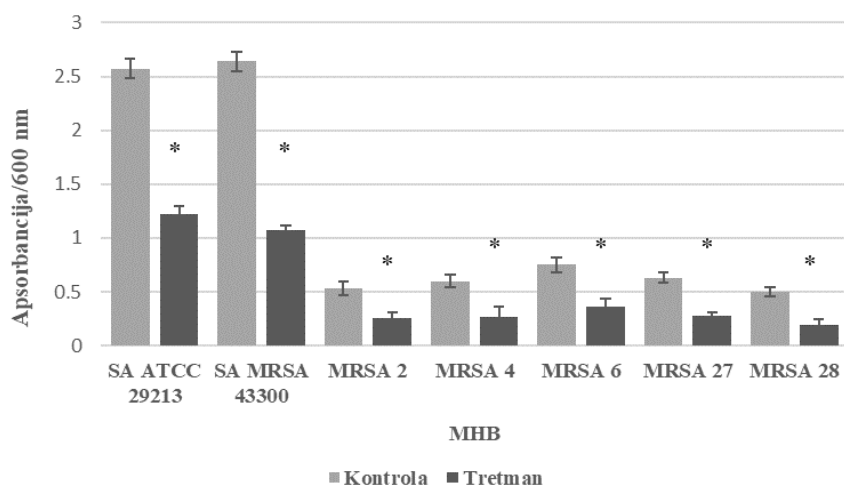
**Tablica 19.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *S. aureus* ovisno o materijalu i većem organskom opterećenju. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> redukcije uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala po bakterijskom soju utvrđena testom t-testom.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Aritmetička sredina (SD) $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> redukcija		<i>P</i> *
	Keramika MHB	Polistiren MHB	
SA ATCC 29213	1,21 (0,7)	1,26 (0,4)	0,89
SA MRSA 43300	1,02 (0,6)	1,1 (0,2)	0,76
MRSA 2	1,45 (0,1)	1,88 (0,5)	0,09
MRSA 4	1,43 (0,3)	1,97 (0,08)	<b>0,004</b>
MRSA 6	1,32 (0,1)	1,75 (0,2)	<b>0,002</b>
MRSA 27	1,06 (0,05)	1,54 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>
MRSA 28	1,41 (0,3)	1,66 (0,4)	0,21

MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

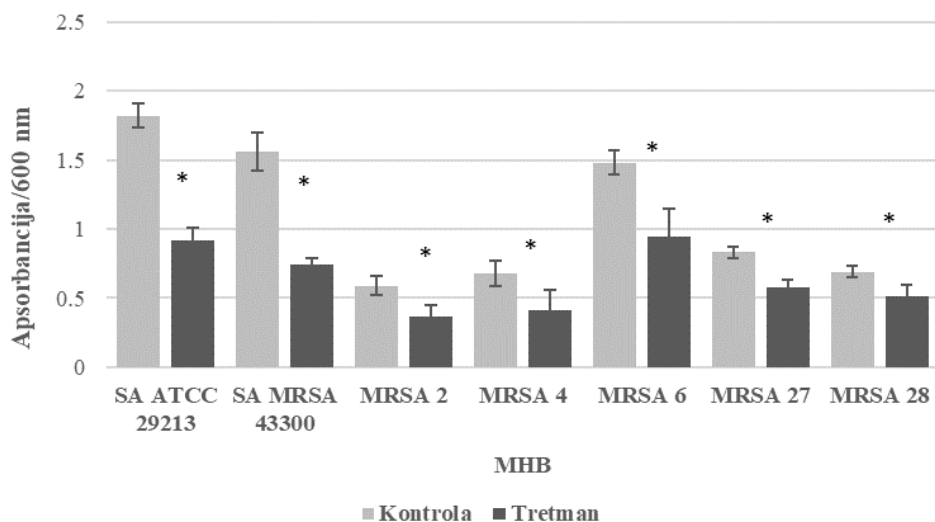
#### 4.5.8. Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu biofilma *S. aureus*

Nakon tretmana biofilma *S. aureus* na keramici plinovitim ozonom došlo je do statistički značajne redukcije ( $p < 0,05$ ) ukupne biomase za sve odabrane sojeve model organizma u usporedbi s kontrolom (**Slika 33.**). Najveće smanjenje ukupne biomase mjereno metodom kristal violet bojenja uočeno je kod soja MRSA 28, najmanje kod soja MRSA 2.



**Slika 33.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *S. aureus* na keramici kod većeg organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbancije na 600 nm uz standardnu devijaciju. MHB označava Muller Hinton bujon; \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , t-test).

Kod biofilma *S. aureus* na polistirenu, također je nakon tretmana plinovitim ozonom došlo do statistički značajne redukcije ( $p < 0,05$ ) ukupne biomase svih ispitivanih sojeva *S. aureus* (Slika 34.). Do najveće redukcije ukupne biomase došlo je kod soja SA MRSA 43300, dok je najmanja redukcija ukupne biomase izmjerena kod soja SA 28.



**Slika 34.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *S. aureus* na polistirenu kod većeg organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbancije na 600 nm uz standardnu devijaciju. MHB označava Muller Hinton bujon; \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0.05$ , t-test).

**Tablica 20.** pokazuje statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije biofilma različitih sojeva *S. aureus* nakon tretmana plinovitim ozonom po odabranom materijalu, a korištenjem metode kristal – violet bojenja.

Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postku inhibicije utvrđena je između sojeva SA ATCC naspram MRSA 27 i MRSA 28, zatim između soja SA MRSA naspram MRSA 27 i MRSA 28.

**Tablica 20.** Usporedba različitih materijala i većeg organskog opterećenja za odabrane sojeve *S. aureus* korištenjem kristal violet bojenja. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju (SD) izračunatog postotka inhibicije. MHB označava Muller Hinton bujon; statistički značajna razlika između sojeva po materijalu/organskom opterećenju ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test(\*)).

<i>Staphylococcus aureus</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije							<i>P</i> *
	SA ATCC	SA MRSA	MRSA 2	MRSA 4	MRSA 6	MRSA 27	MRSA 28	
	29213	43300						
Keramika MHB	49,25 (5,9)	52,56 (4,3)	37,44 (8,3)	40,64 (18,1)	36,49 (12,5)	30,9 (6)	25,07 (5,4)	<b>0,002*</b>
Polistiren MHB	52,71 (1,9)	59,5 (1)	53,93 (12,4)	53,85 (15,8)	52,17 (9,6)	54,83 (6,6)	61,87 (11)	0,54*

MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

Obzirom na učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih sojeva *S. aureus* korištenjem metode kristal violet bojenja, a izražen kao postotak inhibicije, statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena je u postotku inhibicije između biofilma stvorenog na keramici MHB i polistirenu MHB za sojeve SA ATCC 29213, SA MRSA 43300, MRSA 2, MRSA 6, MRSA 27 i MRSA 28 (**Tablica 21.**).

**Tablica 21.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *S. aureus* ovisno o materijalu (keramika) i većem organskom opterećenju korištenjem kristal violet bojenja. Rezultati prikazuju aritmetičku sredinu postotka inhibicije redukcije uz standardnu devijaciju. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih vrsta materijala i količini organskog opterećenja po bakterijskom soju utvrđena testom ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test(\*)).

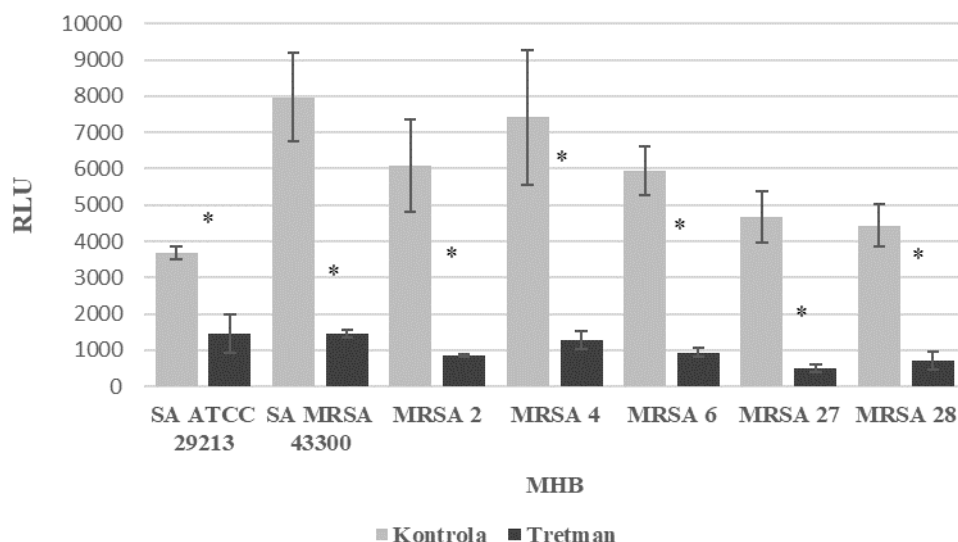
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije				<i>P</i> *
	Keramika FO-MHB	Keramika MHB	Polistiren FO-MHB	Polistiren MHB	
SA ATCC 29213	-	49,25 (5,9)	-	52,71 (1,9)	<b>0,03*</b>
MRSA ATCC 43300	-	52,56 (4,3)	-	59,5 (1)	<b>0,02*</b>
MRSA 2	-	37,44 (8,3)	-	53,93 (12,4)	<b>0,03*</b>
MRSA 4	-	40,64 (18,1)	-	53,85 (15,8)	0,23*
MRSA 6	-	36,49 (12,5)	-	52,17 (9,6)	<b>0,04*</b>
MRSA 27	-	30,9 (6)	-	54,83 (6,6)	<b>&lt;0,001*</b>
MRSA 28	-	25,07 (5,4)	-	61,87 (11)	<b>&lt;0,001*</b>

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

#### 4.5.9. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu *S. aureus*

Uporabom metode ATP bioluminiscencije kao dopunske metode za određivanje ukupnog broja vijabilnih bakterija u biofilmu utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u redukciji ukupnog broja vijabilnih broja bakterija u biofilmu nakon tretmana plinovitim ozonom kod svih sojeva *S. aureus* u usporedbi s kontrolom (**Slika 35.**).





**Slika 35.** Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *S. aureus* na keramici kod većeg organskog opterećenja uporabom metode APT bioluminiscencije. Rezultat je izražen kao aritmetička sredina RLU uz standardnu devijaciju. MHB označava Muller Hinton bujon; \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana ( $p < 0,05$ , t-test).

Najveća redukcija ukupnog broja vijabilnih bakterija u biofilmu model organizma *S. aureus* utvrđeno je kod soja SA 27, a najmanja redukcija kod soja SA ATCC 29213.

Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije biofilma nakon tretmana plinovitim ozonom, detektirana metodom ATP bioluminiscencije prikazana je u **Tablici 22.** za odabrane sojeve *S. aureus*. Značajna razlika u postotku inhibicije za biofilm stvoren na keramici uz veće organsko opterećenje utvrđena je između soja SA ATCC 29213 naspram svih ostalih.

**Tablica 22.** Usporedba materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *S. aureus* korištenjem ATP bioluminiscencije. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju izračunatog postotka inhibicije. Statistički značajna razlika između sojeva po materijalu/organskom opterećenju ( $p < 0,05$ ) utvrđena ANOVA (Student-Newman-Keuls post hoc test).

		Aritmetička sredina (SD) % inhibicije						
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	<i>P</i> *
	ATCC	ATCC						
	29213	43300	2	4	6	27	28	
Keramika MHB	60,83 (13,5)	81,53 (2,7)	85,4 (3,1)	82,5 (1,8)	84,25 (0,7)	89,1 (1,8)	84,31 (4,4)	<0,001*

MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija

#### **4.5.10. Učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih i vijabilnih bakterija te na ukupnu biomasu model organizama na keramici i polistirenu uz različitu količinu organskog opterećenja**

Međusobna usporedba učinkovitosti plinovitog ozona na biofilm odabranih model organizama (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*) ovisno o vrsti materijala i količini organskog opterećenja prikazana je u **Tablici 23**.

**Tablica 23.** – Učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih model organizma prikazan kao postotak inhibicije uz standardnu devijaciju ovisno o vrsti materijala i organskog opterećenja. Statistička značajnost utvrđena  $p < 0,05$ , ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc test(\*).

	Aritmetička sredina (SD) % inhibicije			P*
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (AB)	<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	
<b>CFU</b>				
Keramika FO-MHB	98,91 (0,60)	99,13 (0,44)	-	0,45*
Keramika MHB	95,14 (2,8)	97,16 (2,6)	92,80 (3,8)	<b>0,04*</b>
Polistiren FO-MHB	99,22 (0,5)	99,95 (0,06)	-	<b>0,006*</b>
Polistiren MHB	94,07 (2,3)	99,30 (0,6)	96,73 (2,9)	<b>0,001*</b>
<b>KV</b>				
Keramika FO-MHB	37,79 (8,5)	46,73 (17,4)	-	0,10*
Keramika MHB	45,47 (2,4)	47,72 (9,5)	55,07 (4,48)	<b>0,0*</b>
Polistiren FO-MHB	61,24 (15,7)	45,46 (7,2)	-	<b>0,03*</b>
Polistiren MHB	50,29 (2,2)	51,64 (5,6)	38,89 (9,7)	<b>0,003*</b>
<b>ATP [Medijan (IQR)]</b>				
Keramika FO-MHB	81,29 (4,9)	89,03 (7,7)	-	<b>0,04*</b>
Keramika MHB	90,40 (10,9)	86,79 (12,5)	81,21 (9,4)	0,31*

FO-MHB – fiziološka otopina – Muller Hinton bujon (manje organsko opterećenje), MHB – Muller Hinton bujon (veće organsko opterećenje), SD – standardna devijacija, CFU - ukupan broj kultivabilnih bakterija, KV - kristal violet bojenje, ATP - ATP bioluminiscencija

Na biofilmu stvorenom na keramici uz korištenje većeg organskog opterećenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u inhibiciji nakon korištenja plinovitog ozona između model organizma *A. baumannii* naspram *S. aureusa*.

Za biofilm stvoren na polistirenu uz prisutnost manjeg organskog opterećenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u inhibiciji nakon korištenja plinovitog ozona između *K. pneumoniae* i *A. baumannii*.

Nadalje, statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u inhibiciji nakon korištenja plinovitog ozona utvrđena je između svih odabranih model organizama kod biofilma stvorenog na polistirenu uz veće organsko opterećenje.

Za biofilm stvoren na keramici uz prisutnost manje količine organskog opterećenja nije utvrđena statistički značajna razlika u inhibiciji nakon tretmana ozonom između *K. pneumoniae* i *A. baumannii*.

Za metodu kristal violet bojenja, statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije između odabranih model organizama, a nakon tretmana ozonom utvrđena je između model organizma *S. aureus* naspram *K. pneumoniae* i *A. baumannii* za biofilm stvoren na keramici uz veće organsko opterećenje, zatim između vrsti *K. pneumoniae* i *A. baumannii* za bioilm stvoren na polistirenu uz manje organsko opterećenje.

Nadalje, kod biofilma stvorenog na polistirenu uz veće organsko opterećenje, utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotka inhibicije nakon tretmana ozonom između *S. aureus* naspram *K. pneumoniae* i *A. baumannii*.

Metoda ATP bioluminiscencije korištena je samo na keramici uz manje i veće organsko opterećenje za model organizme *K. pneumoniae* i *A. baumannii*, dok je za model organizam korištena samo na keramici uz veće organsko opterećenje.

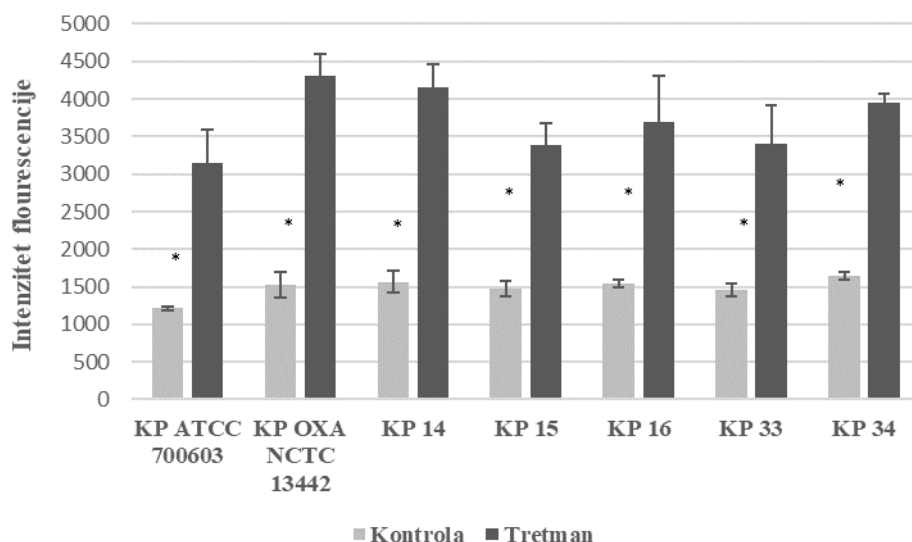
Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u postotku inhibicije nakon tretmana plinovitim ozonom utvrđena je između model organizama *K. pneumoniae* i *A. baumannii* za keramiku uz manje organsko opterećenje, dok razlika u postotku inhibicije između odabranih model organizama na keramici uz veće organsko opterećenje nije uočena.

#### **4.6. Oksidativni stres model organizama nakon tretmana plinovitim ozonom**

Razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) izražene kao intenzitet flouescencije prije i poslije tretmana plinovitim ozonom kod odabranih sojeva *K. pneumoniae* prikazane su na **Slici 36**.

Nakon tretmana plinovitim ozonom dolazi do statistički značajnog porasta ( $p < 0,05$ ) u intenzitetu flouescencije, tj. u porastu reaktivnih kisikovih vrsta u svim sojevima *K. pneumoniae*.

Najveće povećanje intenziteta flouescencije od 185,62% utvrđeno je kod soja KP OXA NCTC 13442, a najmanje kod soja KP 15 u iznosu od 128,23%.

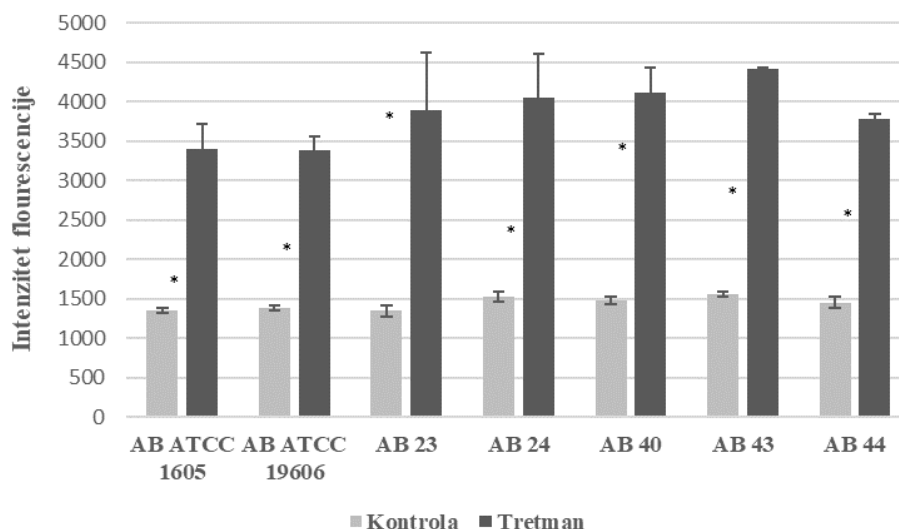


**Slika 36.** Intenzitet fluorescence (valna dužina eksitacije 488 nm, emisije detektirane u rasponu od 500-600 nm) za odabrane sojeve *K. pneumoniae*. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju. \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za svaki pojedinačni soj ( $p < 0.05$ , t-test)

**Slika 37.** prikazuje je porast intenziteta fluorescence za odabrane sojeve model organizma *A. baumannii* prije i nakon tretmana plinovitim ozonom.

Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u porastu intenziteta fluorescence utvrđena je kod svih sojeva *A. baumannii*.

Najveći porast intenziteta fluorescence nakon tretmana plinovitim ozonom utvrđen je kod AB 43 za 188,36%, a najmanji kod AB 1605 u iznosu od 145,23%.

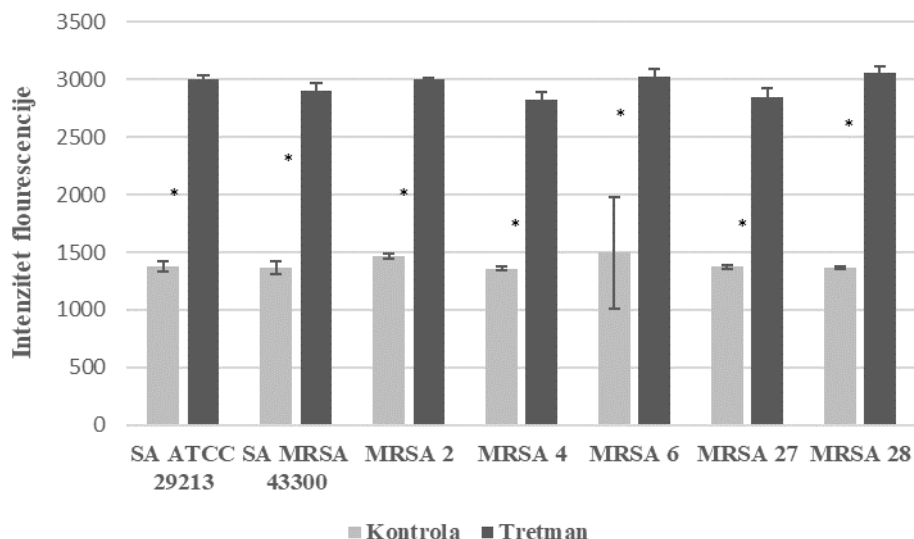


**Slika 37.** Intenzitet fluorescence (valna dužina eksitacije 488 nm, emisije detektirane u rasponu od 500-600 nm) za odabrane sojeve *A. baumannii*. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju. \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za svaki pojedinačni soj ( $p < 0.05$ , t-test)

Slično kao i kod prethodna dva model organizma, nakon tretmana plinovitim ozonom dolazi do statistički značajnog porasta ( $p < 0,05$ ) u razini fluorescence i kod svih odabranih sojeva *S. aureus* (**Slika 38.**).

Kod soja MRSA 28 utvrđen je najveći porast intenziteta fluorescence (124%), a najmanji kod MRSA 6 (102,37%).

Od sva 3 testirana model organizma, najmanji porast intenziteta fluorescence utvrđen je kod *S. aureus*, a najveći kod *A. baumannii* (nije prikazano).

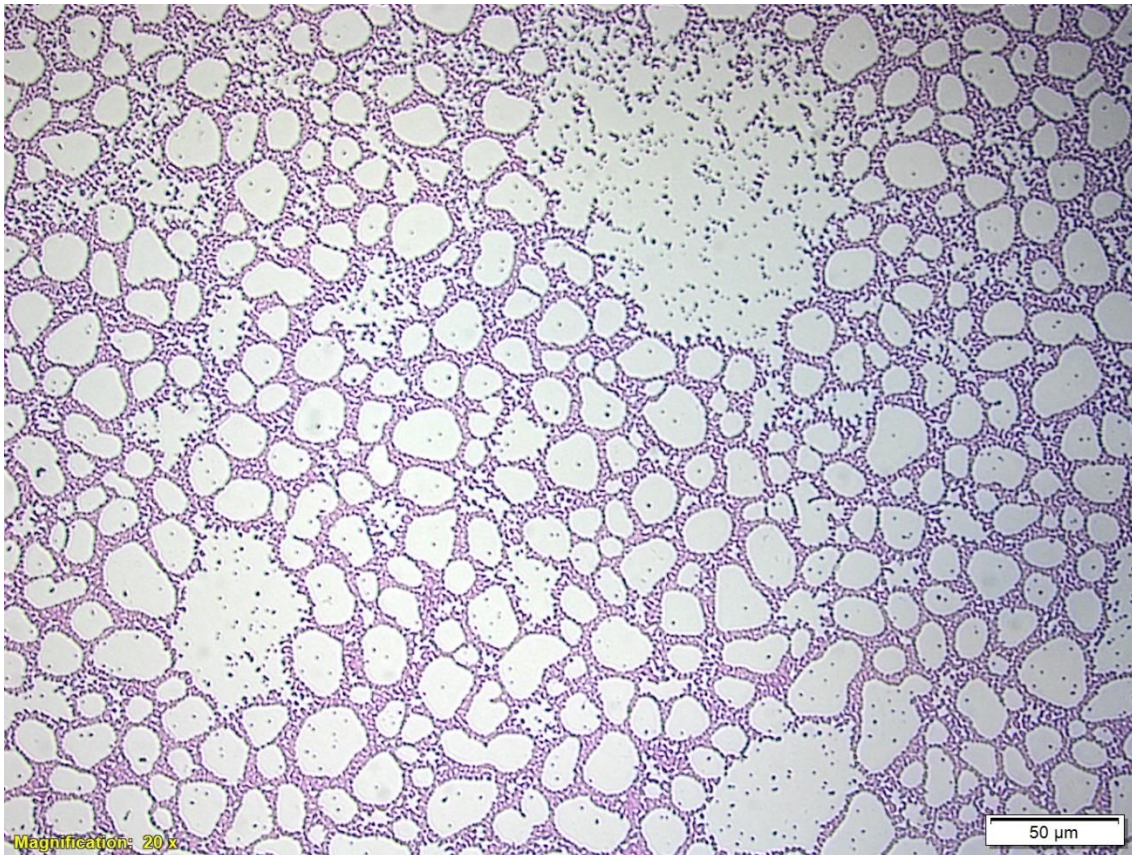


**Slika 38.** Intenzitet fluorescence (valna dužina eksitacije 488 nm, emisije detektirane u rasponu od 500-600 nm) za odabrane sojeve *S. aureus*. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju. \* označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za svaki pojedinačni soj ( $p < 0.05$ , t-test)

#### 4.7. Učinak plinovitog ozona na topologiju biofilma reprezentativnog soja *K. pneumoniae*

Učinak plinovitog ozona na topologiju biofilma reprezentativnog soja model organizama *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 prikazan putem svjetlosne, digitalne i mikroskopije atomskih sila.

Na **Slici 39.** uočavaju se područja razaranja na površini biofilma u smislu većih područja bez bakterijskih stanica.



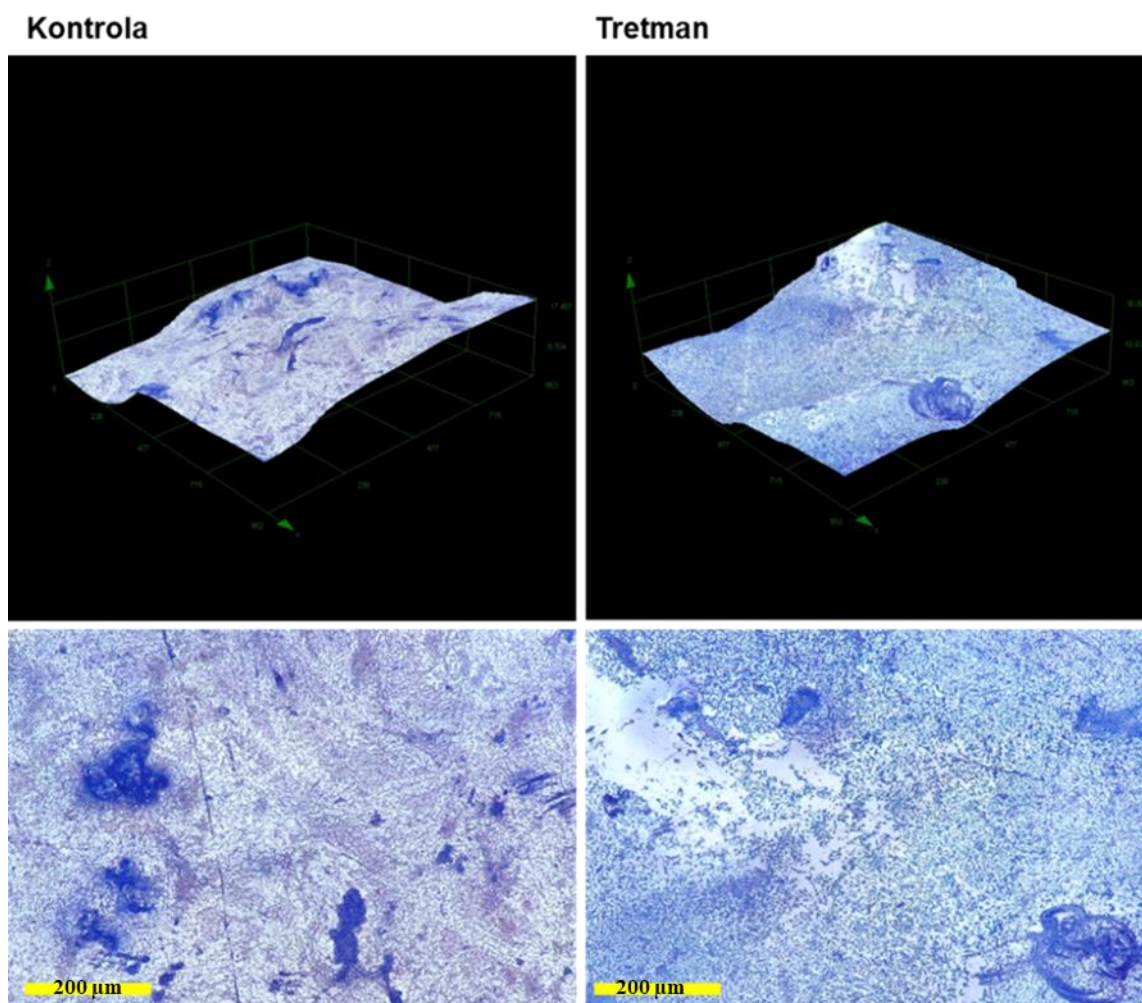
**Slika 39.** Prikaz razaranja strukture biofilma reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 nakon tretmana plinovitim ozonom. Povećanje 20x.

Nadalje, **Slika 40.** prikazuje dvodimenzionalne i trodimenzionalne prikaze biofilma reprezentativnog model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 bojanog kristal violetom te snimljenog digitalnom mikroskopijom.

Usporedbom s kontrolnim, neetiranim biofilmom vidljive su nakupine bakterijskih stanica model organizma pod utjecajem površinskih nepravilnosti keramičke pločice gdje se bakterijske stanice nakupljaju u sitnim udubinama na površini keramičke pločice.

Nakon tretmana plinovitim ozonom dolazi uništavanja biofilma na uzdignutim površinama, dok u udubinama i na ravnim površinama dolazi do djelomičnog oštećenja biofilma.



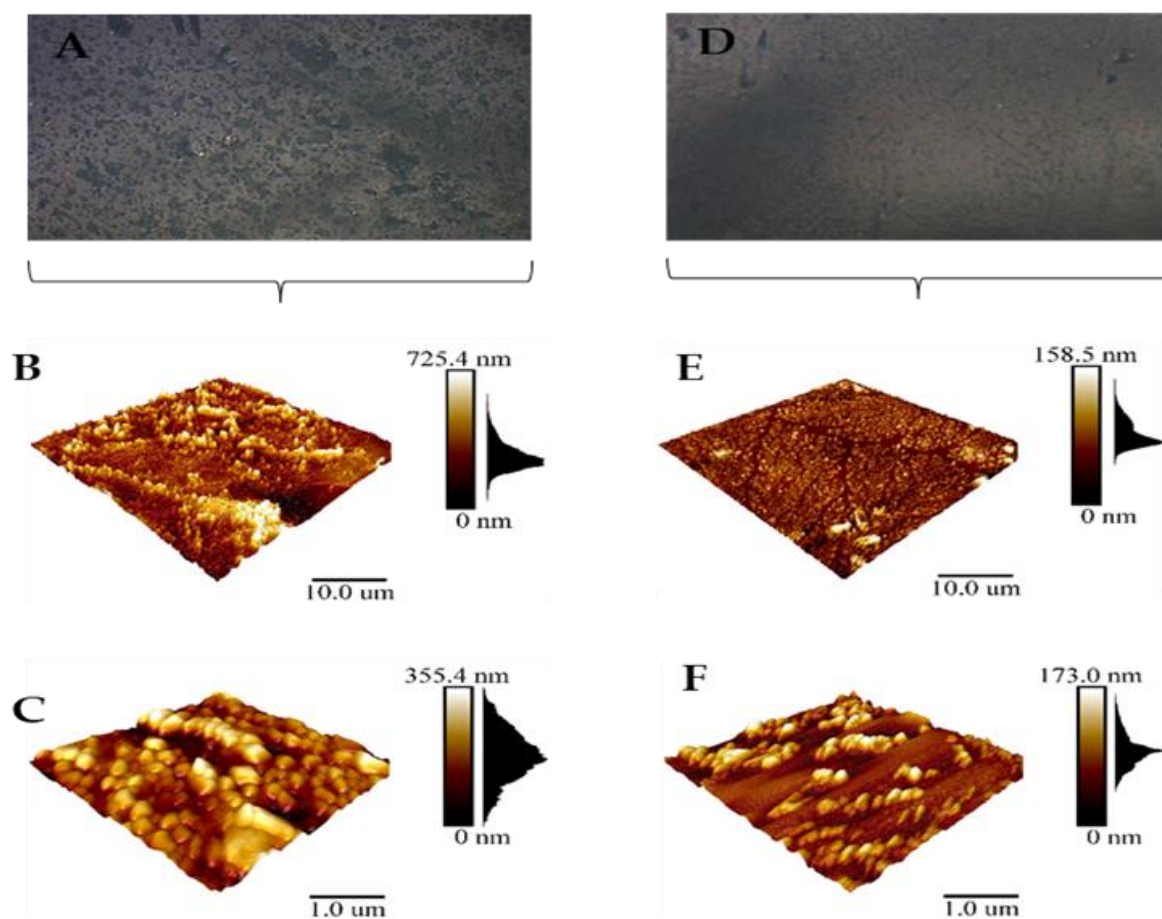


**Slika 40.** Trodimenzionalni prikaz kontrolne i tretirane keramičke pločice s biofilmom reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 (gornji red), na donjim slikama dvodimenzionalni prikaz biofilma reprezentativnog model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 (donji red). Povećanje 200x.

Na **Slici 41.** prikazana je topologija biofilma reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442. Netretirani biofilm model organizama (kontrola) prikazan je da slikama (A, B, C), dok je biofilm model organizama tretiran plinovitim ozonom prikazan na slikama D, E i F.

Nakon tretmana plinovitim ozonom, vidljive su promjene na topologiji biofilma u smislu agregacije stanica te praznih prostora u kojima je došlo do razaranja biofilma.

Osim navedenog, uvrđene su varijacije u distribucijama vrhova u trodimenzionalnoj strukturi biofilma. Plinoviti ozon uzrokovao je smanjenje visina vrhova biofilma sa 725.4 nm na 158 nm (E) te sa 355.4 nm na 173.0 nm (F).



**Slika 41.** Topologija biofilma reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 na keramici prikazana uporabom mikroskopije atomskih sila. A, B, C prikazuje kontrolu (netretirani biofilm), D, E, F prikazuje biofilm tretiran plinovitim ozonom. Skenirajuće područje za B i E je  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  za C i F is  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ .

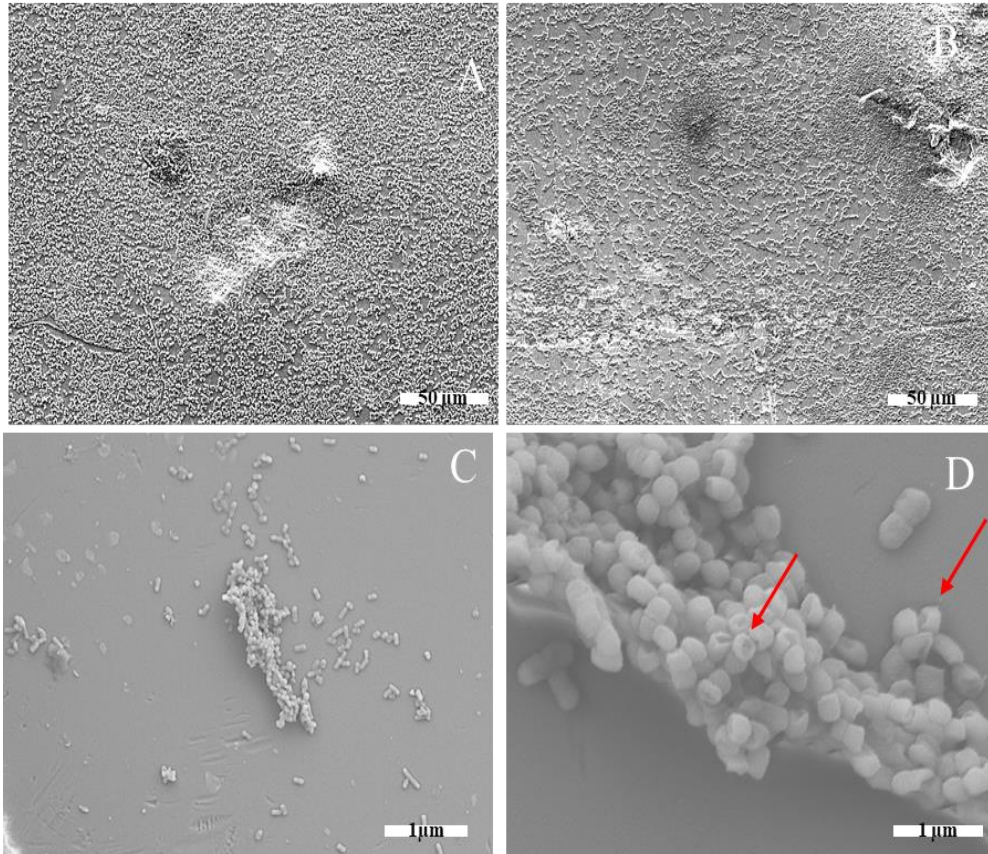
#### 4.8. Morfološke promjene na biofilmu i stanicama reprezentativnih sojeva model organizama nakon tretmana plinovitim ozonom

Tretman odabranom koncentracijom plinovitog ozona uzrokuje morfološke promjene na strukturi biofilma reprezentativnih sojeva odabranih model organizama na način da se uočavaju zone razaranja biofilma i prisutnost oštećenih bakterijskih stanica.

Za utvrđivanje morfoloških promjena na strukturi biofilma model organizama, ali i za uvrđivanje morfoloških promjena na pojedinačnim stanicama model organizama korištena je i pretražna elektronska mikroskopija.

Na **Slici 42.** vidljive su morfološke promjene na biofilmu i pojedinačnim stanicama reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442. Tretman plinovitim

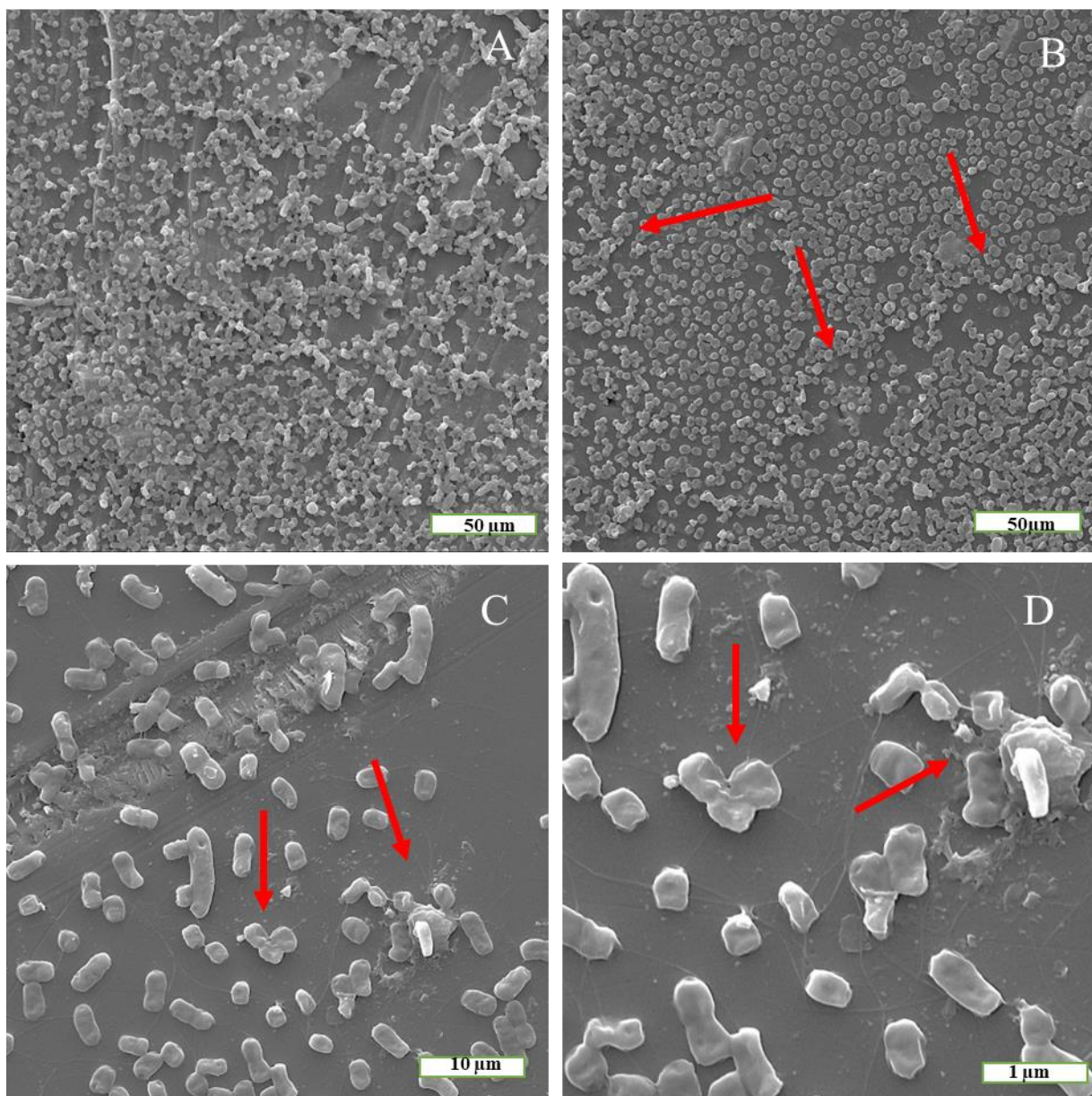
ozonom uzrokuje ulegnuća u trodimenzionalnoj strukturi biofilma. Osim toga, plinoviti ozon uzrokuje oštećenja na staničnoj membrani stanica model organizma na način da su vidljive invaginacije na membrani (Slika 42,D).



**Slika 42.** Morfološke promjene na strukturi biofilma (B) i stanicama reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 nakon tretmana plinovitim ozonom (C, D). A predstavlja netretirani biofilm. Povećenja A i B 1000x, C 2000X i D 5000x.

**Slika 43.** prikazuje morfološke promjene na strukturi biofilma i pojedinačnih stanica reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA 1605 nakon tretmana plinovitim ozonom.

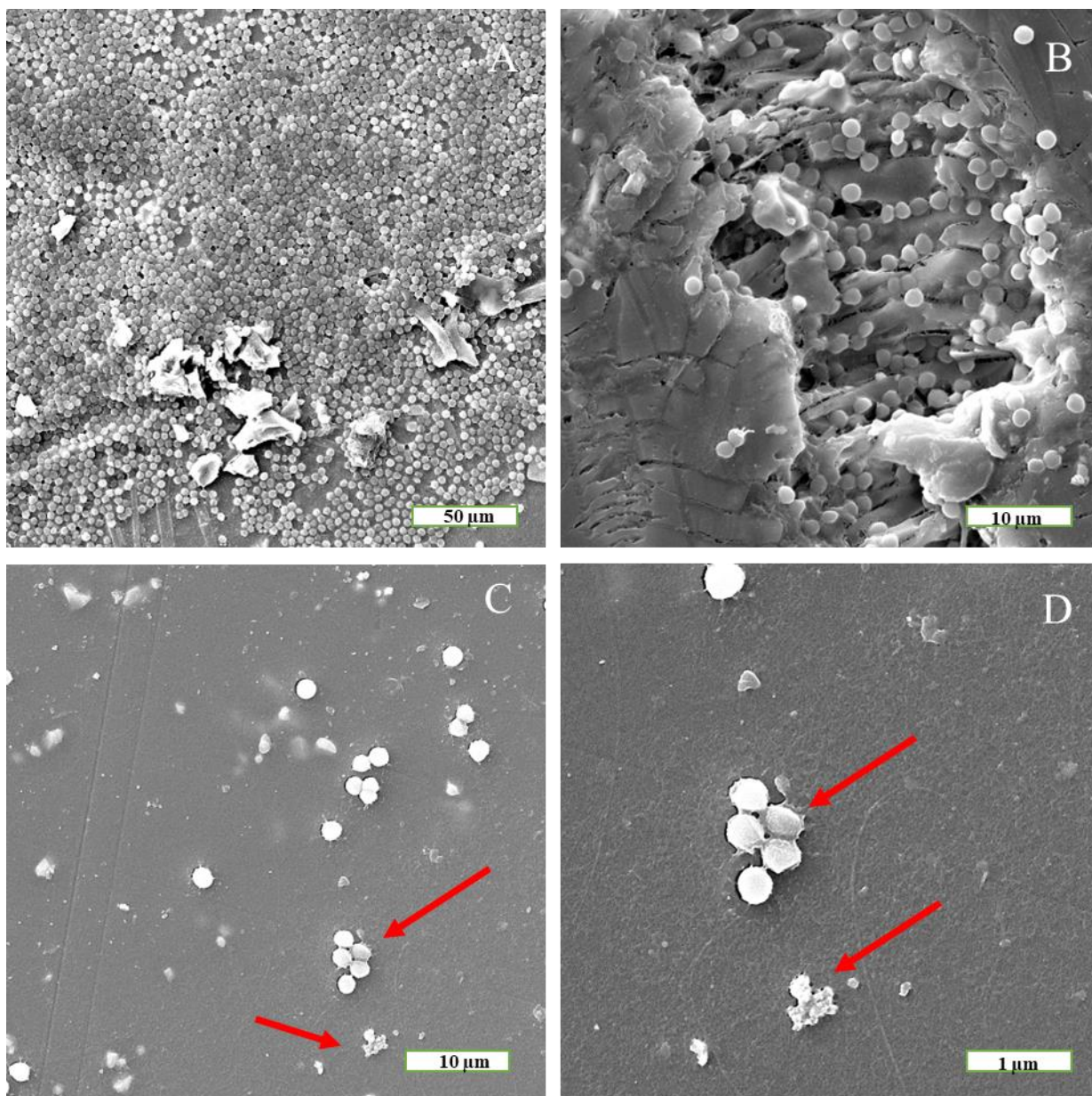




**Slika 43.** Morfološke promjene na strukturi biofilma (B) i stanicama reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA 1605 nakon tretmana plinovitim ozonom (C, D). A predstavlja netretirani biofilm. Povećanje A i B 2000x, C 5000 x i D 10000x.

Nakon tretmana plinovitim ozonom uočavaju se oštećenja na strukturi biofilma u smislu razaranja biofilma (**Slika 43. B**) te oštećenja na staničnoj membrani pojedinačnih stanica. Od oštećenja na staničnoj membrani uočavaju se udubljenja i deformacije stanica (Slika 43.C i D).

Na **Slici 44.** prikazane su morfološke promjene biofilma i pojedinačnih stanica reprezentativnog soja model organizma *S. aureus* MRSA ATCC 43300 naspram kontrole, tj. netretiranog biofilma (**Slika 44.A**).



**Slika 44.** Prikaz morfoloških promjena na strukturi biofilma (B) i stanicama reprezentativnog soja model organizma *S. aureus* MRSA ATCC 43300 nakon tretmana plinovitim ozonom (C, D). A predstavlja netretirani biofilm. Povećanje A i B 2000x, C 5000 x i D 10000x.

Nakon tretmana plinovitiom ozonom dolazi do oštećenja i razaranja strukture biofilma te do deformacije pojedinačnih stanica reprezentativnog soja model organizma *S. aureus*. Osim deformacija stanične membrane, uočavaju se i potpuno razorene stanice (Slika 44. C i D).

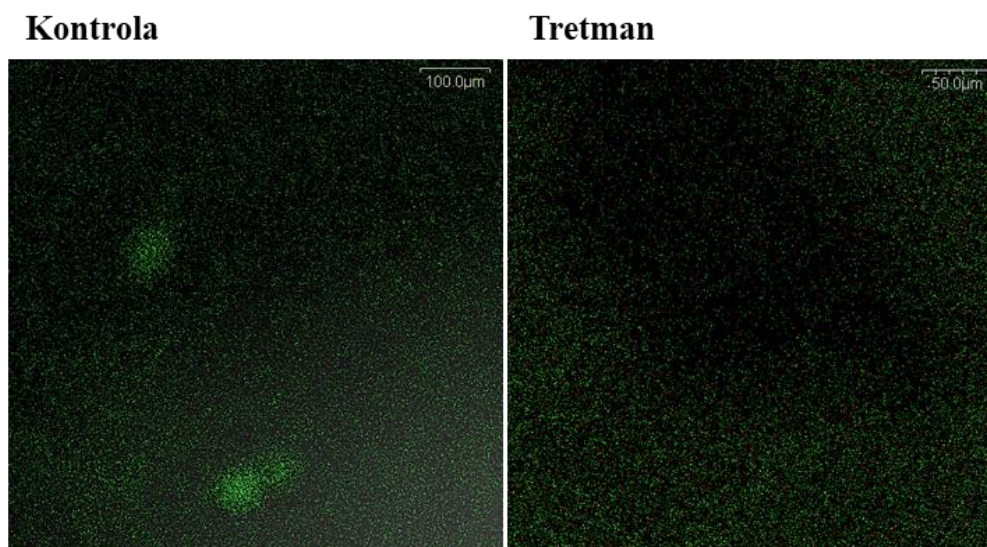


#### 4.9. Učinak plinovitog ozona na vijabilnost stanica u biofilmu model organizama

Vijabilnost bakterijskih stanica model organizama obzirom na permeabilnost stanične membrane utvrđena je korištenjem metode Dead Live bojenja za obje vrste organskog opterećenja.

**Slika 45.** prikazuje vijabilnost stanica u biofilmu reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13443 prije (kontrola) i nakon tretmana plinovitim ozonom uz manje organsko opterećenje. Prije korištenja plinovitog ozona vidljive su guste nakupine fluorescentno zelenih nakupina stanica model organizma koje predstavljaju žive stanice, a nakon korištenja plinovitog ozona dolazi do značajnog smanjenja broja živih bakterijskih stanica te do povećanja u brojnosti crvenih stanica, koje predstavljaju nežive stanice.

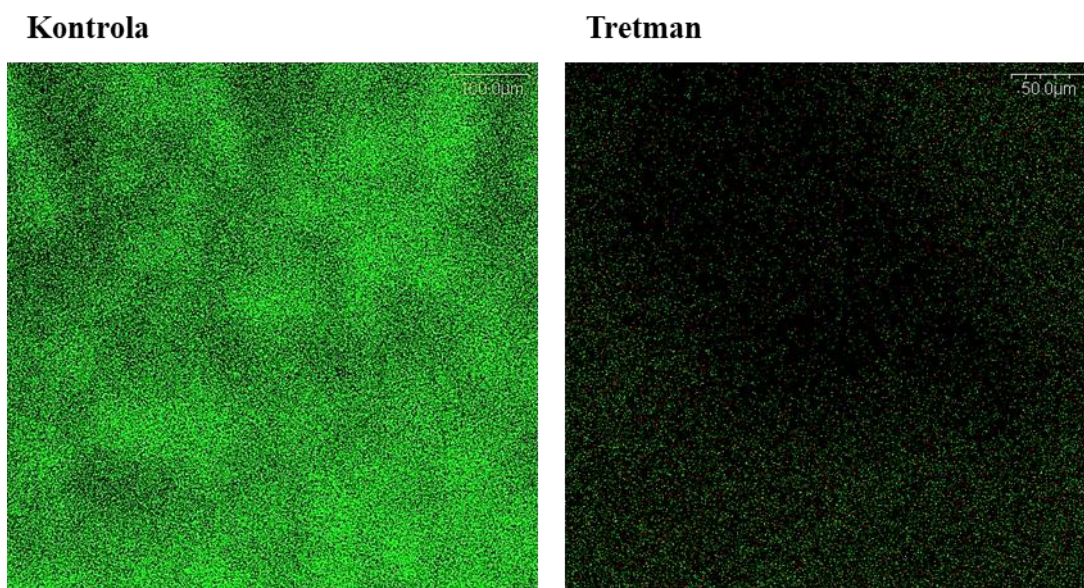
Izmjereni intenzitet zelene fluorescence prije tretmana ozonom bio je 10.526 AU, a za crvene stanice 0.772 AU. Nakon tretmana ozonom, izmjereni intenzitet zelene fluorescence bio je 4.203 AU, dok je intenzitet crvene porastao na 4.11 AU.



**Slika 45.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 uz manje organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Zelene točke predstavljaju žive bakterijske stanice s netaknutom staničnom membranom, crvene točke označavaju mrtve bakterijske stanice. Povećanje 200x.

Vijabilnost stanica u biofilmu reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13443 prije (kontrola) i nakon tretmana plinovitim ozonom uz veće organsko opterećenje prikazana je na **Slici 46.**

Prije korištenja plinovitog ozona vidljive su guste nakupine fluorescentno zelenih nakupina stanica model organizma koje predstavljaju žive stanice, a nakon korištenja plinovitog ozona dolazi do značajnog smanjenja broja živih bakterijskih stanica te do povećanja u brojniosti crvenih stanica, koje predstavljaju nežive stanice. U usporedbi sa prikazom na Slici 45. koja predstavlja manje organsko opterećenje, vidljivo je puno veće zasićenje organskim materijalom (živim bakterijskim stanicama).

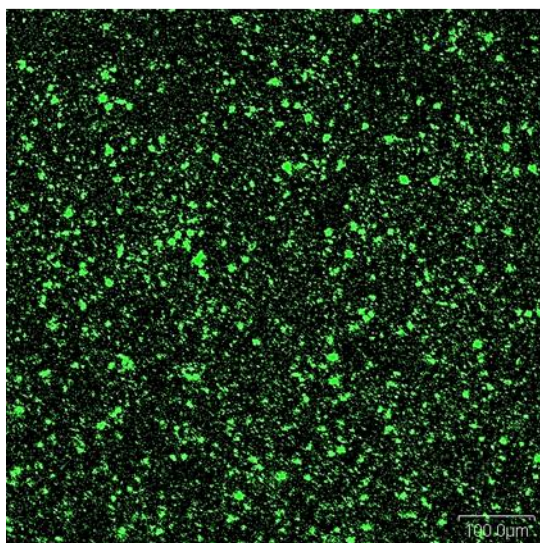


**Slika 46.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 uz veće organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Zelene točke predstavljaju žive bakterijske stanice s netaknutom staničnom membranom, crvene točke označavaju mrtve bakterijske stanice. Povećanje 200x.

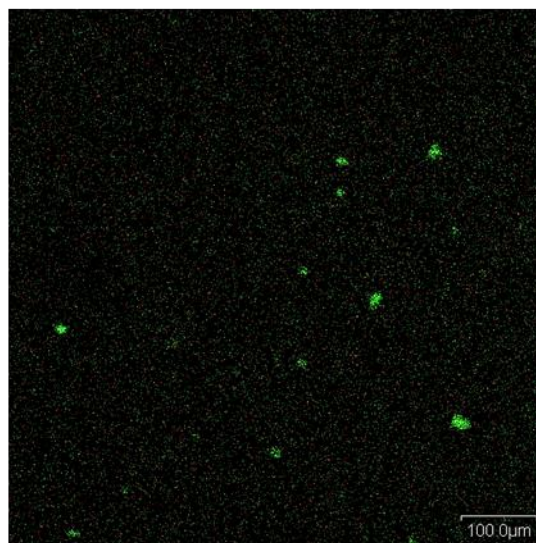
**Slika 47.** prikazuje vijabilnost stanica u biofilmu reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA1605 prije (kontrola) i nakon tretmana plinovitim ozonom uz manje organsko opterećenje. Prije korištenja plinovitog ozona vidljive su guste nakupine fluorescentno zelenih nakupina stanica model organizma koje predstavljaju žive stanice, a nakon korištenja plinovitog ozona dolazi do značajnog smanjenja broja živih bakterijskih stanica te do povećanja u brojniosti crvenih stanica, koje predstavljaju nežive stanice.



**Kontrola**



**Tretman**



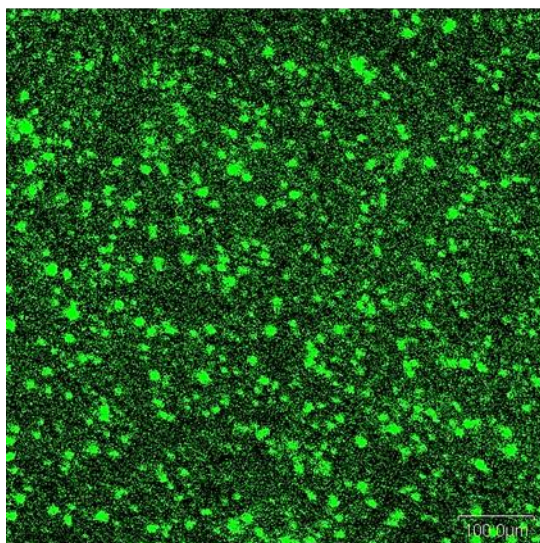
**Slika 47.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA1605 uz manje organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Zelene točke predstavljaju žive bakterijske stanice s netaknutom staničnom membranom, crvene točke označavaju mrtve bakterijske stanice. Povećanje 200x.

Vijabilnost stanica u biofilmu reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA1605 prije (kontrola) i nakon tretmana plinovitim ozonom uz veće organsko opterećenje prikazana je na **Slici 48**.

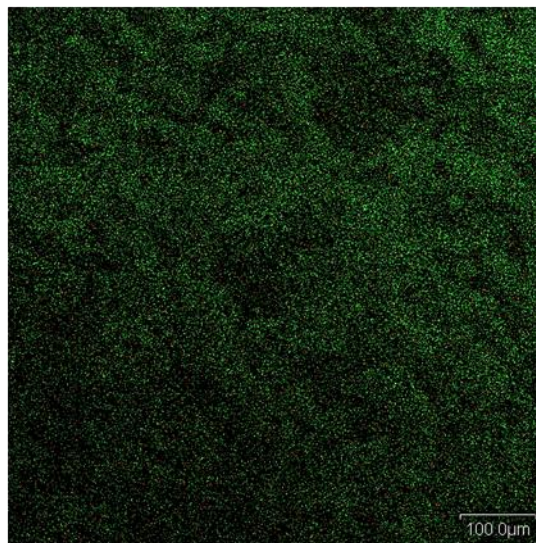
Prije korištenja plinovitog ozona vidljive su guste nakupine fluorescentno zelenih nakupina stanica model organizma koje predstavljaju žive stanice, a nakon korištenja plinovitog ozona dolazi do značajnog smanjenja broja živih bakterijskih stanica te do povećanja u brojnosti crvenih stanica, koje predstavljaju nežive stanice. Slično kao i kod *K. pneumoniae*, usporedbom sa prikazom na Slici 47. koja predstavlja manje organsko opterećenje, vidljivo je puno veće zasićenje organskim materijalom (živim bakterijskim stanicama).



**Kontrola**



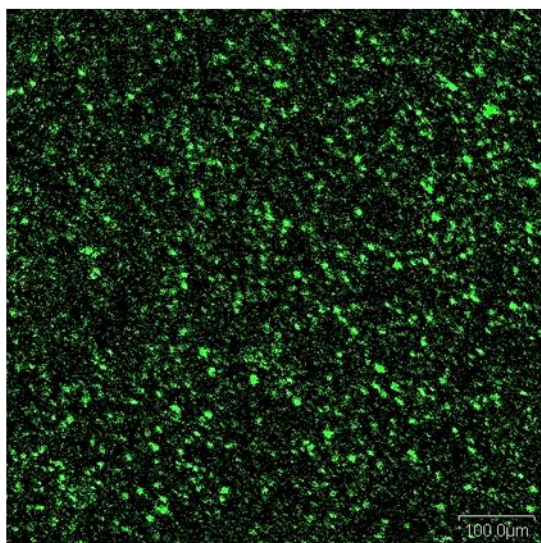
**Tretman**



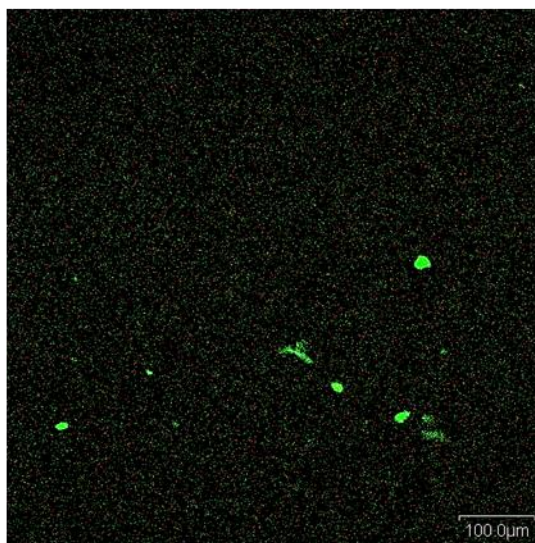
**Slika 48.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA1605 uz veće organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Zelene točke predstavljaju žive bakterijske stanice s netaknutom staničnom membranom, crvene točke označavaju mrtve bakterijske stanice. Povećanje 200x.

Na **Slici 49.** prikazana je vijabilnost stanica u biofilmu reprezentativnog soja model organizma *S. aureus* MRSA 43300 prije (kontrola) i nakon tretmana plinovitim ozonom uz veće organsko opterećenje. Vidljive su guste nakupine fluorescentno zelenih nakupina stanica *S. aureus* MRSA 43300 koje predstavljaju žive stanice. Nakon tretmana plinovitim ozonom dolazi do značajnog smanjenja broja živih bakterijskih stanica te do povećanja u brojnosti crvenih stanica, koje predstavljaju nežive stanice.

**Kontrola**



**Tretman**



**Slika 49.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *S. aureus* MRSA 43300 uz veće organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom. Zelene točke predstavljaju žive bakterijske stanice s netaknutom staničnom membranom, crvene točke označavaju mrtve bakterijske stanice. Povećanje 200x.

#### **4.10. *In situ* učinak plinovitog ozona na broj bakterija u zraku**

*In situ* dio istraživanja proveden je u sobi za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić u Sisku. Učinak ozona na ukupan broj bakterija u zraku sobe gdje su provedena ispitivanja prikazan je u **Tablici 24**.

Nakon tretmana plinovitim ozonom u koncentraciji od 25 ppm/1 sat izlaganja na sve tri lokacije uzorkovanja zraka došlo je do statistički značajnog smanjenja ( $p < 0,05$ ) ukupnog broja bakterija u zraku.

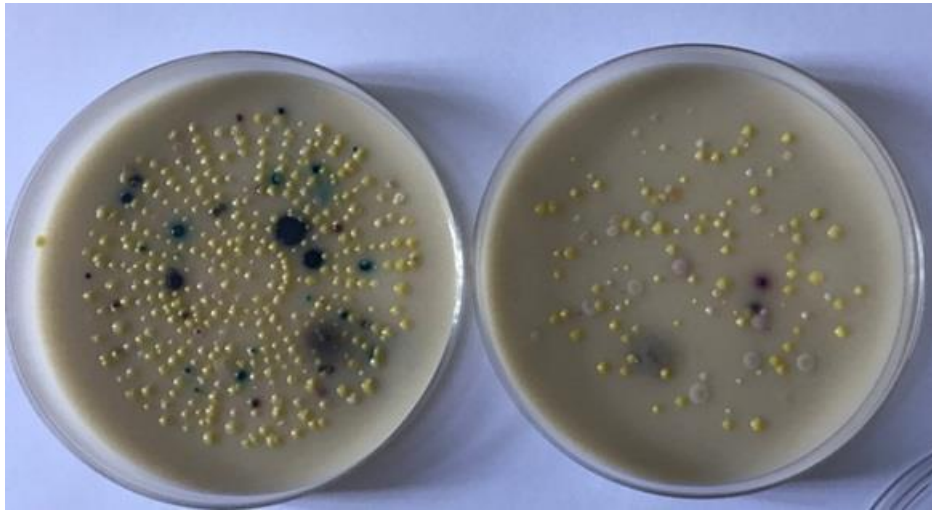
Najveće smanjenje ukupnog broja bakterija u zraku izmjereno je na lokaciji stola (86%), a najmanje na lokaciji prozorske daske (83%).

**Tablica 24.** Ukupni stvarni i statistički broj bakterija u zraku sobe za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak. Rezultati prikazani kao aritmetička sredina izmjerenog broja kolonija (CFU/250 L zraka) i statistički (vjerojatni) broj bakterija uz (Pr) prema Felleru uz standardnu devijaciju te 95% interval pouzdanosti (CI). Statistički značajna razlika  $p < 0,05$ , t-test.

		Aritmetička sredina (SD)	Inhibicija (%)	95% CI	$P^*$
<b>L1</b>					
CFU/250 L zraka	Kontrola	321,7 (15,04)	86	-296,9 do -243,0	<b>&lt;0,001</b>
	Tretman	51,67 (7,6)			
CFU/250 L zraka - korekcija Pr	Kontrola	655,3 (81,2)	92.	-803,3 do -397,4	<b>0,006</b>
	Tretman	55,0 (8,7)			
<b>L2</b>					
CFU/250 L zraka	Kontrola	212,3 (8,5)	83	-189,2 do -160,8	<b>&lt;0,001</b>
	Tretman	37,3 (2,5)			
CFU/250 L zraka - korekcija Pr	Kontrola	302,3 (18,03)	86.99	-308,2 do -217,8	<b>0,002</b>
	Tretman	39,3 (2,52)			
<b>L3</b>					
CFU/250 L zraka	Kontrola	264,3 (14,6)	84.29	-260,2 do -187,1	<b>0,001</b>
	Tretman	40,7 (2,1)			
CFU/250 L zraka - korekcija Pr	Kontrola	433,0 (42,5)	90.14	-496,2 do -284,4	<b>0,004</b>
	Tretman	42,7 (2,08)			

L1 - lokacija stol, L2 - lokacija prozorska daska, L3 uzorkovanja na ormaru, CI-interval pouzdanosti, CFU – ukupan broj kultivabilnih bakterija

Na **Slici 50.** prikazano je smanjenje ukupnog broja bakterija prije i nakon tretmana plinovitim ozonom u sobi za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak.



**Slika 50.** Ukupni broj bakterija u zraku sobe za postoperativni tretman prije (lijevo) i nakon (desno) tretmana plinovitim ozonom na lokaciji uzorkovanja “prozorska daska”, autorski rad

#### **4.11. *In situ* učinak plinovitog ozona na mikrobiološku čistoću prostora**

Osim učinka plinovitog ozona na ukupan broj bakterija u zraku, u sobi za postoperativni oporavak mjereno je i učinak plinovitog ozona na mikrobiološku čistoću prostora (**Tablica 25.**) izražen kao ukupan broj bakterija (CFU/cm<sup>2</sup>) te prisutnost enterobakterija.

Na svim ispitivanim lokacijama unutar sobe za postoperativni oporavak utvrđeno je značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) ukupnog broja bakterija nakon tretmana plinovitim ozonom u koncentraciji 8 ppm tijekom 1 sata izlaganja.

Najveće ukupnog broja bakterija nakon tretmana plinovitim ozonom uočeno je na lokaciji prozora (100%) i ormara 2 (96%).

Do najmanjeg smanjenja ukupnog broja bakterija na površinama došlo je na lokaciji radnog stola (54,92%).

**Tablica 25.** Mikrobiološka čistoća prostora u sobi za postoperativni tretman Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak. Rezultati prikazani kao medijan za enterobakterije, a za ukupan broj bakterija CFU/cm<sup>2</sup> kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju, postotak inhibicije, 95%tni interval pouzdanosti za kontrolu (prije tretmana) i tretman (plinoviti ozon). Statistička značajnost utvrđena t-testom,  $p < 0.05$

		Aritmetička sredina (SD)	Inhibicija (%)	95% CI	$P^{\dagger}$
<b>L1</b>					
CFU/cm <sup>2</sup>	Kontrola	227,0 (12,5)	54,92	-148,9 do -100,4	<b>&lt;0,001</b>
	Tretman	102,3 (8,5)			
Enterobakterije	Kontrola	0 (0 – 4)	-	-	-
	Tretman	0			
<b>L2</b>					
CFU/cm <sup>2</sup>	Kontrola	21,7 (4,2)	94	-27,4 do -13,2	<b>0,001</b>
	Tretman	1,33 (1,5)			
Enterobakterije	Kontrola	0	-	-	-
	Tretman	0			
<b>L3</b>					
CFU/cm <sup>2</sup>	Kontrola	25,0 (3,0)	96	-29,1 do -18,9	<b>&lt;0,001</b>
	Tretman	1,0 (1,0)			
Enterobakterije	Kontrola	0 (0 – 3)	-	-	-
	Tretman	0			
<b>L4</b>					
CFU/cm <sup>2</sup>	Kontrola	3,0 (1,0)	100	-	-
	Tretman	0			
Enterobakterije	Kontrola	0	-	-	-
	Tretman	0			
<b>L5</b>					
CFU/cm <sup>2</sup>	Kontrola	11,7 (3,5)	62,5	-13,5 do -0,5	<b>0,04</b>
	Tretman	4,7 (2,1)			
Enterobakterije	Kontrola	0 (0 – 2)	-	-	-
	Tretman	0			

L1 - lokacija radni stol, L2 - lokacija ormar 1, L3 - lokacija ormar 2, L4 - lokacija prozorska daska, L5 - lokacija telefonska slušalica, CFU – ukupan broj kultivabilnih bakterija, SD – standardna devijacija, CI – interval pouzdanosti

Prisutnost enterobakterija prije tretmana plinovitim ozonom utvrđena je na lokaciji radnog stola (4 CFU), ormara 2 (3 CFU) te telefonske slušalice (2 CFU).

Nakon tretmana ozonom prisutnost enterobakterija nije potvrđena niti na jednoj od ispitivanih lokacija unutar sobe.

#### **4.12. *In situ* učinak plinovitog ozona na ukupni broj kultivabilnih bakterija model organizama**

Učinak plinovitog ozona ispitivan je i na biofilmu referentnih sojeva odabranih model organizama (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*) uz veće opterećenje na keramici i polistirenu u sobi za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak u *in situ* dijelu istraživanja.

Plinoviti ozon u koncentraciji od 25 ppm tijekom 1 sata izlaganja uzrokovao je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje ukupnog broja kultivabilnih bakterija u biofilmu svih odabranih referentnih sojeva model organizama i na keramici i na polistirenu (**Tablica 26.**).

Log redukcija za model organizam *S. aureus* MRSA 43300 varirala je od 0,36 za biofilm stvoren na keramici i polistirenu, dok je *S. aureus* ATCC 29213 imao log redukciju od 0,47 za biofilm na keramici i 0,38 za biofilm na polistirenu.

Model organizam *K. pneumoniae* ATCC 700603 pokazuje log redukciju nakon tretmana plinovitim ozonom za 0,43 na keramici, a 0,31 na polistirenu, dok *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 pokazuje log redukciju od 0,5 na keramici, a 0,49 na polistirenu.

*A. baumannii* pokazuje svojstva blago veće osjetljivosti prema plinovitom ozonom i na keramici i polistirenu naspram *K. pneumoniae* i *S. aureus*. Log redukcija za *A. baumannii* ATCC BAA1605 je iznosila 0,57 za keramiku, a 0,43 za polistiren, dok je log redukcija za *A. baumannii* ATCC 19606 iznosila 0,54 za keramiku i 0,41 za polistiren.

Nezatno veća log redukcija uočena je kod biofilma model organizama na keramici naspram polistirena



**Tablica 26.** *In situ* učinak plinovitog ozona na biofilm standardnih sojeva model organizama *S. aureus*, *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na keramici i polistirenu uz manje organsko opterećenje. Rezultati izraženi kao aritmetička sredina  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> uz standardnu devijaciju,  $\log_{10}$ CFU/cm<sup>2</sup> redukciju, 95%tni raspon pouzdanosti. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana utvrđena te između pojedinog materijala po bakterijskom soju utvrđena t-testom,  $p < 0.05$ .

	Aritmetička sredina (SD) $\log_{10}$ CFU				$\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> redukcija	95% CI	<i>P</i> <sup>*</sup> (kontrola vs. tretman)
	Kontrola	<i>P</i> <sup>*</sup>	Tretman	<i>P</i> <sup>*</sup>			
<b>SA ATCC 29213</b>							
Keramika	5,57 (0,24)	<b>0,001</b>	5,10 (0,16)	<b>&lt;0,001</b>	0,47	-0,73 do -0,21	<b>0,002</b>
Polistiren	6,16 (0,06)		5,78 (0,17)		0,38	-0,56 do -0,20	<b>0,002</b>
<b>SA MRSA 43300</b>							
Keramika	5,95 (0,09)	<b>&lt;0,001</b>	5,59 (0,19)	<b>0,001</b>	0,36	-0,56 do -0,18	<b>0,002</b>
Polistiren	6,38 (0,04)		6,01 (0,11)		0,37	-0,49 do -0,25	<b>&lt;0,001</b>
<b>KPATCC 700603</b>							
Keramika	6,53 (0,20)	<b>0,002</b>	6,10 (0,16)	<b>&lt;0,001</b>	0,43	-0,66 do -0,19	<b>0,002</b>
Polistiren	7,21 (0,35)		6,90 (0,10)		0,31	-0,67 do 0,05	0,08
<b>KP OXA NCTC 13442</b>							
Keramika	6,84 (0,11)	<b>0,01</b>	6,35 (0,23)	<b>&lt;0,001</b>	0,49	-0,73 do -0,26	<b>0,001</b>
Polistiren	7,49 (0,45)		6,99 (0,07)		0,5	-0,98 do -0,01	0,05
<b>AB 1605</b>							
Keramika	7,70 (0,14)	<b>&lt;0,001</b>	7,13 (0,21)	<b>&lt;0,001</b>	0,57	-0,79 do -0,34	<b>&lt;0,001</b>
Polistiren	8,58 (0,25)		8,15 (0,16)		0,43	-0,70 do -0,15	<b>0,006</b>
<b>AB 19606</b>							
Keramika	7,61 (0,17)	<b>&lt;0,001</b>	7,07 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	0,54	-0,72 do -0,37	<b>&lt;0,001</b>
Polistiren	8,78 (0,12)		8,37 (0,31)		0,41	-0,72 do -0,10	<b>0,01</b>

SD – standardna devijacija, CI – interval pouzdanosti

## **5. RASPRAVA**



Uporaba različitih dostupnih metoda dezinfekcije kao osnovnih sredstava borbe protiv patogenih mikroorganizama znatno je napredovala tijekom 20. stoljeća, prateći tako tehnološki razvoj čovjeka [59,82,114,206]. No, kako je napredak u razvoju tehnologija i lijekova doveo do novih mogućnosti liječenja i kontrole infekcija dezinfekcijom, zlouporaba dostupnih antibiotika u liječenju ljudi izravno, ali u veterini, agrikulturi i stočarstvu neizravno je doprinijela razvoju višestruko otpornih mikroorganizama otpornih na dostupna antimikrobna sredstva [3].

Osim navedenog, često neprikladno i učestalo korištenje različitih kemijskih dezinfekcijskih sredstava, posebice u bolničkim sustavima, gdje se očekivano dezinfekcijska sredstva koriste u relativno većim količinama nego u općoj populaciji, neposredno je doprinijelo pojavi smanjene osjetljivosti ili čak otpornosti mikroorganizama na neka postojeća dezinfekcijska sredstva [59,82,114,128].

Nadalje, većina mikroorganizama, pa tako i višestruko otpornih ima sposobnost i gotovo biološku uvjetovanost rasti u biofilmu, zajednici mikroorganizama međusobno povezanih izvanstaničnom polimernom tvari, otpornoj na sušenje, djelovanje dezinficijensa i antimikrobnih lijekova [99–101,103,106].

Sve navedeno, uključujući pojavu višestruko otpornih mikroorganizama koji rastu na neživim površinama u formi biofilma, a koji mogu zbog samih intrinzičnih svojstava ili zbog forme biofilma pokazati smanjenu osjetljivost na pojedina dostupna dezinfekcijska sredstva, na često manjkavu primjenu lokalnih mjera kontrole infekcija doprinose traženju alternativnih izvora dezinfekcije, posebice automatskih dezinfekcijskih metoda [59,60,64,82,114].

Učinak plinovitog ozona na biofilm višestruko otpornih mikroorganizama je kroz literaturu relativno slabo proučavan stoga je u ovoj disertaciji glavni cilj bio ispitati učinak plinovitog ozona na biofilm višestruko otpornih mikroorganizama kao model organizama.

Odabrani su višestruko otporni mikroorganizmi kao model organizmi iz bolničkog sustava kao prostornog modela iz razloga ispitivanja i potencijalne praktične primjene plinovitog ozona kao alternativnog sredstva za provođenje automatske dezinfekcije kao mjere za prevenciju i kontrolu infekcija.

Istraživanje je provedeno u dva dijela, *in vitro* i *in situ* dio s biofilmom višestruko otpornih mikroorganizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* kao model organizmima.

Ispitivanja su rađena na mladom, 24-satnom biofilmu na keramici i polistirenu uz manje i veće organsko opterećenje kao supstrat za razvoj biofilma. Model organizmi (klinički) su odabrani po kriteriju za definiranje višestruko otpornih mikroorganizama te je za sve utvrđena otpornost na 3 ili više klasa antibiotika, što odgovara kriteriju za višestruku otpornost opisanu u literaturi [6]. Standarni sojevi su odabirani po kriteriju osjetljivijeg i otpornijeg.

Početna faza u stvaranju biofilma na određenom materijalu je sama adhezija mikroorganizma na materijal. Kod procesa adhezije, veliku ulogu imaju fizikalno – kemijske karakteristike površine mikroorganizma, hidrofobnosti, hidrofilnosti, kiselobaznih svojstava te elektron donorskih/elektron akceptorskih svojstava, ali i fizikalno – kemijska svojstva samog materijala na koji mikroorganizmi adheriraju, poput primjerice slobodne površinske energije, hrapavosti, hidrofobnosti, hidrofilnosti te kiselobaznih svojstava [207–212].

Kod procesa adheriranja, uvriježeno je mišljenje da “slično privlači slično”, tj. da će hidrofilni mikroorganizmi lakše adherirati na hidrofilne površine, kao i hidrofobni na hidrofobno [213]. Osim toga, svojstvo hidrofobnosti te slobodne površinske energije je u negativnoj korelaciji i uvriježeno je da će mikroorganizmi s većom hidrofobnosti imati veću sklonost adherirati na hidrofobne površine, tj. na površine s manjom površinskom slobodnom energijom [208].

Rezultati ispitivanja hidrofobnosti/hidrofilnosti model organizama korištenih u ovom istraživanju uporabom metode mikrobne adhezije prema otapalima ukazuju na činjenicu da su svi sojevi model organizma *K. pneumoniae* hidrofilni, sojevi *A. baumannii* hidrofilni do umjereno hidrofobni, dok su sojevi *S. aureus* umjereno hidrofobni, uz izuzetak sojeva MRSA 6, MRSA 27 i MRSA 28 koji pokazuju hidrofilna svojstva, što je u skladu s rezultatima koje navodi Zeraik i sur. i Nakanishi i sur. [211,214].

Faryina i sur. u svojoj studiji navode da su kiselo – bazna svojstva važan dio interakcije kod adhezije [213]. *K. pneumoniae* pokazuje nešto više kisela (elektron-akceptorska) svojstva od bazičnih (elektron-donorskih), slično kao i *A. baumannii*, dok *S. aureus* pokazuje snažna bazična (elektron – donorska svojstva), a iznimno slaba kisela (elektron – akceptorska) svojstva, što je u suprotnosti s Faryina i sur. gdje *S. aureus* primjerice ukazuje na snažna hidrofilna i elektron akceptorska svojstva [213].

Obzirom na površinska svojstva hidrofilnosti/hidrofobnosti keramike i polistirena utvrđene metodom mjerenja kontaktnog ugla utvrđeno je da je keramika hidrofilna i glatka, kao i polistiren, iako je polistiren malo hrapaviji od keramike. Opisano je suprotno navodima u kojima se polistiren opisuje kao inicijalno hidrofoban [215–217], iako se opisano može objasniti činjenicom da je polistiren korišten za kulture stanica, a koji je korišten u svrhu ovog istraživanja, tretiran različitim metodama kako bi se stvorio na površini negativan naboj i hidrofilne karakteristike, radi lakšeg vezanja proteina [215,217,218]. Glede kontaktnog ugla, keramika ima viši kontaktni ugao, tj. malo manju hidrofilnost te je za očekivati da će adhezija model organizama biti bolja na polistirenu naspram keramici, što je i utvrđeno [208]. Nadalje, hrapavost kao svojstvo površine na koju mikroorganizam adherira je također važna zbog

očekivanog olakšanog adheriranja na hrapave površine iz razloga što ulegnuća u površini povećavaju površinu za adheriranje i kolonizaciju [209,219], ali i pružaju zaštitu od vanjskog utjecaja.

Nakon što su utvrđene fizikalno-kemijske karakteristike hrapavosti hidrofilnosti i hidrofobnosti polistirena i keramike kao odabranih površina te hidrofilnost i hidrofobnost model organizama, ispitana je sposobnost stvaranja biofilma model organizama na odabranim površinama uz prisutnost manjeg i većeg organskog opterećenja kako bi prezentirali uvjete iz prakse (učinkovitije i manje učinkovito prethodno čišćenje površina).

Svi odabrani model organizmi su stvorili značajnu količinu biofilma i na keramici i na polistirenu, s time da je najveću količinu biofilma na keramici i polistirenu stvorio *A. baumannii* i kod manjeg i kod većeg organskog opterećenja uz statistički značajnu razliku između količine organskog opterećenja i materijala, zatim *K. pneumoniae*, također uz statistički značajnu razliku između obje vrste organskog opterećenja i materijala.

Kod model organizma *K. pneumoniae*, utvrđena je statistički značajna razlika u količini stvorenog biofilma između svih vrsta materijala i organskog opterećenja uz varijacije između pojedinačnih sojeva što je u skladu sa studijom Oleksy-Wawrzyniak i sur. [38] gdje su utvrđene intrinzične razlike između pojedinih sojeva *K. pneumoniae* u količini stvorenog biofilma pod različitim uvjetima.

Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma na keramici i polistirenu za model organizam *S. aureus* ispitivano je isključivo uz veće organsko opterećenje jer su prilikom uspostave modela svi sojevi *S. aureus* stvarali malu, varijabilnu količinu biofilma te su rezultati uz manje organsko opterećenje bili neponovljivi. Uz veće organsko opterećenje, svi sojevi *S. aureus* su stvorili biofilm na keramici i polistirenu, uz statistički značajnu razliku između materijala.

Glede razlike u količini stvorenog biofilma, odabranim materijalima za stvaranje biofilma i količine organskog opterećenja, kod većine odabranih sojeva model organizama veća količina biofilma je stvorena na polistirenu naspram keramike te je kod svih odabranih sojeva model organizama veća količina biofilma stvorena uz veće organsko opterećenje, što ide u prilog istraživanjima poput Zeraik i sur., Nakanishi i sur. i Zheng i sur. gdje se potvrđuje da količina stvorenog biofilma ovisi i o količini nutrijenata [211,214,220].

Navedeno je također slično istraživanju Salamandana i sur. [221], koji je ispitivao sposobnost stvaranja biofilma *S. aureus* na različitim materijalima (staklo, nehrđajući čelik polistiren), a gdje je najveću količinu biofilma *S. aureus* stvorio upravo na polistirenu.

Nadalje, Greene i sur. u studiji ispitivanja sposobnosti stvaranja biofilma *A. baumannii* na 6 različitih površina utvrdio je najveću količinu stvorenog biofilma također na polimernoj

površini [222], slično kao i Pour i sur. [223]. Navedeno se može objasniti činjenicom da je biofilm stvaran na tretiranom polistirenu, koji pogoduje boljoj adheziji [215,217].

Uspoređujući količinu stvorenog biofilma sva tri model organizma međusobno, utvrđena je statistički značajna razlika između *K. pneumoniae* i *A. baumannii* za keramiku i za polistiren kod manjeg organskog opterećenja, kao i statistički značajna razlika između *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na polistirenu uz veće organsko opterećenje. Kod većeg organskog opterećenja, utvrđena je statistički značajna razlika između količine stvorenog biofilma na keramici između *A. baumannii* naspram *S. aureus*.

Navedeno ide u prilog istraživanjima poput Zhang i sur., Nakanishi i sur., Barth i sur., Zeraik i sur. da na količinu stvorenog biofilma utječe vrsta materijala na kojemu se odvija adhezija zbog različitih fizikalno kemijskih karakteristika materijala i mikroorganizma, a koji utječu na sam proces adhezije poput hrapavosti, čvrstoće, topografske raspodjele bakterijskih stanica po površini, kemijskog gradijenta, površinske slobodne energije, hidrofilnosti i hidrofobnosti [211,214,220,224].

Osim navedenog, utvrđene razlike između pojedinih model organizama ukazuju i na intrinzične osobine svakog pojedinačnog organizma poput prisustva filmbija, pila, kapsule, deformacije membrane mikroorganizama, hidrofilnosti i hidrofobnosti, regulacije vezujućih proteina, stvaranja EPS-a koje uvelike utječu na interakciju površine i mikroorganizma, proces adhezije i posljedično stvaranje biofilma [214,225].

Jednom stvoreni biofilm na neživim površinama predstavlja rizik za križnu kontaminaciju i širenje infekcija, a predstavlja i izazov za uklanjanje trenutačno dostupnim metodama dekontaminacije prostora zbog toga što je otporan na isušivanje, otporniji je na djelovanje dezinfekcijskih sredstava, dugo preživljava u okolišu s manjkom nutrijenata te je otporniji na djelovanje antimikrobnih lijekova [100,102,103]. Zbog navedenog, a i samim napredovanjem tehnologije uvode se nove metode automatske dekontaminacije prostora poput korištenja plinovitog ozona [82,128,142].

Broj dostupnih istraživanja o učinku plinovitog ozona na biofilm višestruko otpornih mikroorganizama je relativno oskudan, stoga je jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bilo ispitati djelovanje plinovitog ozona kao potencijalnog sredstva za dezinfekciju površina kontaminiranih biofilmom odabranih sojeva *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* kao model organizama. Učinkovitost plinovitog ozona ispitivana je uporabom metode određivanja ukupnog broja kultivabilnih bakterija te uz pomoć dvije alternativne metode određivanja ukupne biomase i ukupnog broja vijabilnih bakterija – kristal violet bojenja i ATP bioluminiscencije.

Plinoviti ozon u koncentraciji od 25 ppm tijekom 1 sata izloženosti uzrokovao je statistički značajnu redukciju u ukupnom broju kultivabilnih bakterija svih odabranih sojeva *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na keramici i polistirenu uz manje i veće organsko opterećenje naspram kontrole, dok je kod model organizma *S. aureus* uzrokovao statistički značajnu redukciju ukupnog broja bakterija svih sojeva na keramici i polistirenu uz veće organsko opterećenje.

Uporabom kristal violet bojenja kao alternativne metode za utvrđivanje ukupne biomase nakon korištenja plinovitog ozona utvrđena je statistički značajna redukcija u ukupnoj biomasi kod svih odabranih sojeva model organizma *K. pneumoniae*, *A. baumannii* na keramici i na polistirenu uz obje količine organskog opterećenja u usporedbi s kontrolom, kao i kod *S. aureus* na keramici i polistirenu uz veće organsko opterećenje.

Metoda ATP bioluminiscencije je također korištena kao dopunska, alternativna metoda za utvrđivanje ukupnog broja vijabilnih bakterija u biofilmu model organizama unatoč činjenici da je neprecizna te da se ATP detektira i u organskoj tvari [76,82,226,227]. Metoda je korištena upravo i zbog činjenice što pruža podatke o ukupnom broju vijabilnih bakterija te zasićenju površine biomasom, što se može smatrati svojevrsnim indikatorom kriterija čistoće .

Kao i u prethodnim slučajevima, utvrđena statistički značajna razlika u redukciji ukupne biomase i broja vijabilnih bakterija nakon korištenja plinovitog ozona za sve odabrane sojeve *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na keramici i na polistirenu, uz manje i veće organsko opterećenje, te statistički značajna razlika u redukciji ukupne biomase kod svih sojeva *S. aureus* na keramici i polistirenu uz veće organsko opterećenje. Kod svih odabranih sojeva sva tri model organizma utvrđene su međusobne statistički značajne razlike u redukciji ukupnog broja bakterija i ukupne biomase ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja. Najveća redukcija nakon tretmana plinovitim ozonom kod svih model organizama izražena kao postotak inhibicije je uočena kod metode određivanja ukupnog broja kultivabilnih bakterija, zatim kod ATP-bioluminiscencije. Najmanji postotak inhibicije je uočen kod metode kristal violet bojenja.

Uočene razlike u postotku inhibicije se mogu objasniti različitom osjetljivošću korištenih metoda detekcije, obzirom na činjenicu da metoda određivanja ukupnog broja kultivabilnih bakterija putem brojanja kolonija uključuje samo žive bakterije, ne i stanični otpad, dok metode poput kristal violet bojenja i ATP bioluminiscencije uključuju kvantifikaciju živih i mrtvih stanica, EPS-a i druge organske tvari na površini [76,226,227,229–232]. Osim navedenog, manja inhibicija ukupne biomase korištenjem kristal violet bojenja se može objasniti i činjenicom da je oksidativno djelovanje ozona na bakterije u biofilmu moglo uzrokovati

prelazak iz kultivabilnog u vijabilno nekultivabilno (*eng., viable but nonculturable, VBNC*) stanje [229,231].

Unatoč činjenici da je nakon tretmana ozonom u koncentraciji od 25 ppm tijekom 1 sata izlaganja došlo do statistički značajne redukcije u ukupnom broju kultivabilnih, vijabilnih bakterija i ukupnoj biomasi svih odabranih model organizama na obje vrste materijala i organskog opterećenja, plinoviti ozon nije u potpunosti eradicao biofilm *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* s keramike i polistirena.

Slične nalaze opisuje i Bialoszewski i sur. koji opisuje biocidni učinak ozona na biofilm *S. aureus* i *P. aeruginosa*, međutim ne i potpunu eradikaciju [191]. Odsustvo potpunog uništenja biofilma nakon djelovanja plinovitog ozona opisuje i Kovac i sur. na *E. coli*, Panebianco i sur. na *L. monocytogenes*, Marino i sur. na *S. aureus.*, Boch i sur. na *E. faecalis*, Nicholas i sur. na *L. monocytogenes*, Harada i sur. na *B. cereus* i *L. monocytogenes* te De Candia i sur. na *L. monocytogenes* [143,188,189,192,197,198,233]. Navedeno je u suprotnosti sa istraživanjem provedenim od strane Ibanez- Cervantes i sur. koji opisuje redukciju od 7  $\log_{10}\text{CFU}^2$  nakon tretmana ozonom od 22,4 ppm tijekom 15 minuta izloženosti te Pajak – Zajac i sur. gdje je opisana redukcija veća od 6  $\log_{10}\text{CFU}^2$  na biofilmu *P. aeruginosa* na polimernom materijalu [199]. Opisano se može objasniti uvođenjem povećane vlažnosti zraka prilikom izvođenja ozonizacije, što poboljšava učinak ozona [93,159,234] te izrazito visokoj koncentraciji ozona korištenoj u istraživanju Pajak – Zajac i sur.

Nadalje, brojna su istraživanja provedena na planktonskim oblicima bakterija pokazala rezultate ograničene biocidne učinkovitosti plinovitog ozona, iako je u navedenim istraživanjima koncentracija ozona znatno varirala [73,78,151,155,162,165,166,169,171,172], s naglaskom da je veća koncentracija ozona ili duže vrijeme izloženosti značilo i veću inaktivaciju [93,160,174,175,189]. Primjerice, Sharma i sur. je ispitivao učinak plinovitog ozona u koncentraciji 25 ppm tijekom 20 minuta izlaganja tijekom kojeg je uočena redukcija od 3  $\log_{10}\text{CFU}^2$  za MRSA, 4  $\log_{10}\text{CFU}^2$  za *K. pneumoniae* i *A. baumannii*. Suprotno navedenom, pojedine studije navode kompletnu inaktivaciju planktonskih oblika bakterija [93,161,166,173,235].

Korištenjem metoda vizualizacije biofilma, poput atomske mikroskopije i digitalne mikroskopije potvrđeno je da struktura materijala igra ulogu u učinkovitosti plinovitog ozona kao dezinfekcijskog/dekontaminacijskog sredstva iz razloga što su bakterijske stanice model organizama zaostajale u udubljenjima na površini keramičkih pločica, čineći ih tako manje dostupnima djelovanju ozona, ali isto tako otežavajući procese mehaničkog čišćenja, što je prethodno potvrđeno studijama poput Megahed i sur. [175]. Upravo zbog navedenog, odabir

materijala koji otežava adheziju mikroorganizama, olakšava aplikaciju dezinficijensa i mehaničkog čišćenja bi trebao biti važan čimbenik i standard u prevenciji i kontroli infekcija [59,82,127,236–238].

Od sva tri model organizma, najosjetljiviji na djelovanje ozona se pokazao *A. baumannii*, dok se *S. aureus* pokazao najotpornijim, što je u skladu sa istraživanjem Sharma i sur. gdje se MRSA pokazao manje osjetljivim na djelovanje plinovitog ozona naspram *K. pneumoniae* i *A. baumannii* [159]. Navedeno se može objasniti intrinzičnim osobinama *S. aureus* koji posjeduje niz mehanizama za odgovor na endogeno i egzogeno uvjetovani oksidativni stres, poput enzima superoksid dismutaze, katalaze, peroksiredoksina koji sinergistički s mehanizmima za popravak regulira utjecaj oksidativnog stresa [24]. Iako postoje istraživanja poput Moore G. [235] koja navode da je ozon učinkovitiji na Gram-pozitivne bakterije nego na Gram-negativne bakterije, navedeno je suprotno uvriježenom mišljenju da su Gram-negativne bakterije općenito otpornije na djelovanje dezinfekcijskih sredstava od Gram-pozitivnih zbog strukture stanične stijenke, prisustva efluks-pumpi te niza drugih karakteristika [239–242].

Unatoč razlikama između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija obzirom na otpornost prema dezinficijensima, *S. aureus* pokazuje statistički značajnu razliku u redukciji ukupnog broja kultivabilnih bakterija nakon djelovanja plinovitog ozona.

Iako većina istraživanja opisuje oksidativni stres kao glavni mehanizam biocidnog učinka ozona posebice na planktonske oblike mikroorganizama [141,160,161,171,175,176], još je uvijek dosta nepoznanica oko točnog mehanizma djelovanja plinovitog ozona na biofilm [194]. Stanje oksidativnog stresa se može definirati kao disbalans u ravnoteži između prooksidansa i antioksidansa u korist povećane koncentracije prooksidansa, rezultirajući tako stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta koje posljedično uzrokuju oštećenja na staničnoj membrani, nukleinskim kiselinama i slično [73,180].

Ispitivanjem razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) prije i nakon tretmana plinovitim ozonom na polisitrenu utvrđeno je da nakon tretmana plinovitim ozonom dolazi do statistički značajnog porasta u razini reaktivnih kisikovih vrsta za model organizme *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*, ukazujući na činjenicu da su zaostale bakterije nakon tretmana plinovitim ozonom u stanju oksidativnog stresa. Navedeno potvrđuje prethodna istraživanja poput Rangel i sur., Patil i sur., Giuliani i sur. [73,171,176] koja ukazuju na snažni oksidacijski učinak plinovitog ozona. Osim toga, stanje oksidativnog stresa u biofilmu prema autorima poput Gambino i sur.; Mao i sur. i Ionescu i sur. može dovesti do prekomjerne produkcije EPS-a [180,243,244], stvarajući dodatni sloj zaštite preko zaostalih mikroorganizama. Autori poput Panebianco i sur. i Miranda i sur. navode smanjenje EPS-a uslijed akumulacije ROS-a u

ekstracelularnom matriksu [188,194].

Nakon tretmana plinovitim ozonom, uočeno je statistički značajno smanjenje ukupne biomase za sve sojeve *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na odabranim materijalima uz različita organska opterećenja ukazujući na smanjenje EPS-a uslijed strukturnih promjena u matriksu [187,194].

Učinak plinovitog ozona na topologiju biofilma reprezentativnog soja model organizama utvrđen je putem mikroskopije atomskih sila i digitalne mikroskopije. Nakon djelovanja plinovitog ozona na biofilm model organizma uočene su promjene u topologiji biofilma na način da su vidljive agregacije stanica uz prisustvo praznih prostora na površinama kojima dominira odsustvo bakterijskih stanica. Također su uočene i promjene u trodimenzionalnoj strukturi biofilma te su uočene varijacije u distribuciji vrhova na način da je nakon tretmana plinovitim ozonom uočeno smanjenje vrhova biofilma.

Promjene topologije i trodimenzionalne strukture biofilma na reprezentativnom soju model organizama i vizualno potvrđuje prethodne nalaze ovog istraživanja, a obzirom na činjenicu da je plinoviti ozon uzrokovao redukciju ukupnog broja bakterija u rasponu od 0,96  $\log_{10}\text{CFUcm}^2$  do 3,99  $\log_{10}\text{CFUcm}^2$  te da je nakon njegove uporabe zaostalo biomase na površini. Navedeno još jednom potvrđuje studije od Kovac i sur., Bialoszewski i sur., Panebianco i sur. te Nicholas i sur. [75,188,191,197] u kojima plinoviti ozon ima ograničeno biocidno djelovanje na bakterijski biofilm.

Detaljnije morfološke promjene na biofilmu i pojedinačnim stanicama reprezentativnih sojeva model organizama su promatrane korištenjem skenirajuće pretražne mikroskopije. Reprezentativni sojevi model organizama su korišteni iz razloga ekonomičnosti, ali i činjenice da je metoda iznimno zahtjevno primjenjiva na keramici (otežana primjena skenirajućih igala i učestalo kvarenje). Plinoviti ozon uzrokuje vrlo slične morfološke promjene na staničnoj stijenci reprezentativnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*. Nakon tretmana plinovitim ozonom uočene su promjene na staničnoj stijenci u obliku ulegnuća membrane. Puknuća stanične membrane se uočava kod *S. aureus*. Slične rezultate opisuje i Rangel i sur. u studiji na *A. baumannii*, *P. aeruginosa* i *E. coli* gdje uočava protruzije membrane i ulegnuća nakon tretmana plinovitiom ozonom [73] te Nicholas i sur. na biofilmu *L. monocytogenes* [198] i Epelle i sur. na *E. coli* i *P. aeruginosa* [170].

Biocidni učinak plinoviti ozon ostvaruje prvenstveno djelovanjem na staničnu stijenkmu mikroorganizma [142,147,156,171,178], dok je jedan od predloženih mehanizama djelovanja liza stanice, koja ovisi o jačini oksidacije [73,181,245].



Imajući na umu prethodno navedeno, integritet i permeabilnost stanične membrane su važni elementi za određivanje vijabilnosti stanice [246] izložene utjecaju snažnog oksidativnog sredstva poput ozona. Za utvrđivanje vijabilnosti stanica obzirom na permeabilnost stanične membrane odabranih reprezentativnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* korištena je metoda Dead Live bojenja.

Nakon tretmana plinovitim ozonom došlo je do vidljivog smanjenja nakupina živih bakterijskih stanica (zelena boja) te do povećanja nakupina mrtvih bakterijskih stanica (crvena boja). Mjerenjem intenziteta fluorescencije utvrđen je statistički značajan porast intenziteta crvene boje nakon tretmana plinovitim ozonom ukazujući na biocidni učinak ozona. Navedeno ukazuje da plinoviti ozon oksidacijski učinak ostvaruje djelovanjem na staničnu membranu, uzrokujući promjene permeabilnost što posljedično dovodi i do smrti stanice. Slične rezultate potvrđuje i Rangel i. sur. na *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii* [73] te Nagayoshi i sur. [247].

Osim utjecaja neživih površina kontaminiranih MDR patogenima na prevenciju i kontrolu infekcija, zrak kao medij također može imati ulogu u prijenosu mikroorganizama [88,248–250]. Iako je učinak plinovitog ozona na mikroorganizme ispitivan u *in vitro* uvjetima, podaci o učinku ozona na mikroorganizme u zraku su relativno slabo dostupni [150,151].

U novije vrijeme pandemija SARS-CoV-2 virusa je potencirala istraživanja o biocidnom učinku ozona za dezinfekciju prostora [152,153], stoga je zbog utvrđivanja cjelovitog biocidnog potencijala plinovitog ozona u praksi ispitivan je i učinak plinovitog ozona *in situ*.

*In situ* dio istraživanja proveden je u sobi za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić u Sisku gdje je praćen učinak plinovitog ozona na ukupan broj bakterija u zraku, učinak na mikrobiološku čistoću prostora te učinak na ukupan broj kultivabilnih stanica u biofilmu referentnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*.

Nakon tretmana plinovitim ozonom u koncentraciji od 25 ppm tijekom 1 sata izlaganja došlo je do redukcije ukupnog broja bakterija u zraku sobe za postoperativni oporavak, što se podudara s rezultatima istraživanja provedenim od strane Moccia i sur. [151], a što je suprotno istraživanju Le Hoang Tu i sur. gdje je uočena potpuna inhibicija [168]. Iako je ukupno smanjenje broja bakterija u zraku neznatno variralo ovisno o mjestu uzorkovanja, na svim lokacijama uzorkovanja (n=3) je došlo do statistički značajnog smanjenja ukupnog broja bakterija.

Također, plinoviti ozon je uzrokovao statistički značajno smanjenje ukupnog broja bakterija sa svih uzorkovanih neživih površina (n=5) u sobi za postoperativni oporavak te

potpuno odsustvo enterobakterija nakon tretmana, iako su varijacije u ukupnom smanjenju varirale ovisno o lokaciji uzorkovanja.

Navedene varijacije u ukupnom smanjenju broja mikroorganizama se mogu objasniti kinetikom ozona u prostoru te nejednakom distribucijom, a koja je potrebna za ujednačeni biocidni učinak [182,251].

Osim navedenog, plinoviti ozon je *in situ* uzrokovao redukciju ukupnog broja bakterija u biofilmu referentnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na keramici i na polistirenu. Iako je smanjenje ukupnog broja bakterija nakon tretmana plinovitim ozonom bilo statistički značajno u većini slučajeva u usporedbi s kontrolnom skupinom, redukcija je varirala od 0,31 log<sub>10</sub>CFU<sup>2</sup> do 0,57 log<sub>10</sub>CFU<sup>2</sup>, što je značajno manje u usporedbi s redukcijama uočenim u *in vitro* istraživanju. Opisano se može obrazložiti većom zapreminom sobe, različitom kinetikom plina, različitom vlažnosti zraka te prisustvom veće količine raznih materijala, kao i prisustva zaostale organske tvari u sobi s kojima je ozon mogao reagirati [188,194,252].

Iako je plinoviti ozon u koncentracijama od 25 ppm tijekom sat vremena izlaganja uzrokovao statistički značajnu redukciju ukupnog broja kultivabilnih, vijabilnih bakterija i ukupne biomase model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* nije u potpunosti eradikirao biofilm s keramike i polistirena. Opisano potvrđuje iznimnu sposobnost biofilma da odolijeva nepovoljnim okolišnim uvjetima te da pokazuje osobine povećane otpornosti na dezinfekciju, posebice dezinfekciju uz pomoć jedne vrste biocidne aktivne tvari [63,74,80,101,102,111].

Kombinirana uporaba dvije ili više biocidnih aktivnih tvari može dovesti do jačeg antimikrobnog učinka, rezultirajući korištenjem manjih doza pojedinačnih biocida [172,253] što rezultira boljim učinkom na okoliš. Postoje brojna istraživanja koja navode kombiniranu uporabu nekoliko vrsta biocidnih aktivnih tvari za bolji antibiofilm učinak [172,179,201,254,255] Osim toga, velika količina zaostale biomase na keramici i polistirenu ukazuje na nužnost mehaničkog čišćenja koje mora prethoditi svakom postupku dezinfekcije, neovisno o dezinfekcijskog sredstva [82,128].

Naposlijetku, prilikom ocjenjivanja učinkovitosti plinovitog ozona na biofilm odabranih model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* treba uzeti u obzir cjeloviti pristup te sagledati ne samo biocidni potencijal plinovitog ozona, nego i način primjene, praktičnost primjene, cijenu nabavke, toksični učinak na čovjeka i okoliš, tj. sve pozitivne i negativne načine primjene. Svakako je jedna od pozitivnih strani korištenju plinovitog ozona upravo način i praktičnost primjene, budući da plin ima fluidna svojstva te može doprijeti do površina koje

je inače teško mehanički očistiti i dezinficirati klasičnim tekućim dezinficijensom [77]. Osim toga, može se primjenjivati za trenutačnu dezinfekciju velikih prostora u kojima je učestali obrtaj ljudi [256]. Plinoviti ozon je jeftin za primjenu budući da se može generirati iz zraka putem prenosivog mobilnog generatora ozona. Smatra se ekološki prihvatljivim sredstvom za dezinfekciju budući da se raspada na kisik te ne stvara toksične rezidue, ali isto tako ni otpad od zaostale ambalaže [78,112,142,159].

Bolnički sustavi, tijekom rutinskog rada, a posebice u vrijeme epidemija ili pandemije koriste velike količine dezinfekcijskih sredstava u prevenciji i kontroli infekcija te se smatra da ukupno 3% medicinskog otpada sačinjava otpad od korištenih kemikalija [257], što posljedično predstavlja problem za manipulaciju i odlaganjem.

Upravo zbog sve većih problema s klimatskim promjenama, odlaganjem otpada i uporabom toksičnih kemikalija, Europska Komisija je izdala Kemijsku strategiju za održivost, strateški dokument koji proizlazi iz Zelenog plana Europske unije i dio europskog puta prema ostvarenju prvog klimatski neutralnog kontinenta do 2050. Navedena Strategija predstavlja okvire za temeljitu transformaciju postojećeg zakonodavstva o kemikalijama te propagira prelazak na manje toksične kemikalije i potiče inovativni pristup [137].

Od negativnih strana korištenja plinovitog ozona ističe se neugodan miris te njegova toksičnost za ljude uz postojanje granice izloženosti na radnom mjestu, koja je u Republici Hrvatskoj propisana Pravilnikom o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima ("Narodne novine", br. 91/18) [157] i iznosi 0,2 ppm. Osim toga, postojeća legislativa u Republici Hrvatskoj ograničava korištenje plinovitih dezinficijenasa isključivo na ovlaštene tvrtke i educirano osoblje [258]. Ozon je izrazito osjetljiv na organsku tvar, stoga njegovoj uporabi mora prethoditi čišćenje, kako se ne bi smanjivala njegova učinkovitost [170,233].

Nadalje, ukoliko bi se ocjenjivala učinkovitost plinovitog ozona prema trenutačno važećim Europskim standardima EN13272 za određivanje učinkovitosti biocidnih aktivnih tvari izdanom po Europskom odboru za standardizaciju, plinoviti ozon se ne bi mogao okarakterizirati kao učinkovit, budući da se biocidi koji pokazuju redukciju veću od  $5 \log_{10} \text{CFUcm}^2$  smatraju učinkovitima, ali uz ispitivanja provedena na planktonskim oblicima bakterija [259]. Upravo manjkavost trenutačnih standarda za ocjenjivanje biocidne učinkovitosti obzirom na nedostatak ispitivanja na bakterijskom biofilmu ide u prilog ovakvim istraživanjima.

Zaključno, plinoviti ozon u koncentraciji od 25 ppm tijekom sat vremena izlaganja uzrokuje statistički značajno smanjenje ukupnog broja kultivabilnih i vijabilnih bakterija te ukupne biomase biofilma *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na keramici i polistirenu, međutim uz odsustvo eradikacije. Za bolji antibiofilm učinak se preporuča prethodno intenzivno mehaničko čišćenje uz uporabu klasičnih deterdženata te dezinfekciju uz dvije ili više biocidne aktivne tvari.

## **6. ZAKLJUČCI**

- U ovom radu se prvi put ispituje učinak plinovitog ozona na biofilm višestruko otpornih model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na keramici i polistirenu uz prisutnost manjeg i većeg organskog opterećenja
- Svi odabrani višestruko otporni model organizmi *K. pneumoniae* i *A. baumannii* stvaraju statistički značajnu količinu biofilma na keramici i polistirenu uz prisutnost manjeg i većeg organskog opterećenja
- Svi odabrani višestruko otporni model organizmi *S. aureus* stvaraju statistički značajnu količinu biofilma na keramici i polistirenu uz prisutnost većeg organskog opterećenja
- Utvrđene su razlike u fizikalno – kemijskim karakteristikama odabranih model organizama na način da sojevi *K. pneumoniae* i *A. baumannii* pokazuju pretežito hidrofilna i kisela svojstva, dok sojevi *S. aureus* pokazuju pretežito hidrofobna i bazična svojstva
- Oba materijala odabrana za stvaranje biofilma (keramika i polistiren) su pokazala hidrofilna svojstva i glatku površinu
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja kultivabilnih bakterija u biofilmu za sve odabrane sojeve model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* na keramici i polistirenu uz prisustvo manjeg i većeg organskog opterećenja
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja kultivabilnih bakterija u biofilmu za sve odabrane sojeve model organizma *S. aureus* na keramici i polistirenu uz prisustvo većeg organskog opterećenja
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupne biomase utvrđene kristal violet bojenjem za sve odabrane sojeve model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* na keramici i polistirenu uz prisustvo manjeg i većeg organskog opterećenja
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupne biomase utvrđene kristal violet bojenjem za sve odabrane sojeve model organizama *S. aureus* na keramici i polistirenu uz prisustvo većeg organskog opterećenja

- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja vijabilnih bakterija utvrđeno ATP bioluminiscencijom za sve odabrane sojeve model organizma *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na keramici uz prisustvo manjeg i većeg organskog opterećenja
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja vijabilnih bakterija utvrđeno ATP bioluminiscencijom za sve odabrane sojeve model organizma *S. aureus* na keramici uz prisustvo većeg organskog opterećenja
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje statistički značajan porast reaktivnih kisikovih vrsti (ROS) u svim odabranim sojevima model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje promjene u topologiji i trodimenzionalnoj strukturi biofilma na način da uzrokuje kavitacije u biofilmu, agregacije stanica i prostore bez prisutnosti stanica
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje morfološke promjene u staničnoj stijenci odabranih reprezentativnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na način da stvara ulegnuća i invaginacije te rupture kod *S. aureus*
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti od 1 sat uzrokuje uzrokuje promjene u permeabilnosti stanične membrane odabranih reprezentativnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus*
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti 1 sat uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja bakterija u zraku sobe za postoperativni oporavak ~~Opće bolnice dr. Ivo Pedišić u Sisku~~
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti 1 sat uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja bakterija na neživim površinama sobe za postoperativni operavak ~~Opće bolnice dr. Ivo Pedišić u Sisku~~
- Plinoviti ozon u ciljnoj koncentraciji od 25 ppm i vremenu izloženosti 1 sat uzrokuje statistički značajnu redukciju ukupnog broja kultivabilnih bakterija odabranih

referentnih sojeva model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na keramici i polistirenu

- Plinoviti ozon uzrokuje značajnu redukciju ukupnog broja kultivabilnih i vijabilnih bakterija te ukupne biomase, međutim kao samostalno dezinfekcijsko sredstvo ne uklanja u potpunosti biofilm odabranih višestruko otpornih model organizama *K. pneumoniae*, *A. baumannii* i *S. aureus* na keramici i polistirenu
- Za potpuno uklanjanje biofilma preporuča se obvezno mehaničko čišćenje neživih površina sa deterdžentima uz kombiniranu uporabu dva ili više dezinfekcijska sredstava



## **7. LITERATURA**

1. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013.;11:297–308.
2. Abram M, Škrobonja ,I Ambrožić D, Repac-Antić D, Bubonja -Šonje M. ESKAPE – bacteria that alert the world. *Med Flum.* 2018.;54:242–53.
3. Damani N. Priručnik o prevenciji i kontroli infekcija. 4. Medicinska naklada; 2019.
4. Elekhrawy EA, Sonbol FI, Elbanna TE, Abdelaziz AA. Evaluation of the impact of adaptation of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to benzalkonium chloride on biofilm formation. *Egypt J Med Hum Genet.* 2021.;22.
5. Bubonja-Šonje M, Abram M. Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Med Flum.* 2014.;50:128–49.
6. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB i sur. Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. 2011.;
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i sur. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect [Internet].* 2012.;18:268–81.  
Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
8. Köhler AT, Rodloff AC, Labahn M, Reinhardt M, Truyen U, Speck S. Evaluation of disinfectant efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods. *Am J Infect Control.* 2019.;47:1181–7.
9. Hu H, Johani K, Gosbell IB i sur. Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: Combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. *J Hosp Infect.* 2015.;91:35–44.
10. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol.* 2019.;10.
11. Meade E, Slattery MA, Garvey M. Biocidal resistance in clinically relevant microbial species: A major public health risk. *Pathogens.* 2021.;10:1–14.
12. Reichel M, Schlicht A, Ostermeyer C, Kampf G. Efficacy of surface disinfectant cleaners

- against emerging highly resistant gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.* 2014.;14:1–8.
13. Wisplinghoff H, Schmitt R, Wöhrmann A, Stefanik D, Seifert H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect.* 2007.;66:174–81.
  14. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS i sur. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009.;48:1–12.
  15. Ayobami O. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries : a systematic review and meta-analysis. 2022.;11.
  16. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ i sur. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020.;33:1–49.
  17. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018.;31:1–103.
  18. French GL, Otter JA, Shannon KP, Adams NMT, Watling D, Parks MJ. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect.* 2004.;57:31–7.
  19. Perla Filippini CR. Methicillin Resistance, Biofilm Formation and Resistance to Benzalkonium Chloride in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Clin Microbiol Open Access.* 2012.;02.
  20. Temiz M, Duran N, Duran GG, Eryilmaz N, Jenedi K. Relationship between the resistance genes to quaternary ammonium compounds and antibiotic resistance in staphylococci isolated from surgical site infections. *Med Sci Monit.* 2014.;20:544–50.
  21. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem.* 2015.;84:577–601.
  22. Lee AS, De Lencastre H, Garau J i sur. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018.;4:1–23. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
  23. Otto M. MRSA virulence and spread. *Bone.* 2008.;23:1–7.
  24. Gaupp R, Ledala N, Somerville GA. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012.;2:33.

25. Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS, Zhang D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Front Microbiol.* 2021.;12:1–9.
26. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae.* 2016.;9:1071–81.
27. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016.;80:629–61.
28. Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagensen JAJ, Forestier C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ Microbiol.* 2008.;10:685–701.
29. Montgomerie JZ. Epidemiology of *klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infect Dis.* 1979.;1:736.
30. Öztürk A, Güzel ÖT, Abdulmajed O i sur. Evaluation of the Bactericidal Activity of Some Disinfectant Agents against Carbapenem - Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Int J Environ Health Eng.* 2020.;9:1–6.
31. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1998. [citirano 12. studeni 2021.];11:589–603. Preuzeto od: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9767057/>
32. Ni L, Zhang Z, Shen R i sur. Disinfection Strategies for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Healthcare Facility. *Antibiotics.* 2022.;11:1–14.
33. Munoz-Price S, Poirel L, Bonomo R i sur. Epidemiología clínica de la expansión global de las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis.* 2013.;13(9):785–96.
34. Spyridopoulou K, Psychogiou M, Sypsa V i sur. Containing Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an endemic setting. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020.;9:1–9.
35. Bolourchi N, Shahcheraghi F, Giske CG i sur. Comparative genome analysis of colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated from two Iranian hospitals. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2021.;20:1–11. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00479-y>

36. Cuccaro, C; Tarroni, M; Tinturini, A i sur. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: don't trust your neighbour. 2020.;759–60.
37. Moya C, Maicas S. Antimicrobial Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains: Mechanisms and Outbreaks. 2020.;11.
38. Oleksy-Wawrzyniak M, Junka A, Brożyna M i sur. The In Vitro Ability of *Klebsiella pneumoniae* to Form Biofilm and the Potential of Various Compounds to Eradicate It from Urinary Catheters. *Pathogens*. 2022.;11.
39. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012.;3:5.
40. Edwards J, Patel G, Wareham DW. Low concentrations of commercial alcohol hand rubs facilitate growth of and secretion of extracellular proteins by multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol*. 2007.;56:1595–9.
41. Bergogne-Bé E, Zin RÉ, Towner KJ. *Acinetobacter* ssp. as nosocomial Pathogens. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1996.;9:148–65. Preuzeto od: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172888/pdf/090148.pdf>
42. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* [Internet]. 2009.;73:355–63. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>
43. Martró E, Hernández A, Ariza J i sur. Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect*. 2003.;55:39–46.
44. Lanjri S, Uwingabiye J, Frikh M i sur. In vitro evaluation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to antiseptics and disinfectants: Comparison between clinical and environmental isolates. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017.;6:1–7.
45. Kawamura-Sato K, Wachino JI, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *J Antimicrob Chemother*. 2010.;65:1975–83.
46. Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect*. 2012.;80:56–60.
47. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili

- assembly system. *Microbiology*. 2003.;149:3473–84.
48. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Biocide-tolerant multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. *J Hosp Infect*. 2009.;73:287–9.
49. Nor A'shimi MH, Alattraqchi AG, Mohd Rani F i sur. Biocide susceptibilities and biofilm-forming capacities of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Malaysia. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2019. str. 626–33.
50. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006.;6:1–8.
51. Liu WL, Liang HW, Lee MF i sur. The impact of inadequate terminal disinfection on an outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *PLoS One*. 2014.;9.
52. Soares NC, Cabral MP, Gayoso C i sur. Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress. *J Proteome Res*. 2010.;9:1951–64.
53. Qi L, Li H, Zhang C i sur. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2016.;7:1–10.
54. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol*. 1998.;36:1938–41.
55. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*. 2021.;10:1–31.
56. Gaddy A. Jennifer; Actis A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Mol Cell Biochem*. 2012.;23:1–7.
57. Talon D. The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. *J Hosp Infect*. 1999.;43:13–7.
58. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect*. 2007.;65:50–4.
59. Boyce JM. Modern technologies for improving cleaning and disinfection of

- environmental surfaces in hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2016.;5:1–10. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-016-0111-x>
60. Weber DJ, Kanamori H, Rutala WA. „No touch“ technologies for environmental decontamination: Focus on ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems. *Curr Opin Infect Dis*. 2016.;29:424–31.
61. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection and sterilization in healthcare facilities. Bennett Brachman’s *Hosp Infect* Sixth Ed. 2013.;
62. Mody L, Washer LL, Kaye KS i sur. Multidrug-resistant Organisms in Hospitals: What Is on Patient Hands and in Their Rooms? *Clin Infect Dis*. 2019.;69:1837–44.
63. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2008.;57:966–73.
64. Abreu AC, Tavares RR, Borges A, Mergulhão F, Simões M. Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. *J Antimicrob Chemother*. 2013.;68:2718–32.
65. Caini S, Hajdu A, Kurcz A, Böröcz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005-2010. *Eurosurveillance*. 2013.;18:2005–10.
66. Babady E. Hospital-Associated Infections. *Microbiol Spectr*. 2017.;45–53.
67. Rutala WA, Weber DJ. Surface disinfection: Should we do it? *J Hosp Infect*. 2001.;48:64–8.
68. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection, sterilization, and antiseptics: An overview [Internet]. *Am. J. Infect. Control*. Elsevier Inc.; 2019. str. A3–9. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.01.018>
69. Blanco N, O’hara LM, Harris AD. Transmission pathways of multidrug-resistant organisms in the hospital setting: A scoping review. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2019.;40:447–56.
70. Rutala WA, Weber DJ. Disinfectants used for environmental disinfection and new room decontamination technology. *Am J Infect Control* [Internet]. 2013.;41:S36–41. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2012.11.006>
71. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: Are hospital surfaces

reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004.;39:1182–9.

72. World Health Organization. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide Clean Care is Safer Care. *World Heal Organ* [Internet]. 2011.;3:1–21. Preuzeto od: [www.who.int](http://www.who.int)

73. Rangel K, Cabral FO, Lechuga GC i sur. Detrimental effect of ozone on pathogenic bacteria. *Microorganisms*. 2022.;10:1–17.

74. Costa DM, Johani K, Melo DS i sur. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett Appl Microbiol*. 2019.;68:269–76.

75. Passaretti CL, Otter JA, Reich NG i sur. An evaluation of environmental decontamination with hydrogen peroxide vapor for reducing the risk of patient acquisition of multidrug-resistant organisms. *Clin Infect Dis*. 2013.;56:27–35.

76. Boyce JM, Havill NL, Dumigan DG, Golebiewski M, Balogun O, Rizvani R. Monitoring the Effectiveness of Hospital Cleaning Practices by Use of an Adenosine Triphosphate Bioluminescence Assay. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009.;30:678–84.

77. Davies A, Pottage T, Bennett A, Walker J. Gaseous and air decontamination technologies for *Clostridium difficile* in the healthcare environment. *J Hosp Infect* [Internet]. 2011.;77:199–203. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.08.012>

78. Moat J, Cargill J, Shone J, Upton M. Application of a novel decontamination process using gaseous ozone. *Can J Microbiol*. 2009.;55:928–33.

79. Marra AR, Schweizer ML, Edmond MB. No-touch disinfection methods to decrease multidrug-resistant organism infections: A systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018.;39:20–31.

80. Almatroudi A, Gosbell IB, Hu H i sur. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: Implications for infection control. *J Hosp Infect*. 2016.;93:263–70.

81. Almatroudi A, Hu H, Deva A i sur. A new dry-surface biofilm model: An essential tool for efficacy testing of hospital surface decontamination procedures. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2015.;117:171–6. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.003>



82. Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: Focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev.* 2014.;27:665–90.
83. Bernard MC, Lanotte P, Lawrence C, Goudeau A, Bernard L. Air Contamination around Patients Colonized with Multidrug-Resistant Organisms. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012.;33:949–51.
84. Otter JA, Yezli S, Perl TM, Barbut F, French GL. The role of „no-touch“ automated room disinfection systems in infection prevention and control. *J Hosp Infect [Internet].* 2013.;83:1–13. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.10.002>
85. Cheng KL, Boost MV, Chung JWY. Study on the effectiveness of disinfection with wipes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and implications for hospital hygiene. *Am J Infect Control [Internet].* 2011.;39:577–80. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2010.08.024>
86. Desai R, Pannaraj PS, Agopian J, Sugar CA, Liu GY, Miller LG. Survival and transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from fomites. *Am J Infect Control [Internet].* 2011.;39:219–25. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2010.07.005>
87. Coughenour C, Stevens V, Stetzenbach LD. An evaluation of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* survival on five environmental surfaces. *Microb Drug Resist.* 2011.;17:457–61.
88. Eames I, Tang JW, Li Y, Wilson P. Airborne transmission of disease in hospitals. *J R Soc Interface.* 2009.;6.
89. Chia PY, Sengupta S, Kukreja A, Ponnampalavanar S, Ng OT, Marimuthu K. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant gram-negative organisms. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020.;9:1–11.
90. Fernstrom A, Goldblatt M. Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. *J Pathog.* 2013.;2013:1–13.
91. Suleyman G, Alangaden G, Bardossy AC. The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2018.;20.
92. Beggs C, Knibbs LD, Johnson GR, Morawska L. Environmental contamination and

- hospital-acquired infection: Factors that are easily overlooked. *Indoor Air*. 2015.;25:462–74.
93. Kowalski WJ, Bahnfleth WP, Striebig BA, Whittam TS. Demonstration of a hermetic airborne ozone disinfection system: Studies on *E. Coli*. *Am Ind Hyg Assoc J*. 2003.;64:222–7.
94. Gao J, Zhao X, Bao Y i sur. Antibiotic resistance and OXA-type carbapenemases-encoding genes in airborne *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wards. *Burns* [Internet]. 2014.;40:295–9. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2013.06.003>
95. Shimose LA, Masuda E, Sfeir M i sur. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Concomitant Contamination of Air and Environmental Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016.;37:777–81.
96. Office USGA. Science & Tech Spotlight: Social Distancing During Pandemics [Internet]. 2020. Preuzeto od: <https://www.gao.gov/products/gao-20-545sp>
97. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S i sur. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2018.;81:7–11. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
98. Donlan M. Rodney. Biofilms: Microbial life on surfaces. *An la Real Acad Nac Farm*. 2016.;82:108–26.
99. Assefa M. Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections : A Review. 2022.;5061–8.
100. Dewasthale S, Mani I, Vasdev K. Microbial biofilm: current challenges in health care industry. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2018.;5:156–60.
101. Vickery K. Special Issue: Microbial biofilms in healthcare: Formation, prevention and treatment. *Materials (Basel)*. 2019.;12:3–5.
102. Vickery K, Deva A, Jacombs A, Allan J, Valente P, Gosbell IB. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. *J Hosp Infect* [Internet]. 2012.;80:52–5. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2011.07.007>
103. Eginton PJ, Holah J, Allison DG, Handley PS, Gilbert P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett Appl Microbiol*. 1998.;27:101–5.

104. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001.;147:3–9.
105. Vision A-AH. Razumijevanje uloge biofilma [Internet]. Preuzeto od: <https://ahvint.com/hr/inovacije/biofilm/>
106. Bowler P, Murphy C, Wolcott R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2020.;9:1–5. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00830-6>
107. Ledwoch K, Dancer SJ, Otter JA i sur. Beware biofilm! Dry biofilms containing bacterial pathogens on multiple healthcare surfaces; a multi-centre study. *J Hosp Infect* [Internet]. 2018.;100:e47–56. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.028>
108. Song L, Wu J, Xi C. Biofilms on environmental surfaces: Evaluation of the disinfection efficacy of a novel steam vapor system. *Am J Infect Control*. 2012.;40:926–30.
109. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 2006.;64:313–25.
110. Ledwoch K, Maillard JY. *Candida auris* dry surface biofilm (DSB) for disinfectant efficacy testing. *Materials (Basel)*. 2018.;12:4–13.
111. Hassett DJ, Elkins JG, Ma JF, Mcdermott TR. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm sensitivity to biocides: Use of hydrogen peroxide as model antimicrobial agent for examining resistance mechanisms. *Methods Enzymol*. 1999.;310:599–608.
112. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants : a review. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm Res*. 2011.;27:1017–32.
113. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides [Internet]. 2009. Preuzeto od: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/risk\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm)
114. Fernández L, Gutiérrez D, Martínez B, Rodríguez A, García P. Effective methods for disinfection and sterilization. *Antibiot Drug Resist*. 2019.;567–87.
115. Rozman U, Pušnik M, Kmetec S, Duh D, Turk SŠ. Reduced susceptibility and increased resistance of bacteria against disinfectants: A systematic review. *Microorganisms*. 2021.;9:1–22.

116. Weber DJ, Rutala WA. Use of Germicides in the Home and the Healthcare Setting Is There a Relationship Between Germicide Use and Antibiotic Resistance? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006.;27:1107–19.
117. Russell AD. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: An increasingly important area of investigation. *J Antimicrob Chemother.* 2002.;49:597–9.
118. Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2003.;51:271–6.
119. Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SGB. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J Hosp Infect.* 2012.;81:87–91.
120. Babaei MR, Sulong A, Hamat RA, Nordin SA, Neela VK. Extremely high prevalence of antiseptic resistant quaternary ammonium compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015.;14:1–5.
121. Haque M, McKimm J, Sartelli M i sur. Strategies to prevent healthcare-associated infections: A narrative overview. *Risk Manag Healthc Policy.* 2020.;13:1765–80.
122. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Hrvatski nacionalni standardi čišćenja prostora u kliničkim i bolničkim zdravstvenim ustanovama. 2018., str. 1- 38.
123. Ministarstvo zdravlja. Nacionalni program za kontrolu infekcija povezanih sa zdravstvenom zaštitom. 2013., str. 1–24.
124. World Health Organization. Guidelines on Prevention and Control of Hospital Associated Infections. 2002., str.1-68
125. World health organization. Environmental cleaning and infection prevention and control in health care facilities in low- and middle-income countries. *Promot. Local Econ. Dev. through Strateg. Plan.* 2022., str. 1-77.
126. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of Organisms In Healthcare Settings. *Infect Control.* 2019.;1–74.
127. Khabbaz R. Best Practices for Environmental Cleaning in Healthcare Facilities : in

- Resource-Limited Settings. Div Healthc Qual Promot. 2019.;1–91.
128. Rutala, William A.; Weber DJ. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. 2008.
129. Spencer W. CHAPTER 6 Introduction to Decontamination and Sterilisation. 2012.;
130. NHS England. National Standards of Healthcare Cleanliness. NHS Engl [Internet]. 2021.; Preuzeto od: <https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2021/04/B0271-national-standards-of-healthcare-cleanliness-2021.pdf>
131. Asaj A. Dezinfekcija. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
132. European Parliament. UREDBA (EZ) br. 1272/2008 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006 [Internet]. 2010. Preuzeto od: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1272>
133. European Parliament. UREDBA (EU) br. 528/2012 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 22. svibnja 2012. o stavljanju na raspolaganje na tržištu i uporabi biocidnih proizvoda [Internet]. 2012. Preuzeto od: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528>
134. Sousa CS, Torres LM, Azevedo MPF i sur. Sterilization with ozone in health care: An integrative literature review. Rev da Esc Enferm. 2011.;45:1238–44.
135. Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. Antimicrob Agents Chemother. 2007.;51:4217–24.
136. Europska komisija. Europski Zeleni plan. 2019.; Preuzeto od: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>
137. Conto A, Europska komisija, Ampiauw RE, Yaqub M, Lee W. The EU chemical strategy for sustainability towards a toxic-free environment. J Water Process Eng [Internet]. 2021.;43:24. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102228>
138. Ampiauw RE, Yaqub M, Lee W. Electrolyzed water as a disinfectant: A systematic review of factors affecting the production and efficiency of hypochlorous acid. J Water Process Eng [Internet]. 2021.;43:102228. Preuzeto od:

<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102228>

139. Cabo ML, Herrera JJ, Crespo MD, Pastoriza L. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. *Food Control* [Internet]. 2009.;20:521–5. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.002>

140. Gray NF. Ozone Disinfection [Internet]. Second Edi. *Microbiol. Waterborne Dis. Microbiol. Asp. Risks Second Ed.* Elsevier; 2013. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00033-0>

141. Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J Food Prot.* 1999.;62:1071–87.

142. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M i sur. Ozone application in different industries: A review of recent developments. *Chem Eng J* [Internet]. 2023.;454:140188. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140188>

143. Marino M, Maifreni M, Baggio A, Innocente N. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Front Microbiol.* 2018.;9:1–12.

144. Guzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry. *Lwt.* 2004.;37:453–60.

145. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M i sur. The Impact of Gaseous Ozone Penetration on the Disinfection Efficiency of Textile. *Ozone Sci Eng* [Internet]. 2023.;45:232–46. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1080/01919512.2022.2066503>

146. Boeniger MF. Use of ozone generating devices to improve indoor air quality. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1995.;56:590–8.

147. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M i sur. Ozone Decontamination of Medical and Nonmedical Devices: An Assessment of Design and Implementation Considerations. *Ind Eng Chem Res.* 2023.;62:4191–209.

148. Thill SA, Spaltenstein M, Thill SA, Spaltenstein M. Toward Efficient Low-Temperature Ozone Gas Sterilization of Medical Devices Toward Efficient Low-Temperature Ozone Gas Sterilization of Medical Devices. *Ozone Sci Eng* [Internet]. 2019.;00:1–13. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1080/01919512.2019.1704217>

149. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J*. 2018.;15:633–44.
150. Moccia G, Motta O, Pironti C, Proto A, Capunzo M, De Caro F. An alternative approach for the decontamination of hospital settings. *J Infect Public Health [Internet]*. 2020.;13:2038–44. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.09.020>
151. Moccia G, De Caro F, Pironti C i sur. Development and improvement of an effective method for air and surfaces disinfection with ozone gas as a decontaminating agent. *Med*. 2020.;56:1–9.
152. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M i sur. Bacterial and fungal disinfection via ozonation in air. *J Microbiol Methods [Internet]*. 2022.;194:106431. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106431>
153. Franke G, Knobling B, Brill FH i sur. An automated room disinfection system using ozone is highly active against surrogates for SARS-CoV-2. *J Hosp Infect*. 2021.;112:108–13.
154. Zoutman D, Shannon M, Mandel A. Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces. *Am J Infect Control [Internet]*. 2011.;39:873–9. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2011.01.012>
155. Martinelli M, Giovannangeli F, Rotunno S, Trombetta CM, Montomoli E. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *J Prev Med Hyg*. 2017.;58:E48–52.
156. Mehlman MA, Borek C. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ Res*. 1987.;42:36–53.
157. Ministarstvo rada, mirovinskog sustava obitelji i socijalne politike. Pravilnikom o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima (“Narodne novine”, br. 91/18). Zagreb; 2018.
158. Batakliiev T, Georgiev V, Anachkov M, Rakovsky S, Zaikov GE. Ozone decomposition. 2014.;7:47–59.
159. Sharma M, Hudson JB. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect Control*. 2008.;36:559–63.
160. Li CS, Wang YC. Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *Am Ind Hyg Assoc J*. 2003.;64:533–7.

161. Fontes B, Cattani Heimbecker AM, de Souza Brito G i sur. Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. *BMC Infect Dis.* 2012.;12:2–7.
162. Aydogan A, Gurol MD. Application of Gaseous Ozone for Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores. *J Air Waste Manag Assoc.* 2006.;56:179–85.
163. Al Habes MR; Ali Alkastaban IS; Al Motah ME; Al-Bahesh i sur. Effectiveness of Gaseous Ozone as a Disinfectant for Nosocomial Pathogens in a Healthcare Emergency Room. *Arch Pharm Pract.* 2021.;12:17–24.
164. Breidablik HJ, Lysebo DE, Johannessen L, Skare Andersen JR, Kleiven O. Effects of hand disinfection with alcohol hand rub, ozonized water, or soap and water: time for reconsideration? *J Hosp Infect [Internet].* 2020.;105:213–5. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.03.014>
165. Cardoso ACC, Fiorini JE, Ferriera LR, Gurjao JW, Amaral LA. Disinfection of Hospital Laundry Using Ozone : Microbiological Evaluation • Letters to the Editor Survival of *Acinetobacter* on Three Clinically Related. *Infect Control.* 2011.;21.
166. Boer HEL de, van Elzelingen-Dekker CM, van Rheenen-Verberg CMF, Spanjaard L. Use of Gaseous Ozone for Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From the Home Environment of a Colonized Hospital Employee . *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006.;27:1120–2.
167. Berrington AW, Pedler SJ. Investigation of gaseous ozone for MRSA decontamination of hospital side-rooms. *J Hosp Infect.* 1998.;40:61–5.
168. Tu LH, Oanh LH, Trung NV. Study of ozone disinfection in the hospital environment. 2020.;58:565–8.
169. Doan L, Forrest H, Fakis A, Craig J, Claxton L, Khare M. Clinical and cost effectiveness of eight disinfection methods for terminal disinfection of hospital isolation rooms contaminated with *Clostridium difficile* 027. *J Hosp Infect [Internet].* 2012.;82:114–21. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.06.014>
170. Epelle EI, Emmerson A, Nekrasova M i sur. Microbial Inactivation : Gaseous or Aqueous Ozonation ? *Ind. Eng. Chem. Res.* 2022, 61, 9600–9610
171. Giuliani G, Ricevuti G, Galoforo A, Franzini M. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with



ozone. *Ozone Ther.* 2018.;3:1–4.

172. Jung YJ, Oh BS, Kang JW. Synergistic effect of sequential or combined use of ozone and UV radiation for the disinfection of *Bacillus subtilis* spores. *Water Res.* 2008.;42:1613–21.

173. Dyas A, Boughton BJ, Das BC. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol.* 1983.;36:1102–4.

174. Kowalski WJ, Bahnfleth WP, Whittam TS. Bactericidal effects of high airborne ozone concentrations on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ozone Sci Eng.* 1998.;20:205–21.

175. Megahed A, Aldridge B, Lowe J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. *PLoS One.* 2018.;13:1–22.

176. Patil S, Valdramidis VP, Karatzas KAG, Cullen PJ, Bourke P. Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of *Escherichia coli* mutants. *J Appl Microbiol.* 2011.;111:136–44.

177. Moore G, Griffith C, Peters A. Bactericidal Properties of Ozone and Its Potential Application as a Terminal Disinfectant. *J Food Prot.* 2000.;63:1100–6.

178. Mahfoudh A, Moisan M, Séguin J i sur. Inactivation of Vegetative and Sporulated Bacteria by Dry Gaseous Ozone. *Ozone Science & Engineering : The Journal of the International Ozone Association.* 2014.;37–41.

179. Britton HC, Draper M, Talmadge JE. Antimicrobial efficacy of aqueous ozone in combination with short chain fatty acid buffers. *Infect Prev Pract [Internet].* 2020.;2:100032. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2019.100032>

180. Gambino M, Cappitelli F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling.* 2016.;32:167–78.

181. Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. 2002.;199:193–9.

182. Ito K. Experimental and CFD Analyses Examining Ozone Distribution in Model Rooms with Laminar and Turbulent Flow Fields. *J Asian Archit Build Eng.* 2007.;6:387–94.

183. Oliver JC, Bredarioli PAP, Leandro FD, Ferreira CBRJ, Veiga SMOM, Dias ALT.

Ozone against pseudomonas aeruginosa biofilms in contact lenses storage cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019.;61:19–23.

184. Saha R, Saha N, Atwain A, Donofrio RS. Evaluation of disinfection efficacy of ozone and chlorinated disinfectant against the biofilm of *Klebsiella michiganensis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Microbiol*. 2014.;64:1607–13.

185. Tachikawa M, Yamanaka K, Nakamuro K. Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone Sci Eng*. 2009.;31:3–9.

186. Tachikawa M, Yamanaka K. Synergistic disinfection and removal of biofilms by a sequential two-step treatment with ozone followed by hydrogen peroxide. *Water Res* [Internet]. 2014.;64:94–101. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.047>

187. Panebianco F, Rubiola S, Chiesa F, Civera T, Di Ciccio PA. Effect of gaseous ozone on *listeria monocytogenes* planktonic cells and biofilm: An in vitro study. *Foods*. 2021.;10.

188. Panebianco F, Rubiola S, Chiesa F, Civera T, Di Ciccio PA. Effect of gaseous ozone treatment on biofilm of dairy-isolated *Pseudomonas* spp. strains. *Ital J Food Saf*. 2022.;11.

189. Harada AMM, Nascimento MS. Effect of dry sanitizing methods on *Bacillus cereus* biofilm. *Brazilian J Microbiol*. 2021.;52:919–26.

190. Ibáñez-Cervantes G, Cruz-Cruz C, Durán-Manuel EM i sur. Disinfection efficacy of ozone on ESKAPE bacteria biofilms: Potential use in difficult-to-access medical devices. *Am J Infect Control*. 2023.;51:11–7.

191. Bialoszewski D, Pietruczuk-Padzik A, Kalicinska A i sur. Activity of ozonated water and ozone against *staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med Sci Monit*. 2011.;17:339–44.

192. Boch T, Tennert C, Vach K, Al-Ahmad A, Hellwig E, Polydorou O. Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm—an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2016.;20:1733–9.

193. Huth KC, Quirling M, Maier S i sur. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J*. 2009.;42:3–13.

194. Panebianco F, Rubiola S, Di Ciccio PA. The Use of Ozone as an Eco-Friendly Strategy against Microbial Biofilm in Dairy Manufacturing Plants: A Review. *Microorganisms*. 2022.;10.
195. Huth KC, Quirling M, Lenzke S i sur. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*. 2011.;119:204–10.
196. Kovač B, Piletić K, Kovačević Ganić N, Gobin I. The Effectiveness of Benzalkonium Chloride as an Active Compound on Selected Foodborne Pathogens Biofilm. *Hygiene*. 2022.;2:226–35.
197. Kovač B, Planinić A, Planinić M, Piletić K, Gobin I. Treatment with Gaseous Ozone Significantly Reduced the Number of Bacteria in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Biofilm. *Hygiene*. 2023.;3:125–35.
198. Nicholas R, Dunton P, Tatham A, Fielding L. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*. 2013.;115:555–64.
199. Pajak-Zajac MZ, Dowdell A, Buckley A, Potts HE, Smith A, Diver DA. Antimicrobial efficacy of in-situ plasma-generated ozone against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in drains and water-submerged surfaces. *bioRxiv* [Internet]. 2023.;2023.08.28.553206. Preuzeto od: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.08.28.553206v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.08.28.553206v1.abstract>
200. Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2012. [citirano 15. studeni 2021.];67:1589–96. Preuzeto od: <https://academic.oup.com/jac/article/67/7/1589/733761>
201. Vankerckhoven E, Verbessem B, Crauwels S i sur. Exploring the potential synergistic effects of chemical disinfectants and UV on the inactivation of free-living bacteria and treatment of biofilms in a pilot-scale system. *Water Sci Technol*. 2011.;64:1247–53.
202. Robbins JB, Fisher CW, Moltz AG, Martin SE. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J Food Prot*. 2005.;68:494–8.
203. Zekanović Sigler M, Begić G, Mežnarić S i sur. Effect of UV Light and Sodium Hypochlorite on Formation and Destruction of *Pseudomonas fluorescens* Biofilm In Vitro.

Processes. 2022.;10:1–16.

204. Torkzadeh H, Zodrow KR, Bridges WC, Cates EL. Quantification and modeling of the response of surface biofilm growth to continuous low intensity UVC irradiation. *Water Res.* 2021.;193.

205. Hua Z, Younce F, Tang J i sur. Efficacy of saturated steam against *Listeria innocua* biofilm on common food-contact surfaces. *Food Control* [Internet]. 2021.;125:107988. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107988>

206. Brackman G, Defoirdt T, Miyamoto C i sur. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiol.* 2008.;8:1–14.

207. van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1987.;53:1893–7.

208. Prado M, De Assis DF, Gomes BPF, Simão RA. Effect of disinfectant solutions on the surface free energy and wettability of filling material. *J Endod.* 2011.;37:980–2.

209. Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone . *Int J Biomater.* 2009.;2009:1–9.

210. Dayan J, Mireles K, Massicotte R, Dagher F, Yahia LLH. Clinical and Medical Investigations Effect of disinfectants on wettability and surface tension of metallic and polymeric surfaces found in hospitals. *Clin Med Investig* [Internet]. 2016.;1:48–53. Preuzeto od: [https://www.researchgate.net/publication/313076916\\_Clinical\\_and\\_Medical\\_Investigations\\_Effect\\_of\\_disinfectants\\_on\\_wettability\\_and\\_surface\\_tension\\_of\\_metallic\\_and\\_polymeric\\_surfaces\\_found\\_in\\_hospitals](https://www.researchgate.net/publication/313076916_Clinical_and_Medical_Investigations_Effect_of_disinfectants_on_wettability_and_surface_tension_of_metallic_and_polymeric_surfaces_found_in_hospitals)

211. Zeraik AE, Nitschke M. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2012.;55:569–76.

212. Zhang X, Zhang Q, Yan T, Jiang Z, Zhang X, Zuo YY. Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. *Environ Sci Technol.* 2015.;49:6164–71.

213. Farniya F, Jamalli A, Dadgar T. Physicochemical surface characteristics in different pathogenic bacteria. *Cogent Biol* [Internet]. 2019.;5:1638572. Preuzeto od:

<https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1638572>

214. Nakanishi EY, Palacios JH, Godbout S, Fournel S. Interaction between biofilm formation, surface material and cleanability considering different materials used in pig facilities—an overview. *Sustain.* 2021.;13.
215. Lilyanna S, Enoch MW, Moriguchi S i sur. Variability in Microplate Surface Properties and Its Impact on ELISA. *J Appl Lab Med.* 2018.;2:687–99.
216. Min SC, Schraft H, Hansen LT, Mackereth R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.* 2006.;23:250–9.
217. Wang Z, Huang Y, Li S, Xu H, Linder MB, Qiao M. Hydrophilic modification of polystyrene with hydrophobin for time-resolved immunofluorometric assay. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2010.;26:1074–9. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.059>
218. Auld DS, Coassin PA, Coussens NP i sur. Microplate Selection and Recommended Practices in High-throughput Screening and Quantitative Biology [Internet]. 2020. Preuzeto od: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558077/>
219. Katsikogianni M, Missirlis YF, Harris L, Douglas J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater.* 2004.;8:37–57.
220. Zheng S, Bawazir M, Dhall A i sur. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021.;9:1–22.
221. Salamandane A, Correia J, Muetanene BA, dos Santos M, Malfeito-Ferreira M, Brito L. Methicillin Resistance of Food-Borne Biofilm-Forming Staphylococci. *Appl Sci.* 2023.;13.
222. Greene C, Wu J, Rickard HA, Xi C. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol.* 2016.;176:139–48.
223. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011.;62:328–38.

224. Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials*. 1989.;10:325–8.
225. Harimawan A, Rajasekar A, Ting YP. Bacteria attachment to surfaces - AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2011.;364:213–8. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.08.021>
226. Abelho M. Extraction and quantification of ATP as a measure of microbial biomass. *Methods to Study Litter Decompos A Pract Guid*. 2005.;223–9.
227. Larson EL, Aiello AE, Gomez-Duarte C i sur. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiol*. 2003.;20:735–9.
228. Davidson CA, Griffith CJ, Peters AC, Fielding LM. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness - ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*. 1999.;14:33–8.
229. Castro J, Lima Â, Sousa LGV, Rosca AS, Muzny CA, Cerca N. Crystal Violet Staining Alone Is Not Adequate to Assess Synergism or Antagonism in Multi-Species Biofilms of Bacteria Associated With Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022.;11:1–7.
230. Arroyo MG, Ferreira AM, Frota OP i sur. Effectiveness of ATP bioluminescence assay for presumptive identification of microorganisms in hospital water sources. *BMC Infect Dis*. 2017.;17:1–5.
231. Robben C, Witte AK, Schoder D, Stessl B, Rossmannith P, Mester P. A fast and easy ATP-based approach enables MIC testing for non-resuscitating VBNC pathogens. *Front Microbiol*. 2019.;10:1–10.
232. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Marín MJ i sur. Validation of atp bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013.;18.
233. de Candia S, Morea M, Baruzzi F. Eradication of high viable loads of *Listeria monocytogenes* contaminating food-contact surfaces. *Front Microbiol*. 2015.;6:1–12.
234. McClurkin JD, Maier DE, Ileleji KE. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. *J Stored Prod Res* [Internet]. 2013.;55:41–7.

Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2013.07.006>

235. Moore G, Griffith C, Peters A. Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *J Food Prot.* 2000.;63:1100–6.

236. Ontario Agency for Health Protection and Promotion, Provincial Infectious Diseases Advisory. Best Practices for Environmental Cleaning for Prevention and Control of Infections in All Health Care Settings, 3rd Edition. 2018.;239. Preuzeto od: <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/B/2018/bp-environmental-cleaning.pdf>

237. Whitehead KA, Verran J. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioprod Process.* 2006.;84:253–9.

238. Adlhart C, Verran J, Azevedo NF i sur. Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview. *J Hosp Infect [Internet].* 2018.;99:239–49. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.01.018>

239. Wickham G. An investigation into the relative resistances of common bacterial pathogens to quaternary ammonium cation disinfectants. *Biosci Horizons Int J Student Res.* 2017.;10:1–9.

240. Breijyeh, Zeinab; Jubeh, Buthaina; Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve IT. *Molecules.* 2020.;25:1340.

241. McDonnell, Gerald; Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999.;12:147–79.

242. Bayan MAG, McGann P, Kwak YI i sur. Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *J Hosp Infect [Internet].* 2016.;66:1–9. Preuzeto od: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>

243. Mao Y, Doyle MP, Chen J. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett Appl Microbiol.* 2006.;42:642–7.

244. Ionescu M, Belkin S. Overproduction of Exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 *rpoS* Mutant in Response to Osmotic Stress. *Appl Environ Microbiol [Internet].* 2009. [citirano 15. studeni 2021.];75:483. Preuzeto od: [/pmc/articles/PMC2620720/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2620720/)

245. Kim HW, Lee NY, Park SM, Rhee MS. A fast and effective alternative to a high-ethanol disinfectant: Low concentrations of fermented ethanol, caprylic acid, and citric acid synergistically eradicate biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2020.;229:113586. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113586>
246. Johnson S, Nguyen V, Coder D. Assessment of cell viability. *Curr Protoc Cytom.* 2013.;1–26.
247. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 2004.;19:240–6.
248. Dillon CF, Dillon MB. Multiscale Airborne Infectious Disease Transmission. *Appl Environ Microbiol.* 2021.;87:1–13.
249. Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Gicquel G i sur. Bacterial and Fungal Counts in Hospital Air: Comparative Yields for 4 Sieve Impactor Air Samplers With 2 Culture Media. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006.;27:1405–8.
250. Ling S, Hui L. Evaluation of the complexity of indoor air in hospital wards based on PM<sub>2.5</sub>, real-time PCR, adenosine triphosphate bioluminescence assay, microbial culture and mass spectrometry. *BMC Infect Dis.* 2019.;19:1–10.
251. Blanco A, Ojembarrena F de B, Clavo B, Negro C. Ozone potential to fight against SAR-COV-2 pandemic: facts and research needs. *Environ Sci Pollut Res.* 2021.;28:16517–31.
252. Pascual A, Llorca I, Canut A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends Food Sci Technol.* 2007.;18:29–35.
253. Park KM, Yoon S, Choi T, Kim HJ, Park KJ, Koo M. The bactericidal effect of a combination of food grade compounds and their application as alternative antibacterial agent for food contact surfaces. 2020.;1–13.
254. Piletić K, Kovač B, Planinić M i sur. Combined Biocidal Effect of Gaseous Ozone and Citric Acid on *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formed on Ceramic Tiles and Polystyrene as a Novel Approach for Infection Prevention and Control. *Processes.* 2022.;10.
255. Cho GL, Ha JW. Synergistic effect of citric acid and xenon light for inactivating



foodborne pathogens on spinach leaves. *Food Res Int* [Internet]. 2021.;142:110210. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110210>

256. Cai Y, Zhao Y, Yadav AK, Ji B, Kang P, Wei T. Ozone based inactivation and disinfection in the pandemic time and beyond: Taking forward what has been learned and best practice. *Sci Total Environ* [Internet]. 2023.;862:160711. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160711>

257. Das AK, Islam MN, Billah MM, Sarker A. COVID-19 pandemic and healthcare solid waste management strategy – A mini-review. *Sci Total Environ* [Internet]. 2021.;778:146220. Preuzeto od: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146220>

258. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Pravilnik o načinu provedbe obvezatne dezinfekcije, dezinsekcije i deratizacije. 2007.

259. ECHA. Guidance on the Biocidal Products Regulation: Volume II Parts B+C. 2022.

## POPIS SLIKA

**Slika 1.** Porast *Staphylococcus aureus* na krvnom agaru

**Slika 2.** Porast *K. pneumoniae* na krvnom agaru

**Slika 3.** Porast *A. baumannii* na Muller-Hinton agaru

**Slika 4.** Predmeti i površine koje se učestalo dotiču

**Slika 5.** Prikaz prijenosa kapljica zrakom obzirom na veličinu

**Slika 6.** Mehanizam i faze u stvaranju biofilma

**Slika 7.** Biocidni učinak ozona na biofilm

**Slika 8.** Kutija za provođenje *in vitro* tretmana plinovitim ozonom

**Slika 9.** Mobilni generator ozona model Mozon GPF 8008

**Slika 10.** Keramičke pločice u Petrijevoj zdjelici

**Slika 11.** Soba za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak

**Slika 12.** Luminometar 3M Clean-Trace™ (lijevo) i keramička pločica u agaru (desno)

**Slika 13.** Skenirajući pretražni mikroskop Quanta 250

**Slika 14.** Uređaj za uzorkovanje zraka MAS Merck (lijevo), soba za postoperativni tretman sa biofilmom model organizama (sredina) i pločice za određivanje mikrobiološke čistoće prostora (desno)

**Slika 15.** Postotak adhezije prema heksanu, kloroformu i dietil eteru za odabrane sojeve *K. pneumoniae*

**Slika 16.** Postotak adhezije prema heksanu, kloroformu i dietil eteru za odabrane sojeve *A. baumannii*

**Slika 17.** Postotak adhezije prema heksanu, kloroformu i dietil eteru za odabrane sojeve *S. aureus*

**Slika 18.** Sposobnost stvaranja biofilma model organizma *K. pneumoniae* na keramici i polistirenu izražena kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za manje (A) i veće organsko opterećenje (B)

**Slika 19.** - Sposobnost stvaranja biofilma na keramici i polistirenu model organizma *A. baumannii* izraženog kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje

**Slika 20.** Sposobnost stvaranja biofilma model organizma *S. aureus* izraženog kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$

**Slika 21.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *K. pneumoniae* na keramici izražen kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  redukcije za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje

**Slika 22.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *K. pneumoniae* na polistirenu izražen kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  redukcija za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje

**Slika 23.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbanције na 600 nm uz standardnu devijaciju

**Slika 24.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *K. pneumoniae* na polistirenu kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbanције na 600 nm uz standardnu devijaciju

**Slika 25.** Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija odabranih sojeva *K. pneumoniae* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja određen uporabom APT bioluminiscencije

**Slika 26.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *A. baumannii* na keramici izražen kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje

**Slika 27.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *A. baumannii* na polistirenu izražen kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  za manje (A) i veće (B) organsko opterećenje

**Slika 28.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbanције na 600 nm uz standardnu devijaciju

**Slika 29.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *A. baumannii* na polistirenu kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbanције na 600 nm uz standardnu devijaciju

**Slika 30.** Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *A. baumannii* na keramici kod manjeg (A) i većeg (B) organskog opterećenja uporabom metode APT bioluminiscencije

**Slika 31.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *S. aureus* na keramici izražen kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  redukcija uz standardnu devijaciju za veće organsko opterećenje

**Slika 32.** Učinak plinovitog ozona na biofilm model organizma *S. aureus* na polistirenu izražen kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$  redukcija uz standardnu devijaciju za veće organsko opterećenje

**Slika 33.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *S. aureus* na keramici kod većeg organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbanције na 600 nm uz standardnu devijaciju

**Slika 34.** Učinak plinovitog ozona na ukupnu biomasu odabranih sojeva *S. aureus* na polistirenu kod većeg organskog opterećenja izražen kao aritmetička sredina apsorbanėje na 600 nm uz standardnu devijaciju

**Slika 35.** Učinak plinovitog ozona na ukupni broj vijabilnih bakterija u biofilmu odabranih sojeva *S. aureus* na keramici kod većeg organskog opterećenja uporabom metode APT bioluminiscencije

**Slika 36.** Intenzitet fluorescence (valna dužina eksitacije 488 nm, emisije detektirane u rasponu od 500-600 nm) za odabrane sojeve *K. pneumoniae*

**Slika 37.** Intenzitet fluorescence (valna dužina eksitacije 488 nm, emisije detektirane u rasponu od 500-600 nm) za odabrane sojeve *A. baumannii*

**Slika 38.** Intenzitet fluorescence (valna dužina eksitacije 488 nm, emisije detektirane u rasponu od 500-600 nm) za odabrane sojeve *S. aureus*

**Slika 39.** Prikaz razaranja strukture biofilma reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 nakon tretmana plinovitim ozonom

**Slika 40.** Trodimenzionalni prikaz kontrolne i tretirane keramičke pločice s biofilmom reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 (gornji red), na donjim slikama dvodimenzionalni prikaz biofilma reprezentativnog model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 (donji red)

**Slika 41.** Topologija biofilma reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 na keramici prikazana uporabom mikroskopije atomskih sila

**Slika 42.** Morfološke promjene na strukturi biofilma (B) i stanicama reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 nakon tretmana plinovitim ozonom (C, D)

**Slika 43.** Morfološke promjene na strukturi biofilma (B) i stanicama reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA 1605 nakon tretmana plinovitim ozonom (C, D)

**Slika 44.** Prikaz morfoloških promjena na strukturi biofilma (B) i stanicama reprezentativnog soja model organizma *S. aureus* MRSA ATCC 43300 nakon tretmana plinovitim ozonom (C, D)

**Slika 45.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 uz manje organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

**Slika 46.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *K. pneumoniae* OXA NCTC 13442 uz veće organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

**Slika 47.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA1605 uz manje organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

**Slika 48.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *A. baumannii* ATCC BAA1605 uz veće organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

**Slika 49.** Vijabilnost bakterijskih stanica reprezentativnog soja model organizma *S. aureus* MRSA 43300 uz veće organsko opterećenje korištenjem Dead Live bojenja prije i nakon tretmana plinovitim ozonom

**Slika 50.** Ukupni broj bakterija u zraku sobe za postoperativni tretman prije (lijevo) i nakon (desno) tretmana plinovitim ozonom na lokaciji uzorkovanja “prozorska daska”

## POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Fizikalno – kemijska svojstva ozona

**Tablica 2.** Čimbenici koji utječu na učinkovitost ozona kao dezinfekcijskog sredstva

**Tablica 3.** Prikaz automatskih metoda dezinfekcije s prednostima i nedostacima

**Tablica 4.** Osjetljivost model organizma *K. pneumoniae* na antibiotike

**Tablica 5.** Osjetljivost odabranih sojeva model organizma *A. baumannii* na antibiotike

**Tablica 6.** Osjetljivost odabranih sojeva model organizma *S. aureus* na antibiotike

**Tablica 7.** Hidrofobnost/hidrofilnost i hrapavost keramike i polistirena

**Tablica 8.** Usporedba sposobnosti stvaranja biofilma odabranih model organizama izražena kao  $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$

**Tablica 9.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *K. pneumoniae* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja

**Tablica 10.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *K. pneumoniae* korištenjem kristal violet bojenja

**Tablica 11.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *K. pneumoniae* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja korištenjem kristal violet bojenja

**Tablica 12.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *K. pneumoniae* korištenjem ATP bioluminiscencije

**Tablica 13.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *K. pneumoniae* ovisno o materijalu (keramika) i količini organskog opterećenja korištenjem ATP bioluminiscencije

**Tablica 14.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *A. baumannii* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja

**Tablica 15.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *A. baumannii* korištenjem kristal violet bojenja

**Tablica 16.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *A. baumannii* ovisno o materijalu i količini organskog opterećenja korištenjem kristal violet bojenja

**Tablica 17.** Usporedba različitih materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *A. baumannii* korištenjem ATP bioluminiscencije

**Tablica 18.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *A. baumannii* ovisno o materijalu (keramika) i količini organskog opterećenja korištenjem ATP bioluminiscencije

**Tablica 19.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *S. aureus* ovisno o materijalu i većem organskom opterećenju

**Tablica 20.** Usporedba različitih materijala i većeg organskog opterećenja za odabrane sojeve *S. aureus* korištenjem kristal violet bojenja

**Tablica 21.** Učinak plinovitog ozona na odabrane sojeve *S. aureus* ovisno o materijalu (keramika) i većem organskom opterećenju korištenjem kristal violet bojenja

**Tablica 22.** Usporedba materijala i organskog opterećenja za odabrane sojeve *S. aureus* korištenjem ATP bioluminiscencije

**Tablica 23.** Učinak plinovitog ozona na biofilm odabranih model organizma prikazan kao postotak inhibicije uz standardnu devijaciju ovisno o vrsti materijala i organskog opterećenja

**Tablica 24.** Ukupni stvarni i statistički broj bakterija u zraku sobe za postoperativni oporavak Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak

**Tablica 25.** Mikrobiološka čistoća prostora u sobi za postoperativni tretman Opće bolnice dr. Ivo Pedišić, Sisak

**Tablica 26.** *In situ* učinak plinovitog ozona na biofilm standardnih sojeva model organizama *S. aureus*, *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na keramici i polistirenu uz manje organsko opterećenje

## POPIS POKRATA

- AFM – mikroskop atomskih sila (eng. *atomic force microscopy*)
- AMK – amikacin;
- AMX – amoksicilin
- AMX-C – amoksicilin klavulanska kiselina
- ATP – adenzin trifosfat
- CAM – mjerenja kontaktnog kuta (eng., *contact angle measurement*)
- CAZ – ceftazidim
- CDP – cefpodoksim
- CEX – cefaleksin
- CFIMP – cefepim
- CFIX – cefiksim
- CFU – broj poraslih kolonija (eng. *colony forming units*)
- CIP – ciprofloksacin
- CIX – ciprofloksacin;
- CLA – klaritromicin
- CLN – klindamicin
- CLOX – kloksacilin
- COL - kolistin
- CRO – ceftriakson; ceftazidim
- CXM – cerufoksim
- DCFH-DA - 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
- DNK- deoksiribonukleinska kiselina
- EPS – izvanstanična polimerna tvar (eng., *extracellular polymeric substance*)
- ESBL -  $\beta$  – laktamaze širokog spektra (engl., *extended spectrum  $\beta$  – lactamase*)
- ESKAPE - *Enterococcus faecium* (E), *Staphylococcus aureus* (S), *Klebsiella pneumoniae* (K), *Acinetobacter baumannii* (A) i *Enterobacter species* (E)
- ETP – ertapenem
- FO – fiziološka otopina
- GEN – gentamicin



HPV – para vodikovog peroksida

I – intermedijarno (eng., intermediate, I),

IMP – imipenem

IMP – imipenemaza (eng., *imipenemase*)

KPC - *K. pneumoniae* karbapenemaza (eng., *K. pneumoniae carbapenemase*)

LZD – linezolid

MATS – mikrobna adhezija prema otapalima (eng. *microbial adhesion to solvents*)

MBL - metalo-beta-laktamaze (eng., *metallo-beta-lactamase*)

MDR – višestrukootporni

MDRO - Višestrukootporni mikroorganizmi - eng. *multidrug resistant organisms*,

MEM – meropenem

MH – Muller Hinton

MHB – Muller Hinton bujon

MRSA - meticilin – rezistentni *Staphylococcus aureus*

NDM - New Delhi metalo beta laktamaza (eng., *New Delhi metallo-β – lactamase*)

NRFX – norfloksacim;

OPA – orto-ftalaldehid

OXA – oksacilinaza (eng., *oxacillinase*)

PBP2a – protein koji veže penicilin (eng., *penicillin binding protein 2a*)

PEN – penicilin

PI – propidium jodid

R – otporan (eng., resistant, R)

RLU- relativne jedinice svjetla (eng. *relative light units*)

RMS – kvadratna sredina (eng. *root mean square*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (eng., *reactive oxygen species*)

S – osjetljiv (eng., sensitive, S)

SAM – ampicilin + sulbaktam;

SCCmec - stafilokokna kromosomska mec kasetna (engl. *Staphylococcal Cassette Chromosome mec SCCmec*)

SXT – sulfametoksazol trimetoprim;

TC – tigeciklin;

TZP – piperacili tazobactam

UV - ultraljubičasto

VAN – vankomicin

VBNC - vijabilno nekultivabilno (eng., *viable but nonculturable*)

VIM - Verona integron-kodirana metalo beta laktamaza (eng., *Verona integron – encoded metallo- $\beta$  – lactamase*)

## ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI

Ime: Kaća Piletić

Adresa: Vladimira Nazora 48b, 44330 Novska

Telefon: 091 1609363

E-pošta: kacaselenic@gmail.com

Nacionalnost: Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum rođenja: 6. rujna 1984.

### RADNO ISKUSTVO

- Datum: 01/04/2019. - danas
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Državni inspektorat, Šubićeva 29, Zagreb
- Vrsta posla ili područje: državna upravna tijela
- Zanimanje i položaj koji obnaša: viša sanitarna inspektorica
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti
  - inspekcijski nadzor nad provedbom zakona i drugih propisa kojima se utvrđuje zaštita zdravlja ljudi
  - predlaganje i sudjelovanje u izradi pravnih propisa iz područja nadležnosti sanitarne inspekcije
  - predlaganje i sudjelovanje u izradi mišljenja, nacрта, stajališta, stručne upute za rad
  - edukacija sanitarnih inspektora po pojedinim područjima
  - sudjelovanje u radu tijela Europske unije (Europska komisija – odbori za kozmetiku i buku, Europska agencija za kemikalije - Forum agencija za kemikalije - Forum)

- Datum: 3/11/2008 –31/03/2019
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Ministrstvo zdravstva
- Vrsta posla ili područje: državna upravna tijela
- Zanimanje i položaj koji obnaša: viši državni sanitarni inspektor
  
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti:
  - inspekcijski nadzor nad provedbom zakona i drugih propisa kojima se utvrđuje zaštita zdravlja ljudi
  - predlaganje i sudjelovanje u izradi pravnih propisa iz područja nadležnosti sanitarne inspekcije
  - predlaganje i sudjelovanje u izradi mišljenja, nacрта, stajališta, stručne upute za rad
  - edukacija sanitarnih inspektora po pojedinim područjima
  - sudjelovanje u radu tijela Europske unije (Europska komisija – odbori za kozmetiku i buku, Europska agencija za kemikalije - Forum)

#### ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

- Datum: 01/2021. - danas
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Doktorska škola
- Datum: 2011-2013
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutski fakultet, Poslijediplomski specijalistički studij Toksikologija
- Osnovni predmet /zanimanje: Toksikologija
- Naslov postignut obrazovanjem: sveučilišni magistar toksikologije
- Datum: 2003-2008
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Studij diplomiranih sanitarnih inženjera
- Osnovni predmet /zanimanje: javno zdravstvo
- Naslov postignut obrazovanjem: diplomirani sanitarni inženjer
- Stupanj nacionalne kvalifikacije: VSS

## OSOBNJE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

### MATERINJI JEZIK:

HRVATSKI

### DRUGI JEZICI ENGLJSKI

- sposobnost čitanja: C1
- sposobnost pisanja: C1
- sposobnost usmenog :izražavanja: C1

### SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

- izražene prezentacijske vještine stečene na brojnim javnim nastupima
- izražene socijalne vještine u multikulturalnom okruženju stečene prisustvovanjem brojnim međunarodnim edukacijama i sastancima
- izražene komunikacijske sposobnosti stečene na radnom mjestu

### ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

- izražene organizacijske vještine stečene na radnom mjestu koordinacijom na raznim europskim i nacionalnim projektima koje je provodilo Ministarstvo zdravstva
- izražene organizacijske vještine stečene organiziranjem humanitarnih utrka i škola trčanja u lokalnom atletskom klubu "Novljanska grupa atletičara" Novska

### TEHNIČKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

- Iskustvo u radu s programskim paketom Microsoft Office, osnovna znanja u Adobe photoshopu, odlično korištenje interneta, elektroničke pošte

### UMJETNIČKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

- početnik bas električne gitare

### DRUGE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

- Iskustvo rada u multikulturalnom okruženju na engleskom jeziku stečeno sudjelovanjem u radu Standing committee for cosmetic products (2012-1015), Working party on cosmetic products (2012-2015), Noise committee (2012-2015) i Forum for exchange information Europske agencije za kemikalije (2016-trenutačno)
- Iskustvo u znanstveno – istraživačkom radu na projektu „Patogeneza eksperimentalne legioneloze“ Katedre za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci

### VOZAČKA DOZVOLA

### B KATEGORIJE

## DODATNE OBAVIJESTI

### Publikacije:

1. Sarec M, Selenic K and Gobin I. Rapid progression of *Legionella longbeachae* lung infection in the liver and spleen. 6th Zagreb International Medical Summit, 9.-12. November 2006. Zagreb. Abstract book p. 67.
2. Gobin I, Sarec M, Selenic K, Doric M. and Susa M. Rapid systemic propagation of *Legionella longbeachae* lung infection in A/J mice. 17th ECCMID/25th ICC, 31. March-3. April 2007. , Munich, Germany, Clinical Microbiology and Infection, April 2007-Vol. 13. Issue s1, p S494.
3. Selenic K, Sarec M and Gobin I. The pathogenic potential of different *Legionella* species in A/J mice, 3rd International Croatian Student Summit (CROSS), Zagreb, 29. 03. – 01. 04. 2007. Abstract book p. 104.
4. Gobin I, Sarec M, Selenic K, Doric M, Abu Kwaik Y. and Susa M. Multiple Organ Dysfunction in Mice Inoculated with *Legionella longbeachae*, 107 ASM General Meeting, 21. – 25. 05. 2007. Toronto, Canada. Abstract book B-180.
5. Gobin I, Selenic K, Sarec M, Santic M and Doric M. The differences and similarities among *Legionella* species. Opatija, Croatia. International Symposia - "Sanitary engineering" 04. - 06. October, 2007. Abstract book. p.17
6. Gobin I, Sanitc M, Selenic K, Sarec M, Abu Kwaik Y, Doric M. Virulence of different *Legionella* species in A/J mice. Power of microbes in industry and environment. 19 – 22. september 2007. , Zadar
7. Gobin I, Selenic K, Sarec M, Susa M. and Doric M. Comparison of virulence of different *Legionella longbeachae* strains in A/J mice, 18th European Students' Conference 7. - 11. October 2007, Berlin, Germany, Abstract book p.68
8. Gobin I, Selenic K, Trobonjaca Z, Susa M, Doric M. Crucial role of IFN-gamma receptor in murine *Legionella longbeachae* infection, European society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19. – 22. april 2008. , Barcelona, Španjolska
9. Gobin I, Santic M, Selenic K, Sarec M, Susa M, Doric M. Comparison of virulence of *L. longbeachae* strains to other strains in animal model. II International Journal of Sanitary Engineeringg Research 2 (2008), 2; 4-10.
10. Piletic K., Scrbak – Krizanic V., Kober R. - Sanitarni inspektor – operativac u kriznim situacijama - Prikaz rada na primjeru nadzora vodovoda u Sisačko-moslavačkoj županiji nakon potresa, 4. Studentski kongres zaštite zdravlja Sanitas, 21.-22. svibnja 2021., Rijeka, Hrvatska, Knjiga sažetaka (2021); 4
11. Piletic K., Vidic-Strac I., Vuljanic K., Gobin I., Kober R. Market surveillance study on hand gels and disinfectant efficiency during COVID-19 pandemics in Croatia, ECCMID June 2021., Vienna, Austria

12. Piletic K., Tomic Linsak D., Repustic M., Gobin I. – Utjecaj plinovitog ozona na kvalitetu zraka u bolničkom okolišu. 12. Hrvatski znanstveno – stručni skup Zaštita zraka 21, 15. – 17. rujna 2021., Medulin, Hrvatska, Abstract book p. 70-71.
13. Kovac B., Piletic K., Gobin I. – Utjecaj ozona na redukciju broja bakterija u biofilmu *Klebsiella pneumoniae* u in vitro modelu, , 5. Studentski kongres zaštite zdravlja Sanitas, 8. – 9. travnja 2022., Rijeka, Hrvatska, Knjiga sažetaka (2022); 4
14. Piletic K., Kovac B., Rebic D., Oder M., Gobin I. – Susceptibility of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm to gaseous ozone, Science and US, , 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress with International Participation, Abstract book 2022., 57-58
15. Piletic K., Kovac B., Percic M., Zigon J., Broznic D., Karleusa LJ., Lucic-Blagojevic S., Oder M. and Gobin I. – Disinfecting action of gaseous ozone on OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* biofilm in vitro; Int. J. Environ. Res. Public Health 2022, Volume 19, Issue 10, 6177
16. Piletic K., Karleusa LJ. Rebic D. and Gobin I. – Adverse effect of gaseous ozone to *Acinetobacter baumannii* biofilm – new approach to fight hospital acquired infections, 7th 7 Croatian Congress of microbiology with International Participation · Skupovi HMD-a. Date: May 24-27, 2022. Venue: Sveti Martin na Muri, Croatia.
17. Piletić K, Kovač B, Planinić M, Vasiljev V, Karačonji IB, Žigon J, i ostali. Combined Biocidal Effect of Gaseous Ozone and Citric Acid on *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formed on Ceramic Tiles and Polystyrene as a Novel Approach for Infection Prevention and Control. Processes. 2022.;10.
18. Kovač B, Piletić K, Kovačević Ganić N, Gobin I. The Effectiveness of Benzalkonium Chloride as an Active Compound on Selected Foodborne Pathogens Biofilm. Hygiene. 2022.;2:226–35.
19. Kovač B, Planinić A, Planinić M, Piletić K, Gobin I. Treatment with Gaseous Ozone Significantly Reduced the Number of Bacteria in Extended-Spectrum-β-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Biofilm. Hygiene. 2023.;3:125–35.
20. Piletić K.; Tomić Linšak D.; Kovač B.; Mežnarić S.; Repustić Marin; Radmanović-Skrbić M.; Gobin I. Ozone disinfection efficiency against airborne microorganisms in hospital environment: a case study. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 73 (2022), 4; 270-275.

