

UTJECAJ OZONA NA SOJEVE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* REZISTENTNE NA KARBAPENEME I KOLISTIN

THE EFFECT OF OZONE ON CARBAPENEMS AND COLISTIN RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS

Irina Tanuwidjaja, Mirna Mrkonjić Fuka

SAŽETAK

U ovom je radu istraženo antimikrobno djelovanje ozonirane vode, generirane u obliku kapljica (326 - 400 μm) i maglice (145 - 225 μm), u koncentracijama od 4 ppm i 2 ppm, prema šest karabapenem- i kolistin-rezistentnih sojeva *Klebsiella pneumoniae* podrijetlom iz otpadnih voda. Rezultati su pokazali izuzetno visoku djelotvornost ozonirane vode kao antimikrobnog sredstva. Broj bakterija *K. pneumoniae* statistički je značajno smanjen u odnosu na kontrolu i iznosi 76,38 - 99,77 % za ozon apliciran u obliku kapljica u koncentraciji od 4 ppm, te od 17,02 - 98,71 % za 2 ppm ozona primijenjenog u obliku maglice. Najbolja djelotvornost ozonirane vode bila je vidljiva prema tri soja *K. pneumoniae* (SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_86 i SE_SC_COL_96) te je redukcija brojnosti kod ovih sojeva, prilikom svakog od četiri tretmana, iznosila više od 95 %. Međutim, neki sojevi *K. pneumoniae* preživjeli su u znatno većem postotku, ovisno o primijenjenom tretmanu. Najveće je odskakanje od prosječnih rezultata detektirano za soj SE_SC_COL_102 te je ozonirana voda koncentracije 2 ppm u obliku maglice reducirala samo 17,02 % ovih bakterija. Općenito, način aplikacije ozonirane vode, kao i koncentracija apliciranog ozona (4 ili 2 ppm), značajno utječu na udio inhibiranih bakterija, a efikasnost ovisi i o soju na koji se primjenjuje pojedini tretman. Iako je učinkovitost inaktivacije mikroorganizama primjenom obje koncentracije ozonirane vode bila izuzetno visoka, prosječno bolje rezultate pokazala je voda koncentracije ozona od 4 ppm, a prilikom aplikacije u obliku kapljica.

Ključne riječi: ozonirana voda, antibiotska rezistencija, sojevi *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

In this paper, the antimicrobial activity of ozonated water, generated in the form of droplets (326-400 μm) and mist (145-225 μm), in concentrations of 4 ppm and 2 ppm, against six carbapenem- and colistin- resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* originating from wastewater was investigated. The results showed an extremely high effectiveness of ozonated water as an antimicrobial agent. The number of *K. pneumoniae* was statistically significantly reduced compared to the control and ranged from 76.38 to 99.77% for ozone applied in droplet form at a concentration of 4 ppm, or from 17.02 to 98.71% for 2 ppm ozone applied in the form of a nebula. Ozonated water was most effective against three strains of *K. pneumoniae* (SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_86 and SE_SC_COL_96), and the reduction in the number of these strains was more than 95% for each of the four treatments. However, some strains of *K. pneumoniae* survived in a significantly higher percentage, depending on the treatment applied. The biggest deviation from the average results was detected for the strain SE_SC_COL_102, and the concentration of ozonated water of 2 ppm in the form of mist reduced only 17.02% of these bacteria. In general, the method of application of ozonated water, as well as the concentration of applied ozone (4 or 2 ppm), significantly affects the proportion of reduced bacteria, and the effectiveness also depends on the strain to which a particular treatment is applied. Although the effectiveness of the inactivation of microorganisms using both concentrations of ozonated water was extremely high, on average the better result was achieved at the ozone concentration of 4 ppm in the water, and when it was applied in the form of a droplet.

Key words: ozonated water, antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae* strains

UVOD

Česta uporaba antibiotika dovodi do značajnog porasta broja višestruko rezistentnih bakterija u okolišu (Park i sur., 2016.). Širenje i razvoj antibiotske rezistencije kod patogenih bakterija ozbiljno ugrožava učinkovitost sadašnjih antibiotika, a otkrivanje novih antibiotika izuzetno je sporo (Zhang i sur., 2019.). Donedavno je otpornost na antibiotike smatrana samo kliničkim problemom, međutim u brojnim istraživanjima dokazano je da okoliš predstavlja značajan izvor antibiotski rezistentnih bakterija te da su tlo, voda i sediment rezervoari antibiotske rezistencije (Furlan i sur., 2023.; Larsson i

Flach, 2021.; Zhang i sur., 2019.). Visoke koncentracije antibiotika ili njihovih metabolita ispuštenih zajedno s urinom i fekalijama u otpadne vode povećavaju selektivni pritisak u populacijama bakterija u vodenim i terestrijalnim ekosustavima te tako omogućuju stvaranje generacija mikroorganizama otpornih na antibiotike. Budući da je poljoprivredna proizvodnja pod snažnim utjecajem zagađivača iz različitih sektora, sve je češća pojava antibiotski rezistentnih bakterija i njihovih gena i u poljoprivrednoj proizvodnji (Furlan i Stehling, 2021.; Furlan i sur., 2024.).

Klebsiella pneumoniae su štapičaste, Gram-negativne bakterije iz reda Enterobacterales. Dobro preživljavaju u nepovoljnim okolišnim uvjetima iako ne stvaraju endospore (Janda i Abott, 2021.). Sojeve *K. pneumoniae* nalazimo u vodi i tlu te u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja (Bagley, 1985.). Oko 30 % sojeva *K. pneumoniae* može fiksirati dušik u anaerobnim uvjetima te time utječu na povećanje prinosa različitih usjeva (Postgate, 1998; Kim i sur., 2022.). Međutim, sojevi *K. pneumoniae* su i uzročnici bolesti kod ljudi i životinja (Chang i sur., 2021.; Raudales i sur., 2014.). Zbog učestale pojave višestruke rezistencije na antibiotike te pojave karbapenem rezistentnih sojeva, infekcije *K. pneumoniae* predstavljaju značajan klinički problem povezan s visokim morbiditetom i smrtnošću zbog ograničenih mogućnosti liječenja. Još je alarmantnija istovremena rezistencija na karbapeneme i kolistin budući da su ti agensi posljednja linija učinkovite terapije dostupne za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnom *K. pneumoniae* (Nordmann i sur., 2009.; Rojas i sur., 2017.).

Ozon (O_3) je plin sastavljen od tri atoma kisika koji se prirodno pojavljuje u gornjim slojevima atmosfere u malim količinama. Ozon ima poluživot od oko 30 minuta (Vitali i Valdenassi, 2019.) prije nego što se raspadne na molekularni kisik (O_2) i jedan slobodan atom kisika (Bataklijev i sur., 2014.). Ovaj pojedinačni slobodni kisik vrlo je reaktivan i djeluje na stanične komponente mikroorganizama kao što su masne kiseline, enzimi i nukleinske kiseline te remeti njihovu normalnu aktivnost (Greene i sur., 2012.). Destrukcija stanične membrane ili kombinacija povećane propusnosti citoplazmatske membrane i koagulacije citoplazme primarni su mehanizmi koji uzrokuju lizu stanice i smrt mikrobnih stanica (Thanomsub i sur., 2002.; Zhang i sur., 2016.). Brojna su istraživanja potvrdila baktericidno djelovanje ozona na različite mikroorganizme uključujući Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije

(Białoszewski i sur., 2010.; Tanuwidjaja i Mrkonjić Fuka, 2022.; Zhang i sur., 2016., Santos i sur., 2021.). Zbog dokazane učinkovitosti, američka Agencija za hranu i lijekove (FDA), odobrila je 2001. ozon kao antimikrobno sredstvo za obradu, skladištenje i preradu hrane u plinovitom i vodenom stanju (Rice i Graham, 2001.). Ozon je također odobrilo američko Ministarstvo poljoprivrede (USDA) za organsku proizvodnju usjeva i preradu hrane. Diljem svijeta, ozon se koristi u plinovitom obliku ili u obliku ozonirane vode kao alternativa konvencionalnim kemijskim pesticidima, za sanaciju tla, u prehrambenoj industriji, za dezinfekciju vode za piće, pročišćavanje otpadnih voda, medicinsku dezinfekciju, osvježavanje zraka i smanjenje kontaminacije aflatoksinima (Díaz-López i sur., 2021.; Paul i sur., 2020.; Raudales i sur., 2014.; Prudente i King, 2002.; Özen i sur., 2021.). Utvrđene djelatne koncentracije ovise o obliku primijenjenog ozona (ozonirana voda ili plinoviti ozon), duljini tretmana, vrsti ciljanih mikroorganizama te nalaze li se mikroorganizmi u čistoj kulturi ili u kompleksnim zajednicama. Najmanje djelatne doze ozonirane vode za inaktivaciju različitih fitopatogenih mikroorganizama iznose 0,5 – 100 ppm (Raudales i sur., 2014.) odnosno 0,4-0,8 ppm za inaktivaciju bakterija poput *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* (Santos i sur., 2021.). Doze od 25 - 80 ppm bile su nužne za inaktivaciju *K. pneumoniae* plinovitim ozonom tijekom dezinfekcije vode ili tijekom tretiranja biofilmova (Piletić i sur., 2022.; Rangler i sur., 2022.).

Do sada je vrlo malo objavljenih radova vezanih uz utjecaj ozona na karbapenem - rezistentne *K. pneumoniae* (Correia i sur., 2024.; Piletić i sur., 2022.; Rangler i sur., 2022.) i sva su istraživanja vezana uz aplikaciju plinovitog ozona. Također, u istraživanjima nije uzet u obzir utjecaj ozona na različite pojedinačne sojeve *K. pneumoniae*, a također nema podataka za bakterije rezistentne i na kolistin. Dodatno, nije istražen utjecaj različitih načina aplikacije ozonirane vode (kapljice u usporedbi s maglicom).

Zbog svega navedenog, hipoteza je ovog istraživanja da će ozon pri koncentracijama od 4 i 2 ppm pokazati baktericidno djelovanje prema karbapenem i kolistin rezistentnim sojevima *K. pneumoniae*. Efikasnost djelovanja ozonirane vode ovisit će načinu aplikacije, primijenjenim koncentracijama te o soju *K. pneumoniae* u tretmanu.

MATERIJALI I METODE

Bakterijske kulture

Bakterijski izolati *K. pneumoniae* korišteni u ovom istraživanju prikupljeni su iz komunalnih otpadnih voda grada Zagreba (n=17) i ustupljeni su od strane Instituta Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorija za okolišnu mikrobiologiju i biotehnologiju. Svi izolati pripadaju skupini višestruko rezistentnih bakterija koje nose rezistenciju na karbapeneme i kolistin. Utvrđivanje rezistencije na karbapeneme i kolistin i detaljna molekularna karakterizacija gena koji kodiraju rezistenciju na navedene antibiotike kod izolata korištenih u ovom istraživanju detaljno su opisani u radu Puljko i sur. (2024.). Izolati su čuvani u glicerolu (25 %) pri -20 °C do daljnjih analiza.

Ekstrakcija DNA i genotipizacija izolata rep-PCR metodom

Radi izolacije genomske DNA izolati su prvo pročišćeni do monokulture na krutim Luria-Bertani (LB) podlogama (Biolife, Italija). Pojedinačna kolonija svakog izolata sterilno je precijepljena u 1,5 ml tekuće LB podloge i inkubirana na 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije, stanice su odvojene od hranjivog medija centrifugiranjem u trajanju od tri minute pri 16 000 x g i genomska DNA je izolirana iz staničnog peleta pomoću kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Koncentracija i čistoća izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer P300 (Implen, Njemačka). Radi selekcije različitih sojeva *K. pneumoniae*, prikupljeni izolati genotipizirani su pomoću rep-PCR metode (Domig i sur., 2014.) i korištenjem oligonukleotidne početnice (GTG)₅ (Švec i sur., 2005.). Pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl, a korištena je DNA koncentracije 20 ng/µl. Rep-PCR produkti su razdvojeni horizontalnom elektroforezom (Owl A1, Thermo Scientific, SAD) na 90 V kroz 1 h i 50 minuta. Nakon elektroforeze, gel je bojan u otopini etidij-bromida koncentracije 0,5 µl/ml kroz 30 minuta i snimljen pomoću uređaja UVIDOC HD6 (Uvitec, Velika Britanija). Dobiveni rep-PCR obrasci analizirani su uz pomoć programa BioNumerics 7.6.1. (Applied Maths, Belgija). Dice koeficijent korišten je za računanje sličnosti izolata *K. pneumoniae*, a UPGMA algoritam (engl. Unweight Paired Group Arithmetic Average) za grupiranje izolata. U konstrukciji dendrograma korišteni su sljedeći parametri: razina tolerancija od 1,0 % i optimizacija od 0,5 %. Izolati su grupirani na temelju 90 % sličnosti. Za daljnje analize odabrani su različiti sojevi koji su ujedno i reprezentativni predstavnici odabranih grupa (n=6).

Priprema biomase za ozoniranje

Svi ispitivani izolati iscrpljeni su na krutim LB podlogama do monokulture i inkubirani na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije, pripremljena je biomasa svakog pojedinog izolata koja odgovara koncentraciji bakterija od $1,5 \times 10^8$ CFU/mL tako da je pojedinačna kolonija dodana u 5 ml sterilne fiziološke otopine do postizanja turbiditeta koji odgovara turbiditetu 0,5 McFarland standarda. Turbiditet je izmjereno pomoću aparata DEN-1 Densitometar (Biosan, Latvija). Nakon toga, pripremljene su radne bakterijske suspenzije koncentracije $1,5 \times 10^7$ CFU/mL.

Određivanje utjecaja ozona na *K. pneumoniae*

Zbog otpornosti *K. pneumoniae* na različite biocidne agense (Liu i sur., 2023.) i visoku početnu koncentraciju inokuluma ($1,5 \times 10^7$ CFU/ml) u ovom je istraživanju određen utjecaj dviju, viših koncentracija (4 i 2 ppm) ozona otopljenog u vodi, te dva načina primjene (u obliku kapljica i maglice) na izolate *K. pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin (n=6). Ozon je prvo otopljen u vodovodnoj vodi pomoću uređaja za otapanje ozona (SIHON, 8 g/L) pri 22 °C. Koncentracija ozona u vodi od 2 ppm, u pravilu je postignuta unutar 10 minuta, a 4 ppm unutar 20 minuta pri 22 °C. Nakon otapanja, postignuta koncentracija ozona u vodi izmjerena je pomoću uređaja DOZ-30 Portable Dissolved Ozone Analyzer (Guangzhou Qili Environmental Equipment Co., Kina). Svaka kombinacija koncentracije i načina aplikacije otopljenog ozona ispitana je na svih šest sojeva biomase $1,5 \times 10^7$ CFU/mL, u duplikatima.

Svaki soj *K. pneumoniae* (bakterijsko opterećenje od $1,5 \times 10^7$ CFU/mL) tretiran je ozoniranom vodom (4 i 2 ppm) u obliku kapljica (naneseno raspršivačem, veličina kapljica=326 - 400 μm) ili maglice (naneseno fogerom pod pritiskom od 3 bara, veličina kapljica=145 - 225 μm) pri 22 °C. Nakon aplikacije, ozonirana voda je ostavljena da djeluje pet minuta. Kontrolni uzorci pripremljeni su na isti način kao i tretmani, osim što je umjesto vodene otopine ozona korištena sterilna voda iz slavine. Na kraju tretmana, tretirane bakterijske suspenzije i kontrole serijski su razrijeđene u sterilnoj fiziološkoj otopini (0,85 % NaCl, VWR Chemicals, Belgija) u omjeru 1:10. Dio (0,1 mL) svakog razrjeđenja inokuliran je na LB agaru i inkubiran na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije, izbrojene su narasle kolonije i izračunat je broj preživjelih bakterija prema formuli:

$$\text{Broj preživjelih bakterija [CFU/mL]} = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{faktor razrijeđenja}}{\text{volumen uzorka [mL]}}$$

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

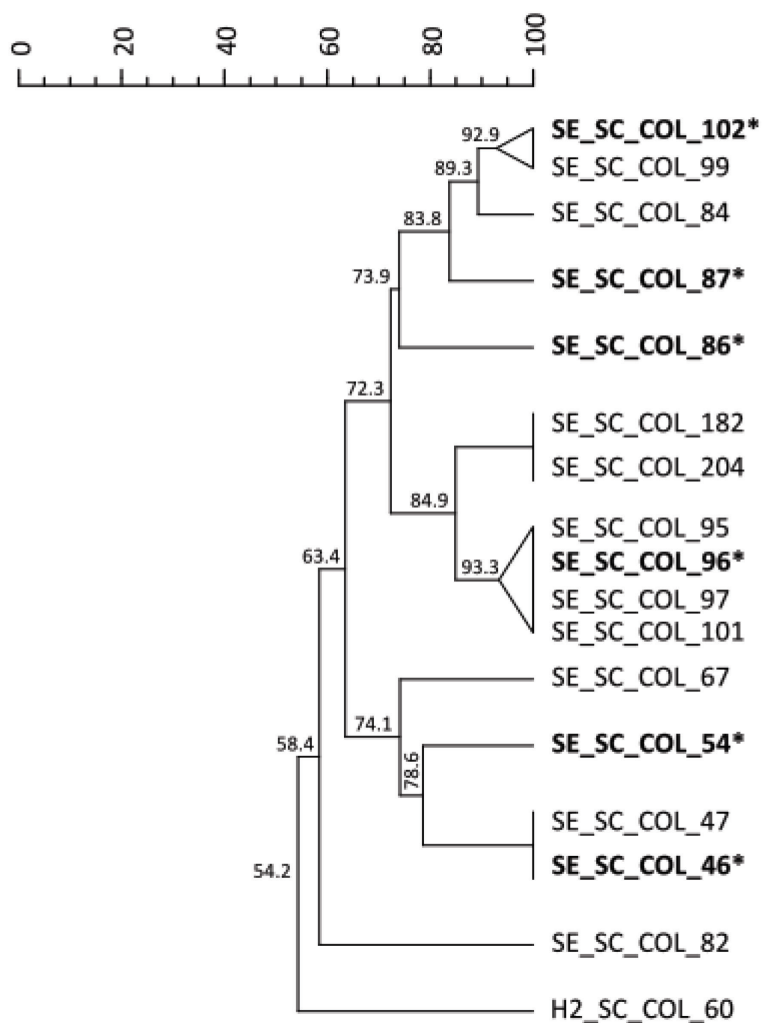
$$\text{Učinkovitost ozona [\%]} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{broj preživjelih kolonija nakon tretmana [CFU/mL]}}{\text{broj kolonija u kontroli [CFU/mL]}}\right)$$

Statistička analiza podataka

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

REZULTATI I DISKUSIJA

Kako je vidljivo iz Slike 1., postoji velika unutarvrstna raznolikost izolata ($n=17$). Na temelju 90 % sličnosti ispitivani sojevi grupirani su u 11 grupa. Od toga, samo četiri grupe sadrže više od jednog predstavnika, a u sedam grupa je svrstan samo jedan soj što pokazuje veliku varijabilnost sojeva unutar vrste *K. pneumoniae*. Za daljnje analize odabran je po jedan reprezentativan soj iz četiri najveće grupe i po dva soja iz grupa s jednim predstavnikom ($n=6$; Slika 1.).



Slika 1. Dendrogram sojeva *Klebsiella pneumoniae* grupiranih na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s $(GTG)_5$ početnicom. Sojevi su grupirani na temelju 90 % sličnosti. Reprezentativni sojevi su otisnuti deblje i označeni zvjezdicom.

Figure 1 Dendrogram of *Klebsiella pneumoniae* strains grouped based on rep-PCR profiles obtained by amplification with the $(GTG)_5$ primer. Strains were grouped based on 90% similarity. Representative strains are printed in bold and marked with an asterisk.

Baktericidni učinak ozonirane vode na šest karbapenem- i kolistin-rezistentnih sojeva *K. pneumoniae* prikazan je u Tablici 1. Iako je učinkovitost inaktivacije mikroorganizama primjenom obje koncentracije ozonirane vode (4 i 2 ppm) bila izuzetno visoka, postoje značajne razlike uzimajući u obzir primijenjenu koncentraciju te i koji je soj korišten u tretmanu, kao i na način aplikacije (kapljice u usporedbi s maglicom)

Tablica 1. Utjecaj ozona različitih koncentracija (4 i 2 ppm) i načina aplikacije (kapljice ili maglica) na sojeve *Klebsiella pneumoniae* (n=6). Brojnost sojeva *K. pneumoniae* prikazane su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama (n=2). Vrijednosti označene različitim slovima (a-c) unutar istog stupca predstavljaju statistički značajne razlike prema *post hoc* Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

Table 1 Effect of different concentrations of ozone (4 and 2 ppm) and method of application (drops or mist) on *Klebsiella pneumoniae* strains (n=6). The numbers of *K. pneumoniae* strains are shown as mean values with associated standard deviations (n=2). Values marked with different letters (a-c) within the same column represent statistically significant differences according to the *post hoc* Tukey HSD test ($p < 0.05$).

Soj <i>K. pneumoniae</i> Strain <i>K. pneumoniae</i>	Tretman Treatment	Koncentracija ozona / Ozone concentration [ppm]	Brojnost Number [log CFU/ml]	Redukcija brojnosti Reduction in numbers [%]
SE_SC_COL_46	Kapljice	0	6,88 ± 0,05 ^a	
		4	5,08 ± 0,08 ^b	98,42
		2	5,65 ± 0,02 ^b	94,19
	Maglica	0	6,90 ± 0,04 ^a	
		4	5,82 ± 0,01 ^b	91,75
		2	5,79 ± 0,03 ^b	92,15
SE_SC_COL_96	Kapljice	0	7,17 ± 0,07 ^a	
		4	4,94 ± 0,11 ^b	99,41
		2	5,98 ± 0,04 ^b	93,70
	Maglica	0	7,18 ± 0,05 ^a	
		4	5,24 ± 0,02 ^b	98,86
		2	5,29 ± 0,03 ^b	98,71
SE_SC_COL_86	Kapljice	0	7,16 ± 0,05 ^a	
		4	4,52 ± 0,05 ^b	99,77
		2	4,30 ± 0,09 ^b	99,86
	Maglica	0	7,16 ± 0,04 ^a	
		4	5,02 ± 0,06 ^b	99,27
		2	6,09 ± 0,06 ^b	91,41

Irina Tanuwidjaja i Mirna Mrkonjić Fuka: Utjecaj ozona na sojeve
Klebsiella pneumoniae rezistentne na karbapeneme i kolistin

SE_SC_COL_102	Kapljice	0	$7,13 \pm 0,06^a$	
		4	$5,36 \pm 0,05^b$	98,29
		2	$6,47 \pm 0,03^b$	78,19
	Maglica	0	$7,14 \pm 0,03^a$	
		4	$6,23 \pm 0,30^b$	85,47
		2	$7,05 \pm 0,07^a$	17,02
SE_SC_COL_54	Kapljice	0	$6,24 \pm 0,06^a$	
		4	$4,12 \pm 0,10^b$	99,23
		2	$3,92 \pm 0,05^b$	99,52
	Maglica	0	$6,20 \pm 0,03^a$	
		4	$4,97 \pm 0,09^{bc}$	94,04
		2	$5,52 \pm 0,04^c$	79,07
SE_SC_COL_87	Kapljice	0	$6,12 \pm 0,03^a$	
		4	$5,50 \pm 0,03^b$	76,38
		2	$4,89 \pm 0,10^c$	94,12
	Maglica	0	$6,12 \pm 0,03^a$	
		4	$5,52 \pm 0,03^b$	75,00
		2	$5,36 \pm 0,06^b$	82,67

Tako je ozon u koncentraciji od 4 ppm apliciran u obliku kapljica reducirao brojnost sojeva SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_96 i SE_SC_COL_86 za visokih 98,42 %, 99,41 % i 99,97 %, a u koncentraciji od 2 ppm za 94,19 %, 93,70 % i 99,86 %. U obliku maglice (4 ppm) redukcija je nešto manja i iznosi 91,75 % za soj SE_SC_COL_46 te 98,86 % i 99,27 % za sojeve SE_SC_COL_96 i SE_SC_COL_86. Najslabije je djelovanje zabilježeno za maglicu koncentracije 2 ppm koja je reducirala 92,15 %, 98,71 % i 91,41 % sojeva SE_SC_COL_46, SE_SC_COL_96 i SE_SC_COL_86. Međutim, kod sva tri soja nije uočena značajna razlika u redukciji brojnosti bakterija između različitih koncentracija i načina aplikacije ozona.

Sojevi SE_SC_COL_102, SE_SC_COL_54, SE_SC_COL_87 pokazuju nešto drugačiji profil preživljavanja. Tretman ozonom koncentracije 4 ppm u obliku kapljica pokazao je značajno baktericidno djelovanje (98,29 %) na soj *K. pneumoniae* SE_SC_COL_102, dok je u koncentraciji od 2 ppm reducirano 78,19 % ovih bakterija. Tretman maglicom u koncentraciji od 4 ppm djelovao je baktericidno na 85,47% SE_SC_COL_102, dok je u koncentraciji od 2 ppm

najmanje smanjena brojnost ispitivanog soja, i to za samo 17,02 %. Slični su rezultati zabilježeni i za soj *K. pneumoniae* SE_SC_COL_54. Tretman ozonom koncentracije 2 ppm u obliku maglice pokazuje značajno manje baktericidno djelovanje u odnosu na ostale tretmane. Tretman kapljicama koncentracije 4 ppm reducirao je brojnost ovih bakterija za 99,23 %, a koncentracije od 2 ppm za 99,52 %. Maglica ozonirana na 4 ppm djelovala je baktericidno na 94,04 % bakterija, a ozonirana na 2 ppm 79,07 % bakterija. Kod soja *K. pneumoniae* SE_SC_COL_87 baktericidan učinak pri višoj koncentraciji (4 ppm) ne ovisi o načinu primjene, dok pri nižoj koncentraciji (2 ppm) baktericidnom učinku značajno pridonosi i način aplikacije. Ozon u obliku kapljica koncentracije 4 ppm baktericidno je djelovalo na 76,38 % bakterija, a u koncentraciji 2 ppm na 94,12 % bakterija. Tretman maglicom ozoniranom na 4 ppm pokazao je redukciju brojnosti od 75 %, a isti tretman manjom koncentracijom neznajno više vrijednosti (82,67 %).

Biocidni učinak plinovitog ozona potvrđen je prema brojnim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama te mikroskopskim gljivama (Azuma i sur., 2022.; Białoszewski i sur., 2010.; Rangler i sur., 2022.; Santos i sur., 2021.; Tanuwidjaja i Mrkonjić Fuka, 2022.). Međutim, problem koji je povezan s plinovitom ozonom je njegova toksičnost (Gandhi i sur., 2020.). Jedan od način da se toksičnost svede na minimum je uporaba ozona otopljenog u vodi zbog čega se ozonirana voda sve češće koristi kao sredstvo za dezinfekciju (Mascarenhas i sur. 2021.). Otapanjem ozona u vodi omogućuje se njegova trenutna reakcija s bilo kojom biomolekulom, a istraživanja su dokazala učinkovitost ozonirane vode kao baktericidnog sredstva, što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Međutim, rezultati variraju uzimajući u obzir različite vrste bakterija u tretmanu te uvažavajući koncentraciju ozonirane vode. Tako su Santos i sur. (2021.) izložili Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te Gram-pozitivne *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* ozoniranoj vodi koncentracija ozona od 0,4, 0,6 i 0,8 ppm. Stopa smrti *E. coli* bila je veća od 95 % pri koncentraciji ozona od 0,4 ppm, dok je stopa smrtnosti soja *P. aeruginosa* bila 100 % pri istoj koncentraciji, jednako kao i *E. faecalis* i *S. aureus*. Donekle slične rezultate dobili su Zhang i sur. (2016.) i Giuliani et al. (2018.) koji su u istraživanjima učinka ozonirane vode na različite vrste bakterija evidentirali značajniji utjecaj na Gram-pozitivne mikroorganizme. U našem je istraživanju vidljivo i različito

djelovanje ozonirane vode na pojedine sojeve/ekotipove *K. pneumoniae*, što ukazuje na velike varijacije u učinku djelovanja, ne samo na različite vrste bakterija, već i na različite sojeve unutar iste vrste. Navedene razlike u efikasnosti ozona mogu se objasniti različitom osjetljivošću bakterijskih vrsta/sojeva na djelovanje ozona zbog prisutnosti različitih količina lipida i lipoproteina u staničnoj stijenci bakterija, kao i njihovom interakcijom s različitim membranskim proteinima (Ersoy i sur., 2019.). Također, uzimajući u obzir veliku otpornost *K. pneumoniae* na različite biocidne agense (Liu i sur., 2023.), ali i veliku početnu koncentraciju inokuluma ($1,5 \times 10^7$ CFU/ml) ne iznenađuju da je ozonirana voda u našem istraživanju djelotvorna pri višim koncentracijama ozona u usporedbi s istraživanjem koje su proveli Santos i sur. (2021.). Nadalje, u oba se slučaja radi o *in vitro* istraživanjima učinka ozonirane vode. Suprotno, u istraživanjima dezinfekcije otpadnih voda ili inaktivacije biofilмова karbapenem rezistentnih sojeva *K. pneumoniae* plinovitim ozonom, korištene su puno više koncentracije (25 do 80 ppm) kako bi se postigla inaktivacija mikroorganizama (Piletić i sur., 2022.; Rangler i sur., 2022.).

U pravilu, u našem istraživanju, na učinkovitost ozona otopljenog u vodi značajno je utjecala koncentracija ($p < 0,01$), ali ne i način primjene ozona (kapljica u usporedbi s maglicom) ($p > 0,05$), osim na dva soja *K. pneumoniae* (SE_SC_COL_87 i SE_SC_COL_102,) gdje je na učinkovitost, uz koncentraciju ($p < 0,01$), značajno utjecao i način primjene ozona ($p < 0,01$). Međutim, u svim opcijama tretmana i neovisno o korištenom soju, slično kao i u velikom broju dosadašnjih istraživanja, nije postignuta redukcija od $5 \log_{10}$ koja je nužna prema European Committee for Standardization (EN 1040:2006) već je maksimalna postignuta redukcija iznosila 99,86 % (redukcija od $2,86 \log_{10}$ CFU/mL) kada je ozonirana voda aplicirana u obliku kapljica odnosno 99,27 % (redukcija od $2,14 \log_{10}$ CFU/mL) u obliku maglice. Postizanje ove vrijednosti uvelike ovisi ne samo o koncentraciji ozona već i o koncentraciji početnog inokuluma ciljanih mikroorganizama. Tako su Santos i sur., (2021.) uočili smanjenje od $> 2,23 \log_{10}$ CFU/ml kada je *E. coli* koncentracije inokuluma od 5×10^5 CFU/ml bila izložena ozoniranoj vodi. Međutim, pri koncentraciji inokuluma jednakoj ili nižoj od 5×10^4 CFU/ml, primijećeno je smanjenje veće od $6 \log_{10}$ CFU/ml, tako da smanjena efikasnost u našem radu ne iznenađuje uzimajući u obzir korišteni inokulum ($1,5 \times 10^7$ CFU/mL).

ZAKLJUČAK

Učinkovitost inaktivacije rezistentnih sojeva *K. pneumoniae* primjenom veće i manje koncentracije ozona bila je izuzetno velika u oba slučaja. Prosječno bolje rezultate pokazala je voda zasićena većom koncentracijom (4 ppm) ozona bez obzira na način primjene (maglica ili kapljice).

Uzimajući u obzir biocidni aspekt ozona prikazan našim rezultatima, ozonirana voda je potencijalno sredstvo za dezinfekciju i dekontaminaciju površina te sredstvo za smanjenje širenja mikroorganizama otpornih na lijekove u okolišu. Međutim, način aplikacije kao i koncentracije ozonirane vode moraju biti pažljivo testirane uvažavajući različite vrste i sojeve bakterija te koncentraciju početnog inokuluma.

LITERATURA

1. Azuma T., Usui M., Hayashi T. (2022.): Inactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria in Wastewater by Ozone-Based Advanced Water Treatment Processes. *Antibiotics*, 11: 210.
2. Bagley S.T. (1985.): Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infection Control*, 6(2): 52-58.
3. Bataklijev T., Georgiev V., Anachkov M., Rakovsky S., Zaikov G.E. (2014.): Ozone Decomposition. *Interdisciplinary Toxicology*, 7: 47-59.
4. Białoszewski D., Bocian E., Bukowska B., Czajkowska M., Sokół-Leszczynska B., Tyski S. (2010.): Antimicrobial activity of ozonated water. *Medical Science Monitor*, 16(9): 71-5.
5. Chang D., Sharma L., Dela Cruz C.S., Zhang D. (2021.). Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Frontiers in Microbiology*. 12: 750662.
6. Correia S.E., Pertegal V., Herraiz-Carboné M., Lacasa E., Cañizares P., Rodrigo M.A., Sáez C. (2024.): Inactivation of waterborne *Klebsiella pneumoniae* with ozone to diminish the risk of hospital effluents using an absorption-based process. *Journal of Water Processing Engineering*, 57: 104732.
7. Díaz-López M., Nicolás E., López-Mondéjar R., Galera L., Garrido I., Fenoll J., Bastida F. (2021.): Combined Ozonation and Solarization for the Removal of Pesticides from Soil: Effects on Soil Microbial Communities. *Science of Total Environment*, 758: 143950.

8. Domig K.J., Kiss H., Petricevic L., Viernstein H., Unger F., Kneifel W. (2014.): Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Beneficial Microbes*, 5(3): 263-272.
9. Ersoy Z.G., Barisci S., Dinc O. (2019.): Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* Inactivation by Ozone. *LWT – Food Science and Technology*, 100: 306–313.
10. Furlan J.P.R., Stehling E.G. (2021.): Multiple sequence types, virulence determinants and antimicrobial resistance genes in multidrug- and colistin-resistant *Escherichia coli* from agricultural and nonagricultural soils. *Environmental Pollution*, 288: 117804.
11. Furlan J.P.R., Sellera F.P., Stehling E.G. (2023.): Strengthening genomic surveillance of carbapenemases in soils: a call for global attention. *Lancet Microbe*, 4: e386–e387.
12. Furlan J.P.R., da Silva Rosa R., Ramos M.S., dos Santos, L.D.R., Savazzi E.A., Stehling E.G. (2024.): Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* species complex from agrifood systems: detection of ST6326 co-producing KPC-2 and NDM-1. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104: 7347-7354.
13. Greene A.K., Güzel-Seydim Z.B., Seydim A.C. (2012.): Chemical and Physical Properties of Ozone. In *Ozone in Food Processing*; O'Donnell, C., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Rice, R.G., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Chichester, West Sussex, UK, pp. 19–32.
14. Giuliani G., Ricevuti G., Galoforo A., Franzini M. (2018.): Microbiological aspects of ozone: Bactericidal activity and antibiotic/ antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. *Ozone Therapy*, 3(3).
15. European Committee for Standardization (2006.): EN 1040-Basic Bactericidal Activity. UNE-EN 1040:2006. Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Basic Bactericidal Activity (Phase 1). Accredited by ENAC; European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, 2006; Vol. 44.
16. Gandhi C.K., Mikerov A.N., Durrani F., Umstead T.M., Hu S., Wang G., Phelps D.S., Floros J. (2020.): Impact of Ozone, Sex, and Gonadal Hormones on Bronchoalveolar Lavage Characteristics and Survival in SP-A KO Mice Infected with *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, 8:1354.
17. Janda J.M., Abbott S.L. (2021.): The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2):e00174-20.

18. Kim B., Park A.R., Song C.W., Song H., Kim J.C. (2022.): Biological Control Efficacy and Action Mechanism of *Klebsiella pneumoniae* JCK-2201 Producing Meso-2,3- Butanediol Against Tomato Bacterial Wilt. *Frontiers in Microbiology*, 13:914589.
19. Larsson D.G.J. Flach C.F. (2021.): Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20:257–269.
20. Liu X., Gong L., Liu E., Li C., Wang Y., Liang J. (2023.): Characterization of the Disinfectant Resistance Genes *qacEΔ1* and *cepA* in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10(1):136-141.
21. Mascarenhas L.A., Oliveira F.O., da Silva E.S., dos Santos L.M., de Alencar Pereira Rodrigues, L., Neves P.R., Santos A.Á., Moreira G.A, Lobato G.M., Nascimento C., Gerhardt M., Machado B.A.S. (2021.): Technological Advances in Ozone and Ozonized Water Spray Disinfection Devices. *Applied Science*, 11: 3081.
22. Nordmann P., Cuzon G., Naas T. (2009.): The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 9: 228-36.
23. Özen T., Koyuncu M.A., Erbaş D. (2021.): Effect of Ozone Treatments on the Removal of Pesticide Residues and Postharvest Quality in Green Pepper. *Journal of Food Science Technology*, 58: 2186–2196.
24. Park A. J., Krieger J. R., Khursigara C. M. (2016.): Survival proteomes: the emerging proteotype of antimicrobial resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(3): 323–342.
25. Paul A., Radhakrishnan M., Anandakumar S., Shanmugasundaram S., Anandharamkrishnan C. (2020.): Disinfestation Techniques for Major Cereals: A Status Report. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 1125–1155.
26. Piletić K., Kovač B., Perčić M., Žigon J., Broznić D., Karleuša L., Lučić Blagojević S., Oder M., Gobin I. (2022.): Disinfecting Action of Gaseous Ozone on OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Biofilm In Vitro. *International Journal of Environmental Research*, 19(10):6177.
27. Postgate J. (1998.): *Nitrogen Fixation* (3rd ed.). Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-64047-3.
28. Prudente A.D., King J.M. (2002.): Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. *Journal of Food Science*, 67: 2866–2872.

29. Puljko A., Barišić I., Dekić Rozman S., Križanović S., Babić I., Jelić M., Maravić A., Udiković-Kolić N. (2024.): Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem and colistin resistance in *Klebsiella* and other Enterobacterales from treated wastewater in Croatia. *Environment International*, 185:108554.
30. Rangel K., Cabral F.O., Lechuga G.C., Carvalho J.P.R.S., Villas-Bôas M.H.S., Midlej V., De-Simone S.G. (2022.). Potent Activity of a High Concentration of Chemical Ozone against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Molecules*, 27(13):3998.
31. Raudales R.E., Parke J.L., Guy C.L., Fisher P.R. (2014.): Control of Waterborne Microbes in Irrigation: A Review. *Agricultural Water Management*, 143: 9–28.
32. Rice R.G., Graham D.M. (2001.): U.S. FDA Regulatory Approval of Ozone as an Antimicrobial Agent – What Is Allowed and What Needs to Be Understood. *Ozone News*, 29: 22–31.
33. Rojas L.J., Salim M., Cober E., Richter S.S., Perez F., Salata R.A., Kalayjian R.C., Watkins R.R., Marshall S., Rudin S.D., Domitrovic T.N., Hujer A.M., Hujer K.M., Doi Y., Kaye K.S., Evans S., Fowler V.G., Bonomo R.A., van Duin D. (2017.): Antibacterial Resistance Leadership Group. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clinical Infectious Diseases*, 64(6):711-718.
34. Santos L.M.C., Silva, E.S., Oliveira F.O., Rodrigues L.D.A.P., Neves P.R.F., Meira C.S., Moreir, G.A.F., Lobato G.M., Nascimento C., Gerhardt M., Lessa A.S., Mascarenhas L.A.B, Machado B.A.S. (2021.): Ozonized Water in Microbial Control: Analysis of the Stability, In Vitro Biocidal Potential, and Cytotoxicity. *Biology*, 10: 525.
35. Švec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings J. (2005.): Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1): 59-63.
36. Tanuwidjaja I., Mrkonjić Fuka M. (2022.): Ozone in Droplets and Mist in Inhibition of Phytopathogenic Microbiota. *Agriculture*, 12: 1875.
37. Thanomsub B., Anupunpisit V., Chanphetch S., Watcharachaipong T., Poonkhum R., Srisukonth C. (2002.): Effects of Ozone Treatment on Cell Growth and Ultrastructural Changes in Bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 48: 193–199.
38. Vitali G., Valdenassi L. (2019.): Use of Ozone in Water, Agriculture and Zootechnics: Relationships between Dysbiosis and Mental Disorders. *Ozone Therapy*, 4: 8182.

39. Zhang Y.J., Hu H.W., Chen Q.L., Singh B.K., Yan H., Chen D., He J.Z. (2019.): Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes. *Environment International*, 130: 104912.
40. Zhang Y., Wu Q., Zhang J., Yang X., Desk S. (2016.): Alteration in *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* cells induced by ozone. *SDRP Journal of Food Science and Technology*, 1(3): 106-112.

Adrese autora – Authors addresses:

Dr. sc. Irina Tanuwidjaja
e-mail: ianuwidjaja@agr.hr
Zavod za kemiju,
Zavod za mikrobiologiju,
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka
e-mail: mfuka@agr.hr, dopisni autor
Zavod za mikrobiologiju
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet,
Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb

Primljeno – received:

16.10.2024.

Revidirano – revised:

28.11.2024.

Prihvaćeno – accepted:

12.12.2024.

