

PREŽIVLJAVANJE LEGIONELA U MORSKOJ VODI

doc. dr. sc. Dijana Tomić Linšak

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet,
Braće Branchetta 20, Rijeka, Hrvatska
dijanatl@uniri.hr

Andrea Gašaj, mag. sanit. ing.

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Braće Branchetta 20, Rijeka, Hrvatska

izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Braće Branchetta 20, Rijeka, Hrvatska

Legionele se primarno nalaze u vodenim sredinama, najčešće umjetno stvorenim, kao što su sustavi s toplom vodom, *jacuzzi*ji, rekreacijski bazeni, klima uređaji i slično. Dobro je poznata činjenica da legionele preživljavaju u slatkovodnim sustavima, no preživljavanje uz visoke koncentracije soli nije detaljno ispitano. U ovoj studiji *in vitro* pokusima ispitano je preživljavanje *Legionella* u uzorcima morske vode, vodovodne vode te klorirane vode iz morskog bazena. Korištena su dva soja bakterije, *Legionella pneumophila* ATCC BAA-74 kao klinički izolat i *Legionella pneumophila* ST82 koja je izolirana iz morskog bazena.

U sirovoj morskoj vodi, kao i u vodovodnoj vodi obje vrste bakterije preživljavaju više od 30 dana. U filtriranoj morskoj vodi *L. pneumophila* soj ST82 preživljava preko 30 dana, dok *L. pneumophila* ATCC BAA-74 ugiba unutar 25 dana. Važan faktor u preživljavanju oba soja je i razrjeđenje klorirane morske vode s nekloriranom vodovodnom vodom. Rezultati ukazuju da je neophodna konstantna kontrola i pridržavanje protokola održavanja voda u hotelskim sustavima, te je neophodno uvođenje dodatnih protokola za bazene s morskom vodom. Jedino adekvatnim procesima higijene i monitoringa možemo dovesti do značajnijeg smanjenja rizika od pojave legionarske bolesti i njenog širenja.

Ključne riječi: *Legionella pneumophila*, morska voda, preživljavanje bakterija

1. UVOD

Legionella je ubikvitarna, fakultativno unutarstanična gram negativna bakterija koja se najčešće nalazi u prirodnim vodenim sustavima. Zbog faktora kao što su temperatura i važne hranjive tvari koje pospješuju njen rast prisutna je i u umjetnim vodenim sustavima kao što su bazeni, *jacuzzi*ji, klima uređaji. Legionela se prenosi udisanjem kontaminiranih aerosola i predstavlja važnog patogena koji može uzrokovati infekcije u vidu atipične pneumonije. Bolesti izazvane legionelom skupno se nazivaju legionelozama i svoju prvu pojavu bilježe u drugoj polovici 20. stoljeća (Abdel-Nour i dr. 2013.). U porodici *Legionellaceae* najznačajniji predstavnik svakako

jest *Legionella pneumophila* koja se smatra najčešćim uzročnikom i može uzrokovati legionarsku bolest i pontijačku groznicu. U ovu porodicu pripada minimalno 62 vrste bakterija s preko 70 različitih serogrupa (Khawek i dr. 2018.). *L. pneumophila* je sposobna preživjeti u uvjetima koji nisu prilagođeni za njeno umnažanje. U tim uvjetima, bakterije su izložene stresu i limitacijama kao i promjenama u temperaturama, salinitetu, kisiku i pH. Upravo zbog toga razvile su stanje koje se naziva vijabilnim, ali ne kultivabilnim stanjem (VBNC) u kojem se nalaze dok uvjeti ne postanu povoljni za njihovo

umnažanje (Potočnjak i dr. 2012.). Tradicionalno je stajalište da legionele, posebno *L. pneumophila*, ne opstaju u slanim vodama te je samo nekoliko studija izvijestilo da morska voda također može biti potencijalni rezervoar za *Legionella spp.* (Ortiz-Roque i Hazen 1987.; Palmer i dr. 1993.). Nadalje, neke *in vitro* studije ukazale su da je viša koncentracija NaCl bila kritična za njihov opstanak (Catrenich i Johnson 1989.). Također, studija koju su proveli Heller i dr. (1998.) dokazala je da je osjetljivost legionela na NaCl ovisna o temperaturi medija posebice što je viša temperatura to je viša i osjetljivost ovih bakterija. U istraživanju Fields i suradnika (2002.) *L. pneumophila* mogla se oporaviti iz prirodne morske vode Baltika i Sjevernog mora sa slanošću od 15 ‰ i 30 ‰, čak i nakon 7 dana od inokulacije. Drugo istraživanje također sugerira da bi legionele u slanom okruženju, poput obalnih morskih područja i ušća, mogle postojati u vijabilnim stanjima. (Gast i dr. 2011.). Cilj našeg istraživanja bio je *in vitro* ispitati utjecaj mikrobiote u uzorcima sirove morske i deklorirane vodovodne vode,

kao i razrjeđenja klorirane morske vode iz bazena na preživljavanje *L. pneumophila*.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Materijali i metode

2.1.1 Uzorci morske i vodovodne vode

Svaki uzorak vode prikupljen je u količini od 1 L i čuvan je u odvojenoj označenoj boci. Uzorak sirove morske vode potječe s obale otoka Malog Lošinja, klorirana morska voda iz rekreacijskog bazena i vodovodne vode iz javne vodoopskrbe grada Rijeke. Uzorak sirove morske vode filtriran je kroz filter sterilnih štrcaljki od 0,45 μm CA. Dekloriranje vodovodne i morske vode je napravljeno dodatkom natrijeva tiosulfata (Kemika, Hrvatska) u koncentraciji od 0,05 g/L. Vodovodna voda za pripremu bakterijskih suspenzija kao i pripremu serijskih desetorostrukih razrjeđenja je deklorirana i sterilizirana autoklaviranjem (121 °C / 15 min) i čuvana na 4 °C do upotrebe.

Tablica 1: Metode korištene u ispitivanju fizikalno-kemijskih parametara uzoraka pitke i morske vode

Parametar	Metoda
Temperatura	Umjereni alkoholni termometar sa graduiranim intervalom od 0,1 °C
Temperatura uzorka	Umjereni alkoholni termometar sa graduiranim intervalom od 0,1 °C
Slobodni klor	EN ISO 7393-2:2018 (Kvaliteta vode -- Određivanje slobodnoga i ukupnoga klora -- 2. dio: Kolorimetrijska metoda s N,N-dietil-1,4-fenilendiaminom u svrhu rutinske kontrole (ISO 7393-2:2017; EN ISO 7393-2:2018)
Boja	Standardne metode 23. izd. 2017. 2120.APHA, AWWA, WEF (Određivanje boje, granica kvantifikacije 5 jedinica Pt/Co ljestvice
Mutnoća	EN ISO 7027-1:2016 (Kvaliteta vode - Određivanje mutnoće Kvantitativne metode (ISO 7027-1:2016; EN ISO 7027-1:2016)
pH	EN ISO 10523:2012 (Kvaliteta vode- određivanje pH)
Vodljivost	EN 27888:1993 (Kvaliteta vode – Određivanje električne vodljivosti; granica kvantifikacije μS/cm)
Utrošak KMnO ₄	EN ISO 8467:1995 (Kvaliteta vode – Određivanje permanganatnog indeksa; (ISO 8467:1993; EN ISO 8467:1995)
Trihalometani	EN ISO 10301:1997 (Kakvoća vode -- Određivanje lakohlapljivih halogeniranih ugljikovodika -- Metode plinske kromatografije (ISO 10301:1997; EN ISO 10301:1997); granica kvantifikacije za Kloroform 0.75 μg/L, Bromdiklorometan: 0.75 μg/L, Dibromoklorometan: 0.75 μg/L, Bromoform: 0.75 μg/L)
Salinitet	Standardne metode 23. Izd. 2017. 2520 B. APHA, AWWA, WEF (Određivanje saliniteta – konduktometrijska metoda; raspon 0-40 ‰)

EN ISO: International Organization for Standardization; APHA; American public health association; AWWA, - American water works association; WEF Water environment federation

2.1.2 Fizikalno–kemijska karakterizacija uzorka

Utvrđena su fizikalno–kemijska svojstva morske i vodovodne vode prema standardnim ISO uputama, a korištene metode prikazane su u [tablici 1](#).

2.2 Bakterije

U pokusu je korišten klinički izolat bakterije *Legionella pneumophila*, ATCC BAA–74, dobivena ljubaznošću prof.dr.sc. E. Hartland sa Sveučilišta u Melbourneu, u Australiji. Drugi korišteni soj *Legionella pneumophila* je ST82 podgrupa Allentown/France, izoliran je iz bazena s morskom vodom u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo u Rijeci (Tomić Linšak i dr. 2021.). Bakterije su čuvane u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u 10 % - tnom glicerol bujonu. Nakon uzgoja 3 – 5 dana na BCYE podlozi pri $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi obogaćenju 4 – 5 % CO_2 , bakterija se koristila u pokusima.

2.3 Određivanje ukupnog broja bakterija u sirovim uzorcima morske i vodovodne vode

U uzorcima vodovodne i sirove morske vode se prije početka rada određivala prisutnost mikrobiote vode, odnosno ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija inkubiranih na $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon homogenizacije i neutralizacije kloro dodatkom natrijeva tiosulfata (vodovodna voda), 1 ml uzorka prenesen je na dno Petrijeve zdjelice i prelijevan, uz miješanje rastopljenim i na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohlađenim agarom s kvaščevim ekstraktom (Biolife, Italija). Podloge su zatim inkubirane na $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i očitavane nakon 48 – 72 sata.

2.4 Priprema bakterijskog inokuluma

Broj bakterija u inokulumu određen je spektrofotometrijskom metodom nakon pripreme bakterijske suspenzije u sterilnoj vodovodnoj vodi. Apsorbancija se mjerila pri 600 nm i namještena je na OD1 (engl. Optical Density). Ta apsorbancija označava koncentraciju bakterija od 1×10^9 CFU/mL. Nakon toga bakterije su dodane u pripremljene uzorke vode (filtrirane i nefiltrirane uzorke sirove morske i deklorirane vodovodne vode) i početna koncentracija bakterija je iznosila 10^6 CFU/mL. Bakterijski inokulum za ispitivanje razrijeđenja klorirane morske vode na preživljavanje legionela je rađen u dekloriranoj morskoj vodi te je razrijeđen u kombinaciji klorirane morske vode i deklorirane vodovodne vode 1 : 5 ili 1 : 1.

2.5 Preživljavanje legionela u uzorcima voda

Preživljavanje legionela u uzorcima sirove morske vode, sirove deklorirane vodovodne vode te filtrirane morske i deklorirane vodovodne vode se pratilo tijekom 30 dana na temperaturi od $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Broj poraslih kolonija legionela pratio se na neselektivnoj BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) podlozi (Oxoid, UK) uz dodatak za rast koji sadrži željezni pirofosfat, L - cistein HCl i α - ketoglutarat (Oxoid, UK). Broj bakterije u sirovim uzorcima morske vodovodne vode određivan je nasađivanjem i na selektivnu Glycine

Vancomycin Polymyxin Cycloheximide (GVPC) (Biolife, Italija) podlogu uz prvotnu pripremu desetorostrukih razrjeđenja u mikrotitarskim pločicama. Kako bi ispitali da li razrjeđivanje klorirane morske vode s dekloriranim vodovodnom vodom pogoduje preživljavanju bakterija, pokus je izveden u različitim omjerima (1 : 1, 1 : 5 i 1 : 10).

2.6 Ispitivanje vijabilnosti bakterija

Kako bi prikazali vijabilnosti legionela u ispitivanim uzorcima morske vode upotrijebljeno je bojenje propusnosti citoplazmatske membrane (Dead BacLight bacterial viability kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), prema protokolu koji je savjetovao proizvođač. Kratko, stanice legionela u uzorcima sirove morske vode (20. dan) su obojene s dvije boje koje se vežu na nukleinsku kiselinu, propidijum jodid (PI) i SYTO–9. Nakon 15 minuta inkubacije bez svjetla, preparati su isprani, uklopljeni te mikroskopirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Tokio, Japan). Za mikroskopiranje se koristilo imerzioni objektiv povećanja 100 x.

3. REZULTATI I RASPRAVA

S obzirom na veliku sposobnost adaptacije na nepovoljne uvjete, za legionele se može reći da preživljavaju u raznim uvjetima s malom koncentracijom potrebnih nutrijenata za rast dok je njihova temperatura optimalna za rast $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH između 5,0 i 8,5. Osim temperature i pH, na rast legionela utječe i prisutnost različitih iona te mikroorganizama koji se prirodno nalaze u vodama (mikrobiota voda) (Rakić i dr. 2013.; Potočnjak i dr. 2012.). Naši nedavno publicirani rezultati prikazuju izolaciju i karakterizaciju soja *L.pneumophila* serogrupa 1 kao Allentown/France podskupina. Zatim je izolat uspješno genotipiziran kao ST82 (Tomić Linšak i dr. 2021.).

Uzorci sirove morske te vodovodne vode u kojima je ispitivana vijabilnost bakterija prethodno su fizikalno–kemijski okarakterizirani, a dobiveni rezultati prikazani su u [tablici 2](#).

Očekivano, iz navedenih rezultata vidljiva je razlika u vodljivosti pojedinih uzoraka. Naime vodljivost uzorka vodovodne vode bitno je manja zbog izostanka veće količine kloridnih iona koje nalazimo u morskoj vodi. U kloriranoj morskoj vodi ispitala se i prisutnost trihalometana kao nusprodukata dezinfekcije klorom. Trihalometani nastaju reakcijom kloro sa organskim tvarima koje su prisutne u bazenskoj vodi. Glavni izvor organske tvari u bazenima su s jedne strane tvari prisutne u vodi kojom se bazen puni i s druge strane kupači i kozmetička sredstva koja koriste. Klorinacijom morske vode mogu nastati dodatni problemi koje uzrokuju prirodni sastojci morske vode. Primjer su bromidi koji će primjenom klorinacije generirati više bromiranih trihalometana koji su toksičniji od kloriranih trihalometana (Padhi i dr. 2012.; Padhi i dr. 2019.).

Da bi se ispitalo da li prisutnost mikrobiote u sirovoj i dekloriranoj bazenskoj morskoj i dekloriranoj vodovodnoj

Tablica 2: Fizikalno-kemijski parametri uzoraka pitke i morske vode

Parametar	Mjerna jedinica	Vodovodna voda	Sirova morska voda	Klorirana morska voda
Temperature zraka	°C	28,0	26,5	24,0
Temperature uzorka	°C	18,0	24,7	32,0
Slobodni klor	mg/L	0,05	ND	1,05
Boja	°Pt/Co	<5	<5	<5
Mutnoća	NTU	206	0,28	0,20
pH	pH	8,2	7,6	7,1
Vodljivost	μS/cm	398	52400	52900
Utrošak KMnO4	mg/L O2	0,58	0,75	0,7
Trihalometani	μg/L	ND	ND	95
Salinitet	psu	ND	36	35

ND – nije detektirano

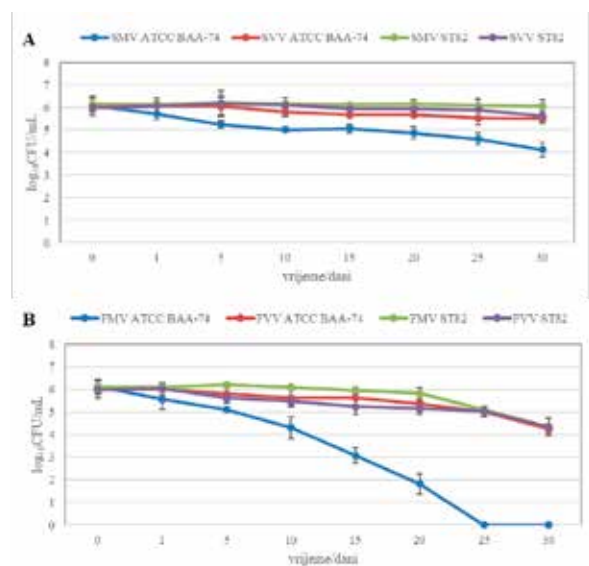
vodi utječu na preživljavanje legionela, određivan je ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija uzgajanih na 22±2 i 35±2 °C. Nakon inkubacije 48 – 72 sata na 22±2 i 35,2 °C očitani su rezultati ukupnog broja bakterija na kvaščevom agaru. U tablici 3 prikazani su rezultati navedene analize.

Tablica 3: Mikrobiološki parametri uzoraka pitke i morske vode

Uzorak	UBK (22 °C)/ CFU/mL	UBK (35 °C)/ CFU/mL
Vodovodna voda	10	3
Sirova morska voda	7	7
Klorirana morska voda	4	0

Iz prikazane tablice 3 vidljivo je da uzorci sirove morske, vodovodne i klorirane bazenske vode nisu bili prethodno opterećeni mikrobiološkim onečišćenjem iako je detektirana prisutnost bakterija. U sirovoj morskoj vodi je dokazano 7 CFU/mL kultiviranih na 22 °C, dok je u vodovodnoj vodi dokazano 10 CFU/mL. Naime, sirovi uzorak mora je uzet s obale otoka Mali Lošinj na nenaseljenom području kako bi izbjegli utjecaj organskog onečišćenja na preživljavanje legionela.

Zatim se ispitivalo preživljavanje oba soja legionela, *L. pneumophila* ATCC BAA-74 i *L. pneumophila* ST8, u sirovim i filtriranim uzorcima morske i vodovodne vode. Početna doza bakterija s kojom je započeto istraživanje jest 10⁶ bakterija, a uzorci su se inkubirali na 35±2 °C. Istraživanje je provedeno 30 dana. Na slici 1 prikazane su krivulje preživljavanja *L. pneumophila* ATCC BAA-74 i *L. pneumophila* ST82 u sirovim i filtriranim uzorcima morske i deklorirane vodovodne vode.



Slika 1: Krivulja preživljavanja *L. pneumophila* ATCC BAA-74 i *L. pneumophila* ST82 u sirovim (A) i filtriranim (B) uzorcima morske vode i deklorirane vodovodne vode. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL ± SD. Kratice označavaju sirovu vodovodnu vodu (SVV), sirovu morsku vodu (SMV), te filtriranu morsku vodu (FMV) i filtriranu vodovodnu vodu (FVV).

U sirovoj morskoj vodi nakon 24-satne inkubacije inhibiran je rast 57,3 % bakterija, dok je 10. dan inhibicija iznosila 91,5 %, odnosno broj bakterija je pao za 1 logaritamsku jedinicu. 30. dan inkubacije u sirovoj morskoj vodi je izolirano 4,0x10⁴ CFU/mL, odnosno došlo je do redukcije za 1,96 logaritamske jedinice. U sirovoj dekloriranoj vodovodnoj vodi ATCC BAA-74 soj dobro preživljava i 30. dan je izolirano 3,0x10⁵ CFU/mL, odnosno došlo je do redukcije za 0,5 logaritamske jedinice.

Izolirano iz morske vode, *L. pneumophila* ST82 dobro preživljava u sirovoj morskoj vodi te je 30. dan dokazano

$1,2 \times 10^6$ CFU/mL. U sirovoj dekloriranoj vodovodnoj vodi 25. dan zabilježena je 24,1 % inhibicija, a 30. dan 60 % inhibicija i broj bakterija se snizio za 0,9 logaritamske jedinice.

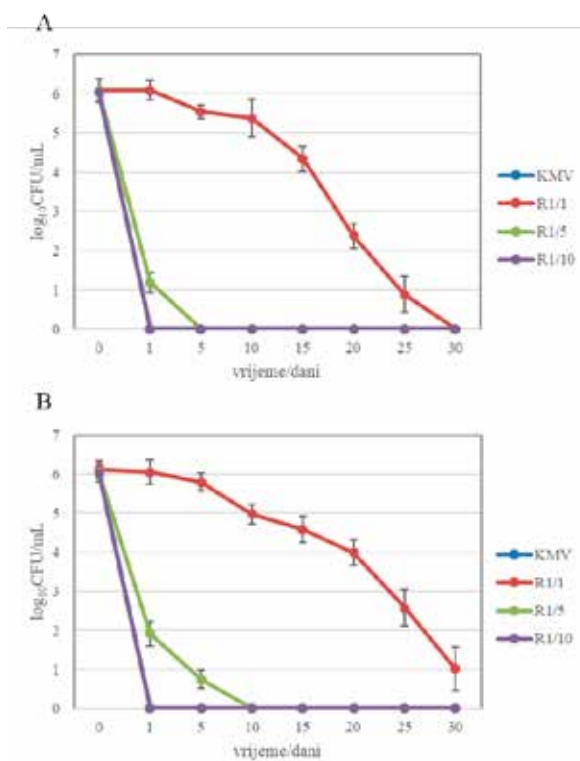
U filtriranoj morskoj vodi ATCC BAA-74 soj *L. pneumophila* već nakon 24-satne inkubacije dolazi do 73 % inhibicije, 15. dan 99,91 % inhibicije te 20. dan 99,99 % inhibicije. 20. dan dokazano je $6,7 \times 10^2$ CFU/mL, što ukazuje na inhibiciju za 4,3 logaritamske jedinice. Nakon 25. dana kultivabilne bakterije nisu dokazane u uzorcima. U filtriranoj dekloriranoj vodovodnoj vodi ATCC BAA-74 soj je inhibiran za 58,2 % odnosno 0,38 logaritamske jedinice 7. dan inkubacije. Na 30. dan inkubacije izolirano je $1,8 \times 10^4$ CFU/mL, odnosno došlo je do 98,2 % inhibicije.

L. pneumophila ST82 u filtriranoj morskoj vodi preživljava 30 dana kada je zabilježeno $2,17 \times 10^4$ CFU/mL, odnosno došlo je do 98,4 % inhibicije. Do pada broja bakterija dolazi 15. dan za 27 % te 20. dan za 48 % u odnosu na početni broj bakterija. U filtriranoj dekloriranoj vodovodnoj vodi dolazi do pada broja bakterija nakon 5. dana, kada je zabilježena 57 % inhibicija. 30. dan je dokazano $2,2 \times 10^4$ CFU/mL, odnosno došlo je do redukcije za 1,66 logaritamske jedinice.

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da *L. pneumophila* ATCC BAA-74 lošije preživljava u morskoj vodi, što je izraženije u filtriranoj morskoj vodi. Izolat iz mora, *L. pneumophila* ST82 duže preživljava u morskoj vodi i na preživljavanje isto tako utječe mikrobiota morske vode, budući da pad broja bakterija bilježimo nakon 20. dana inkubacije. U dekloriranoj vodovodnoj vodi mikrobiota vode utječe na preživljavanje oba soja *L. pneumophila*. O utjecaju mikrobiote voda na preživljavanje legionela nema puno podataka u literaturi. Jedno od objašnjenja boljeg preživljavanja legionela uz mikrobiotu je da su ove bakterije u nekom metabolički povezanom odnosu. Drugo objašnjenje je da ugibanjem bakterija prisutnih u morskoj vodi, iste postaju hrana legionelama. Daljnja istraživanja u smjeru ispitivanja odnosa različitih vrsta bakterija u vodenim sustavima su nužna.

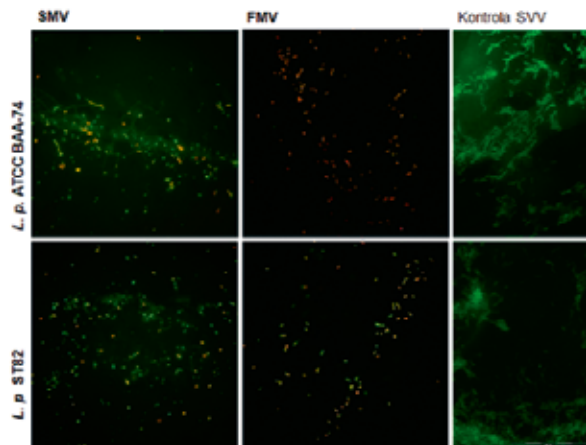
Vrlo česta praksa u bazenima s morskom vodom je nadopunjavanje s vodovodnom vodom. Iako nije prikazano u rezultatima, razrjeđivanje klorirane morske vode s kloriranom vodovodnom vodom dovelo je do brze i efikasne inhibicije obje vrste legionela unutar sata. Međutim, budući da je tijekom incidenta kada je izolirana *L. pneumophila* ST82 iz bazena s morskom vodom, nivo vode održavan vodovodnom vodom iz slavine koja se rijetko koristi, odlučili smo kloriranu morsku vodu razrijediti dekloriranom vodovodnom vodom. Na slici 2 prikazane su krivulje preživljavanja *L. pneumophila* ATCC BAA-74 (A) i *L. pneumophila* ST82 (B) u kloriranim uzorcima morske vode i razrjeđenjima klorirane morske vode s nekloriranom vodovodnom vodom.

Iz grafikona se vidi da obje vrste legionela unutar 24 sata ugibaju u kloriranim uzorcima morske vode kao i u uzorcima klorirane morske vode razrijeđene s nekloriranom vodovodnom vodom u omjeru 1 : 5 i 1 : 10



Slika 2: Krivulja preživljavanja *L. pneumophila* ATCC BAA-74 (A) i *L. pneumophila* ST82 (B) u kloriranim uzorcima morske vode (KMV) i razrjeđenjima klorirane morske vode s dekloriranom vodovodnom vodom R 1 : 1, R 1 : 5 i R 1 : 10. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL ± SD.

(99,99 %). Kada je uzorak klorirane morske vode razrijeđen u omjeru 1 : 1, obje vrste legionela su duže preživljavale. *L. pneumophila* ATCC BAA-74 je preživljavala do 30. dana, kada nije dokazan porast kultivabilnih bakterija. Izolat iz morske vode je duže preživio u razrjeđenjima klorirane morske vode 1 : 5 i 1 : 1. Kod razrjeđenja 1 : 5 bakterije su dokazane i 5. dan inkubacije $8,2 \times 10^2$ CFU/mL. U uzorku morske vode razrijeđenim 1 : 1, kultivabilne bakterije su dokazane i 30. dan inkubacije ($1,0 \times 10^2$ CFU/mL). Navedeno ukazuje na potrebu pisanja smjernica za održavanje bazena sa morskom ili bočatom vodom budući da različiti faktori mogu dovesti do kontaminacije ovih voda s legionelama, no i drugih bakterija koje pripadaju skupini oportunističkih patogena vodovodnih sustava. U ovu skupinu ubrajamo bakterije roda *Pseudomonas*, netuberkulozne mikrobakterije (*Mycobacterium avium* grupu), *Stenotrophomonas* i ostale bakterije (Falkinham i dr. 2015.). Ova skupina bakterija, osim što pokazuje izvanredne adaptacijske sposobnosti u vodovodnom sustavu pokazuju otpornost prema klorinaciji i povišenoj temperaturi, što predstavlja sve veći javnozdravstveni problem. Jedan od načina kako preživljavaju uvjete u vodovodnim sustavima je stvaranje biofilma i to mješovitog biofilma o čemu nema puno saznanja u literaturi (Falkinham 2015; Cullom i dr. 2020). Nadalje, ostaje upitno kako se legionela i ostale bakterije iz ove skupine oportunističkih patogena ponašaju u sustavima s morskom vodom.



Slika 3: Vijabilnost *L. pneumophila* ATCC BAA-74 i *L. pneumophila* ST82 nakon 20 dana u sirovoj morskoj vodi (SMV) i filtriranoj morskoj vodi (FMV). Kontrolu predstavljaju bakterije u sterilnoj vodovodnoj vodi (SVV). Bakterije su obojene *DeadLive* bojenjem kojim se mrtve stanice boje crveno (propidijum jodid), a žive zeleno (SYTO-9). Preparat je mikroskopiran na epifluorescentnom mikroskopom pod povećanjem od 1000 x. Skala označava 50µm.

Jedan od važnijih problema je što ove bakterije vrlo brzo prelaze u vijabilne nekultivabilne oblike (VBNC, Viable but nonculturable). VBNC oblike bakterija ne možemo standardnim metodama detekcije dokazati te prolaze ispod radara.

Kako bi prikazali vijabilnost *L. pneumophila* ATCC BAA-74 i *L. pneumophila* ST82 nakon 20 dana u sirovoj morskoj vodi uzorci su obojeni propidijum jodidom (PI) i SYTO-9 fluorescentnim bojama i prikazani na slici 3.

Iz slike 3 se vidi da u sirovoj morskoj vodi 20. dan dominiraju zeleno obojene, odnosno vijabilne bakterije. Uz legionele u sirovoj morskoj vodi se nalaze i bakterije iz mora. Navedeni rezultat odgovara broju legionela u sirovoj morskoj vodi nakon 20 dana. Razlika između dva soja *L. pneumophila* je uočljiva u uzorcima filtrirane

morske vode, gdje *L. pneumophila* ATCC BAA-74 soj preživljava kraće vrijeme i 20. dan dominiraju crveno obojene, odnosno mrtve stanice. U filtriranoj morskoj vodi *L. pneumophila* ST82 bolje preživljava i dominiraju vijabilne, zeleno obojene stanice. Na slikama se može uočiti i promjena oblika legionela te u morskoj vodi dolazi do njihovog skraćivanja. Kontrolu predstavljaju legionele u sterilnoj vodovodnoj vodi. Potrebni su daljnji pokusi oko određivanja vijabilnosti legionela nakon duže inkubacije u morskoj vodi.

Iz svega navedenog možemo zaključiti da postoji potencijal prijenosa *L. pneumophila* i preko morske vode i da treba biti izuzetno oprezan oko održavanja vodenih sustava s morskom ili bočatom vodom. Još uvijek ne možemo sa sigurnošću utvrditi da li je preživljavanje *L. pneumophila* ST82 karakteristika ovog soja ili je došlo do adaptacije na povećanu koncentraciju soli, odnosno morsku vodu.

4. ZAKLJUČCI

Ispitivano preživljavanje sojeva *L. pneumophila* ukazuje da je i morska voda potencijalni medij za prijenos legioneloza. U sirovoj i filtriranoj morskoj vodi za razliku od *L. pneumophila* ATCC BAA-74, *L. pneumophila* ST82 dulje preživljava. U kloriranim uzorcima morske vode obje vrste legionela ugibaju unutar 24 sata. Značajne rezultate zapažamo u uzorcima klorirane morske vode razrijeđene u različitim omjerima s nekloriranom vodovodnom vodom što legionelama olakšava preživljavanje. Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja uvjeta preživljavanja ovih bakterija u morskoj vodi poglavito zbog boljeg razumijevanja i planiranja adekvatnije prevencije širenja legioneloza preko sustava bazena sa morskom vodom.

LITERATURA:

- Abdel-Nour, M.; Duncan, C.; Low, D.E.; Guyard C. 2013. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. International journal of molecular sciences 14(11), 21660-21675
- Catrenich, C.E.; Johnson, W. (1989). Characterization of the selective inhibition of growth of virulent *Legionella pneumophila* by supplemented Mueller-Hinton medium. Infection and Immunity, 57(6):1862-1864. PMID: 2722245
- Cullom, A.C.; Martin, R.L., Song, Y., Williams, K., Williams, A., Pruden, A., Edwards, M.A. 2020. Critical Review: Propensity of Premise Plumbing Pipe Materials to Enhance or Diminish Growth of *Legionella* and Other Opportunistic Pathogens. Pathogens. 9(11):957. doi: 10.3390/pathogens9110957. PMID: 33212943; PMCID: PMC7698398.
- Falkinham JO 3rd. 2015. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. International Journal of Environmental Research and Public Health 12(5):4533-45. doi: 10.3390/ijerph120504533. PMID: 25918909; PMCID: PMC4454924.
- Falkinham, J.O.; Pruden, A.; Edwards, M. (2015) Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. Pathogens 4(2):373-86. doi: 10.3390/pathogens4020373. PMID: 26066311; PMCID: PMC4493479.
- Fields, B.S.; Benson, R.F.; Besser, R.E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 Years of Investigation. Clinical microbiology reviews, 15:3: 506-526; DOI: 10.1128/cmr.15.3.506-526.2002
- Gast, R.J.; Moran, D.M.; Dennett, M.R.; Wurtsbaugh, W.A.; Amaral-Zettler, L.A. 2011. Amoebae and *Legionella*

- pneumophila* in saline environments. *Journal of Water and Health*, 9(1): 37–52. DOI:10.2166/wh.2010.103
- Heller, R., Höller, C.; Süßmuth, R., Gundermann, K.O. 1998. Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology*, 26(1):64–68 DOI: 10.1046/j.1472-765x.1998.00273.x
- Khweek, A.A., Amer, A.O. 2018. Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 38(8) <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
- Ortiz-Roque, C.M., Hazen, T.C. 1987. Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:9:2231–2236 PMID: 3314710
- Padhi, R.K., Subramanian, S., Mohanty, A.K., Satpathy, K.K. 2019. Monitoring chlorine residual and trihalomethanes in the chlorinated seawater effluent of a nuclear power plant. *Environmental Monitoring Assessment* 191(7):471. doi: 10.1007/s10661-019-7611-0. PMID: 31250220
- Padhi, R.K.; Sowmya, M., Mohanty, A.K.; Bramha, S.N., Satpathy, K.K. 2012. Formation and speciation characteristics of brominated trihalomethanes in seawater chlorination. *Water and Environmental Research*. 84(11):2003–9. doi: 10.2175/106143012x13415215906735. PMID: 23356015.
- Palmer, C.J., Tsai, Y.L.; Paszko-Kolva, C., Mayer, C.; Sangermano, L.G. 1993. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction direct fluorescent antibody and plate culture methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3618–3624. PMID: 8285669
- Potočnjak, M.; Široka, M.; Rebić, D.; Gobin, I. 2012. The survival of *legionella* in rainwater. *International journal Sanitary engineering research* 6(1):30–36
- Rakić, I.; Perić, J.; Štambuk-Giljanović N. 2013. Prisutnost bakterija *Legionella pneumophila* u toploj vodovodnoj vodi u ovisnosti o ekološkim čimbenicima. *Hrvatske vode* 21 (83) 1–6.
- Rice, E.W.; Baird, R.B.; Eaton, A.D. 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd Edition), 9213 B (American Public Health Association – APHA, American Water Works Association – AWWA, Water Environment Federation – WEF) ISBN: 9780875532875
- Tomić Linšak, D.; Keše, D.; Broznić, D.; Vukić Lušić, D.; Cenov, A.; Morić, M.; Gobin, I. 2021. Sea water whirlpool spa as a source of *Legionella* infection. *Journal of Water and Health* available online; jwh2021150. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2021.150>

LEGIONELLAE SURVIVAL IN SEAWATER

Abstract. Legionellae primarily appear in water environments, mostly artificially created, such as warm water systems, Jacuzzis, recreation pools, air conditioning systems, etc. It is well known that legionellae survive in freshwater systems; however, their survival in water with high salt concentrations has not been researched in detail. In vitro tests in this study examined the survival of Legionella in samples of seawater, potable water and chlorinated water from a saltwater pool. We used two bacterial strains - Legionella pneumophila ATCC BAA-74 as the clinical isolate and Legionella pneumophila ST82 isolated from the saltwater pool.

Both bacteria survive over 30 days in raw seawater and potable water. In filtered seawater, L. pneumophila strain ST82 survives over 30 days, whereas L. pneumophila ATCC BAA-74 dies within 25 days. An important factor for the survival of both strains is a dilution of chlorinated seawater with non-chlorinated potable water. Our results indicate that a constant control and adherence to water managing protocols are essential in hotel systems, and that additional protocols for saltwater pools are necessary. Only adequate hygiene and monitoring processes can lead to a significant risk reduction of the occurrence and spread of Legionnaires' disease.

Key words: *Legionella pneumophila*, seawater, bacterial survival

ÜBERLEBEN VON LEGIONELLEN IM MEERWASSER

Zusammenfassung. Legionellen kommen vor allem in künstlichen Wasserumgebungen vor, z.B. in Warmwasseranlagen, Jacuzzis, Schwimmbäder, Klimaanlageanlagen u. ä. Es ist auch gut bekannt, dass Legionellen in Süßwassersystemen vorkommen; ihr Überleben in der Umgebung mit hohen Salzkonzentrationen ist allerdings bisher nicht näher untersucht worden. In dieser Studie wurde anhand von In-vitro-Untersuchungen das Überleben von Legionellen in Proben von Meerwasser, Leitungswasser und gechlortem Wasser aus dem Meerschwimmbad geprüft. Zwei Bakterienstämme wurden verwendet, Legionella pneumophila ATCC BAA-74 als klinisches Isolat und Legionella pneumophila ST82, daraus dem Meerschwimmbadwasser isoliert wurde. In unbehandeltem Meerwasser sowie im Leitungswasser überleben die beiden Bakterienarten über 30 Tage. Im filtrierten Meerwasser überlebt L. pneumophila ST82 (Serotyp 1) über 30 Tage, während L. pneumophila ATCC BAA-74 innerhalb 25 Tage abstirbt. Ein wichtiger Überlebensfaktor bei beiden Bakterienstämmen ist die Verdünnung des Meerwassers mit nicht gechlortem Leitungswasser. Die Ergebnisse zeigen, dass eine ständige Kontrolle und Durchführung des Protokolls für Wasserqualität in Hotels notwendig sind, und dass zusätzliche Protokolle für Meerwasserschwimmbäder eingeführt werden sollen. Nur mit der Durchführung entsprechender Hygienemaßnahmen und Überwachungsprozesse lässt sich das Risiko einer Legionellose verringern.

Schlüsselwörter: *Legionella pneumophila*, Meerwasser, Überleben von Bakterien