

Preživljavanje i rast bakterija iz roda Legionella i Pseudomonas u različitim uzorcima voda

Bilaver, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:767263>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Laura Bilaver

PREŽIVLJAVANJE I RAST BAKTERIJA IZ RODA
Legionella I *Pseudomonas* U RAZLIČITIM UZORCIMA
VODA

Završni rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

**Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____,
pred povjerenstvom u sastavu:**

1. _____

2. _____

3. _____

Rad sadrži 23 stranice, 4 slike, 27 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr.sc. Marini Šantić na temi, danim savjetima i smjernicama tijekom izrade ovog završnog rada te na velikom razumijevaju i profesionalnom odnosu.

Također, zahvalila bi se osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Za kraj, zahvaljujem svojim roditeljima na podršci i povjerenju te svemu što su mi pružili tijekom studija.

SAŽETAK

Legionella je fakultativna Gram negativna unutarstanična bakterija. Pripada u porodicu *Legionellaceae*. Prvi put je dokumentirana kao uzrok ljudske bolesti 1976. godine, među članovima Američke legije, nakon što su oboljeli od pneumonije. Smatra se da je prvi koji je izolirao vrste *Legionella* spp. Hugh Tatlock 1943. godine. Rasprostranjene su u prirodi, a naročito u vodi i vlažnome tlu. U velikom broju koloniziraju različite vodoopskrbne sustave vodovode, vodospreme, tornjeve, uređaje za zagrijavanje, hlađenje i isparavanje vode i dr., te su odgovorne za 2 do 5% pneumonija u općoj populaciji. Infekcije u ljudi može uzrokovati najmanje 20 vrsta *Legionella*, a najučestaliji uzročnik je *Legionella pneumophila* serogrupe 1. Sg1 pokazuje veću virulenciju u usporedbi s ostalim serogrupama. Najčešće dospijevaju u dišni sustav iz kontaminiranog okoliša u vidu aerosola. Kontaminirani aerosol najčešće se stvara u okolini vodenih tornjeva, iznad bazena s pjenom i u ovlaživačima zraka. Značajke Legionarske bolesti uključuju vrućicu, suhi kašalj, glavobolju, mialgije, ukočenost ekstremiteta, dispneju, proljev i delirij. Protozoe djeluju kao prirodni rezervoari *L. pneumophila* i potiču bolest kod ljudi. Okruženje unutar stanice domaćina štiti bakteriju od teških okolišnih uvjeta, dok istovremeno pruža nišu bogatu hranjivim tvarima. Osim u amebama *L. pneumophila* također tvori biofilm s drugim mikroorganizmima uključujući i *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* je Gram negativna, aerobna bakterija. Vrlo je prilagodljiv mikroorganizam te može kolonizirati različite nišne prostore, uključujući tlo, morska staništa, biljke i životinje. Ova bakterija je poznata i kao oportunistički ljudski patogen, koji uzrokuje infekcije očiju, uha, kože, uretre. *P. aeruginosa* ima veliki broj čimbenika virulencije kako bi preživjelo u različitim okruženjima domaćina. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj *Pseudomonasa* na preživljavanje i razmnožavanje bakterije *Legionella pneumophila* iz različitih uzoraka voda. U praktičnom radu korišteni se bakterijski sojevi *L. pneumophila* serogrupe 1 te *P. aeruginosa*. Rast bakterija praćen je tijekom 10 dana. Rezultati su pokazali da *L. pneumophila* serogrupe 1 bolje preživljava u vodi bolje bez prisutnosti *P. aeruginosa*.

Ključne riječi: *L. pneumophila*, serogrupa 1, razmnožavanje, *P. aeruginosa*, voda

SUMMARY

Legionella is a facultative Gram-negative intracellular bacterium. It belongs to the family *Legionellaceae*. It was first documented as the cause of human disease in 1976, among members of the American Legion, after suffering from pneumonia. Hugh Tatlock is thought to be the first to isolate *Legionella* spp. Bacteria are widespread in the nature, and especially in the water and moist soil. *Legionella* colonize a large number of different water supply systems including water mains, reservoirs, towers, devices for heating, cooling towers and evaporation of water, etc., and are responsible for 2 to 5% of pneumonia in the general population. Infections in humans are caused by at least 20 species of *Legionella*, and the most common causative agent is *Legionella pneumophila* serogroup 1. Sg1 shows higher virulence compared to other serogroups. Bacteria can enter the respiratory system from a contaminated environment in the form of an aerosol. Contaminated aerosol is the most commonly created around water towers, above foam pools, and in humidifiers. The clinical signs of Legionnaires' disease include fever, dry cough, headache, myalgia, limb stiffness, dyspnea, diarrhea, and delirium. Protozoa act as an natural reservoirs of *L. pneumophila* and accelerate disease in humans. Inside the protozoa the bacterium is protected from harsh environmental conditions, while at the same time providing a niche rich in nutrients. In addition, *L. pneumophila* could be found in a biofilm with other microorganisms including *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* is a Gram negative, aerobic bacterium. It is a highly adaptable microorganism and can colonize a variety of niche, including soil, marine habitats, plants, and animals. This bacterium is also known as an opportunistic human pathogen, which causes infections of the eyes, ears, skin, and urethra. *P. aeruginosa* has a wide range of virulence factors which contribute to survival in these different host environments. The aim of this study was to examine the influence of *P. aeruginosa* on the survival and replication of *L. pneumophila* within different water samples. *L. pneumophila* serogroup 1 and *P. aeruginosa* were used in this study. Bacterial growth was monitored for 10 days. The results showed that *L. pneumophila* serogroup 1 survives better in water without the presence of *P. aeruginosa*.

Key words: *L. pneumophila*, serogroup 1, replication, *P. aeruginosa*, water

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA | 1 |
| 1.1. Rod <i>Legionella</i> | 1 |
| 1.2. <i>L. pneumophila</i> serogrupe 1 | 1 |
| 1.3. Legionarska bolest..... | 2 |
| 1.3.2. Preživljavanje <i>L. pneumophila</i> u okolišu | 3 |
| 1.3.3. Ekologija | 3 |
| 1.4. Dokazivanje <i>L. pneumophila</i> | 3 |
| 1.5. Životni ciklus <i>L. pneumophila</i> | 4 |
| 1.6. Prevencija | 4 |
| 1.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| 1.7.1. Epidemiologija | 6 |
| 1.7.2. Ekologija | 6 |
| 1.7.3. Put prijenosa..... | 7 |
| 1.7.4. Biofilm | 7 |
| 1.7.5. Prevencija | 8 |
| 2. CILJ RADA..... | 9 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 10 |
| 3.1. Bakterijski soj..... | 10 |
| 3.2. Uzorkovanje | 10 |
| 3.3. Hranjive podloge | 10 |
| 3.4. Metode..... | 11 |
| 3.4.1. Priprema bakterijske suspenzije | 11 |
| 3.4.2. Dodavanje bakterijske suspenzije | 13 |
| 4. REZULTATI..... | 14 |
| 4.1. Broj bakterija <i>Legionella</i> i <i>Pseudomonas</i> u sterilnoj vodi iz slavine..... | 14 |
| 4.2. Broj bakterija <i>P. aeruginosa</i> i <i>L. pneumophila</i> u sterilnoj vodi iz bazena..... | 15 |
| 5. RASPRAVA..... | 17 |
| 6. ZAKLJUČAK | 19 |
| 7. LITERATURA..... | 20 |
| 8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA | 23 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Rod *Legionella*

Legionella je fakultativna Gram negativna unutarstanična bakterija (6). Pripada u porodicu *Legionellaceae* (1). Obligatni su spororastući nefermentativni aerobi (20).

Taksonomija porodice *Legionellaceae* neprestano se mijenja zbog otkrića novih vrsta i serotipova (2). Prvi sojevi *Legionella* izolirani su u zamorcima upotrebom postupaka za izolaciju *Rickettsia* (7). Do danas je otkriveno preko četrdeset vrsta s više od šezdeset serotipova *Legionella* (2). Prvi put je dokumentirana kao uzrok ljudske bolesti 1976. godine, nakon što je epidemija pneumonije nepoznatog porijekla opisana među članovima Američke legije koji su prisustvovali konferenciji u hotelu Bellevue-Stratford u Philadelphiji (3). Smatra se da je prvi koji je izolirao vrste *Legionella spp.* Hugh Tatlock 1943. godine. Nakon toga 1959. F. Marilyn Bozeman izolirala je ove bakterije od pojedinačnih ljudskih slučajeva (3).

Legionella kao ubikvitarni mikroorganizmi, rasprostranjeni su u prirodi, a naročito u vodi i vlažnome tlu. U velikom broju koloniziraju različite vodoopskrbne sustave vodovode, vodospreme, tornjeve, uređaje za zagrijavanje, hlađenje i isparavanje vode, ovlaživanje zraka i dr., te su odgovorne za 2 do 5% pneumonija u općoj populaciji (4). U prirodnom okruženju, *Legionella* koegzistira s drugim bakterijama i mikroeukariotama poput slobodno živećih ameba, cilijata i nematoda. Biofilmi se smatraju pogodnom nišom u kojoj *Legionella* djeluje s drugim bakterijama i potencijalnim eukariotskim domaćinima (12). Prisutnost organskog sedimenta i komenzalne mikroflore joj pomaže u proliferaciji (2). Također, proizvodi mnoge efektorske proteine koji joj pomažu u održavanju i rastu unutar ameba i u ljudskim makrofazima, ali njihova uloga u otpornosti na fagocitozu nije još dobro utvrđena (12).

1.2. *L. pneumophila* serogrupe 1

L. pneumophila dijeli se na 15 serogrupa (Sg1-Sg15), a Sg1 je dominantna serogrupa u identificiranim kliničkim slučajevima; međutim, omjer Sg1 izolirane iz okoliša niža je (približno od 20% do 40%) u usporedbi s omjerom Sg1 izolirane u kliničkim slučajevima (približno 90%) (14).

Sg1 pokazuje veću virulenciju u usporedbi s ostalim serogrupama. Druga je mogućnost da se preživljavanje *L. pneumophila* u okolišu razlikuje među serogrupama. U okolišu postoje brojni čimbenici stresa, poput temperature, pH, oksidativnog stresa, klora i protista kao što su amebe, koji mogu utjecati na preživljavanje *L. pneumophila*. Međutim, povezanost između virulencije i održivosti u okolišu nije dovoljno istražena (14).

1.3. Legionarska bolest

Neke vrste roda *Legionella* uzrokuju kliničke sindrome koji se manifestiraju kao Legionarska bolest ili Pontijačka groznica, najčešći uzročnik je *L. pneumophila* (5). Infekcije u ljudi može uzrokovati najmanje 20 vrsta *Legionella*, a najučestaliji uzročnik je *L. pneumophila* serogrupe 1 (2). Vrijeme inkubacije legioneloze utvrđeno je u odnosu na epidemije. Za Pontijačku groznicu razdoblje inkubacije je uglavnom između 20 i 48 sati, prosječno je 36 sati, a razdoblje inkubacije za Legionarsku bolest obično se kreće od 2 do 10 dana (19).

Klinički nije moguće razlikovati bolesnike s Legionarskom bolesti od bolesnika s drugim vrstama upale pluća. Značajke Legionarske bolesti uključuju vrućicu, suhi kašalj, glavobolju, mialgije, ukočenost ekstremiteta, dispneju, proljev i delirij. Iako niti jedan uzorak rendgenskih snimaka prsnog koša ne može odvojiti ovu infekciju od drugih vrsta upale pluća, alveolarni infiltrati su češći kod bolesnika s Legionarskom bolešću (7). Rana klinička dijagnoza i brzo davanje odgovarajuće terapije za *Legionella* spp. kod svih bolesnika s pneumonijama koje su stekle u zajednici ili u bolnici su presudna mjera za liječenje bolesti (18).

1.3.1. Put prijenosa

Načini na koji se *Legionella* iz okoliša prenosi na ljude su raznovrsni. Najčešće dospijevaju u dišni sustav iz kontaminiranog okoliša putem aerosola. Također su evidentirani slučajevi infekcije uslijed aspiracije i terapijskih manipulacija u respiratornom sustavu. Kontaminirani aerosol najčešće se stvara u okolini vodenih tornjeva, iznad bazena s pjenom i u ovlaživačima zraka. Ljudi se mogu zaraziti tijekom kupanja, boravka u blizini vodenih tornjeva ili aparatima za kondicioniranje zraka, odnosno za komprimirani zrak, ako je u sustav ventilacije ušao kontaminirani aerosol iz obližnjeg vodenog tornja (2).

1.3.2. Preživljavanje *L. pneumophila* u okolišu

Protozoe djeluju kao prirodni rezervoari *L. pneumophila* i potiču bolest kod ljudi. Okruženje unutar stanice domaćina štiti bakteriju od teških okolišnih uvjeta, dok istovremeno pruža nišu bogatu hranjivim tvarima. Sposobnost *L. pneumophila* da preživi unutar ameba također štiti bakterije od ubijanja postupcima dezinfekcije vode, uzajamnim odnosom koji također povećava opstanak domaćina (13). Optimalni pH za preživljavanje je između 6,0-8,0 (15).

1.3.3. Ekologija

L. pneumophila se razmnožava na temperaturama između 25 i 42 °C, s optimalnom temperaturom rasta od 35 °C. Većina slučajeva legioneloze može se pratiti u vodenim sredinama koje je stvorio čovjek u kojima je temperatura vode viša od temperature okoline. Termički izmijenjena vodena okruženja mogu promijeniti ravnotežu između protozoa i bakterija, što rezultira brzim razmnožavanjem *Legionella*. U svom prirodnom okruženju, *Legionella* bi vrlo rijetko uzrokovala bolesti kod ljudi. Neke epidemije legioneloze povezane su s izgradnjom, a izvorno se vjerovalo da bakterije mogu preživjeti i prenijeti se na ljude putem tla. No, *L. pneumophila* ne preživljava u suhim uvjetima, a ta su izbivanja epidemija vjerojatnije posljedica masovnog uklanjanja vodovodnih sustava zbog promjena tlaka vode tijekom izgradnje (7).

1.4. Dokazivanje *L. pneumophila*

Metode dijagnosticiranja infekcije *Legionella* u kliničkim uzorcima uključuju kultiviranje, detekciju antigena u urinu, identifikaciju bakterije pomoću seroloških testova, detekciju bakterije u tkivima ili tjelesnim tekućinama imunofluorescentnom mikroskopom i lančanu reakciju polimerazom (PCR). Svaka metoda ima svoja ograničenja, međutim serološke metode za imunoglobulin M (IgM), G (IgG) i A (IgA) imaju prednost u tome što mogu utvrditi je li pacijent prethodno bio izložen bakteriji roda *Legionella*. Stoga su ove metode opisane kao izvrsna tehnika za utvrđivanje seroprevalencije nedavnih infekcija u populaciji. Imunofluorescentna analiza (IFA) i enzimski imunisorbentni test (ELISA) dvije su najčešće

korištene serološke metode detekcije. Mikroaglutinacija je također druga metoda za serološku dijagnozu legioneloze (5).

Izbor dijagnostičke metode ovisi o kliničkoj slici, laboratorijskim mogućnostima i pravilnoj interpretaciji rezultata budući da ne postoji dijagnostički "zlatni standard". Ne postoji jedan test koji je brz, dovoljno osjetljiv i specifičan. Nutritivno su zahtjevne bakterije koje ne rastu na standardnim bakteriološkim podlogama. Za rast trebaju podloge s L-cisteinom, solima željeza i α -ketoglutaratom. Najbolje se izoliraju iz sekreta donjeg dijela respiratornog trakta (20).

1.5. Životni ciklus *L. pneumophila*

L. pneumophila uspješno se prilagodila novim okruženjima stvorena ljudskim aktivnostima, kao što su tuševi, klimatizacijski sustavi, vodene fontane, rashladni tornjevi ili drugim umjetnim vodnim sustavima koji olakšavaju pristup ljudima i ljudskim infekcijama, što može rezultirati teškom upalu pluća. Međutim, uglavnom osjetljiva populacija poput imunokompromitiranih ili starijih osoba razvija teži oblik pneumonije (21).

Primarna značajka patogeneze Legionarske bolesti je sposobnost *Legionella* da se razmnožavaju unutar stanice. Detaljno je opisan njezin životni ciklus u stanicama protozoa i stanicama sisavaca (7).

1.6. Prevencija

Posljednjih godina širenje epidemija povezanih s potrošnjom vode u industrijaliziranim zemljama zbog uređaja koji proizvode aerosole, toplice itd., dovelo je do veće pozornosti koje se odnose na prisutnost patogenih mikroorganizama u obrađenim vodenim resursima. Poteškoća u kontroli širenja bakterije *L. pneumophila* ovisi o mnogim čimbenicima povezanim sa prisutnošću bakterije u okolišu i njezinoj sposobnosti da preživljava u koloniziranom okruženju i širi se aerosolima. U većini slučajeva, prevencija može imati temeljnu važnost za izbjegavanje epidemije (22).

Pojava velikih epidemija legioneloza u zajednici može se smanjiti donošenjem smjernica za pravilno održavanje rashladnih tornjeva i drugih uređaja za stvaranje aerosola.

Prevenција sporadičnih slučajeva je teža i zahtijeva bolje razumijevanje puta prijenosa. Prvi korak je identifikacija sporadičnih slučajeva bolesti primjenom odgovarajućih dijagnostičkih testova (7).

Nadalje, kontrolom fizikalno-kemijskih parametara (temperatura vode, pH, koncentracije slobodnog rezidualnog klora, željeza, cinka, bakra itd.), koji utječu na opstanak i razmnožavanje legionela, može se smanjiti učestalost i opasnost od obolijevanja od legionarske bolesti. Važno je i u cjevovodima održavati odgovarajuće hidrauličke uvjete, odnosno ostvariti što veći i kontinuirani protok, po mogućnosti bez mrtvih kutova i stagnacije vode. U svrhu smanjenja prisutnosti *Legionella* potrebno je i redovito tehničko održavanje vodoopskrbnih uređaja, kao i održavanje temperature hladne vode u spremnicima i u distribuciji, ispod 25 °C, odnosno tople vode iznad 55 °C. Za osiguranje tehničkih i tehnoloških mjera te održavanja sustava pitkom vodom potrebna su interdisciplinarna znanja te je važna suradnja stručnjaka raznih profila od faze projektiranja i izvedbe do pogona i održavanja sustava (4).

1.7. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativna, aerobna bakterija u obliku štapića, posjeduje jednu flagelu (23).

Široko je rasprostranjena u okolišu i smatra se uobičajenim mikroorganizmom prirodnih voda. Jedna od važnijih osobina bakterije *P. aeruginosa* je da može rasti u nepovoljnim životnim uvjetima kao što su niske koncentracije nutrijenata, te može preživjeti veće temperaturne razlike u odnosu na druge gram negativne bakterije (27).

Optimalna temperatura rasta *P. aeruginosa* je 37 °C, a može rasti između 10 i 42 °C. Prilagodljivost raznim sredinama i sposobnost da napreduje u uvjetima biofilma mogu biti povezane s njegovom sposobnošću da koristi nitrat kao akceptor elektrona umjesto kisika. Raspon pH u kojem *P. aeruginosa* može preživjeti i rasti nije jasno definiran, ali istraživanja upućuju na optimalan rast primijećen na pH 7,2 (23).

1.7.1. Epidemiologija

P. aeruginosa je oportunistički ljudski patogen koji može izazvati široki spektar akutnih i kroničnih infekcija opasnih po život, osobito u bolesnika s oslabljenom imunološkom obranom. To je od posebnog značaja jer je glavni uzrok obolijevanja i smrtnosti u bolesnika s cističnom fibrozom (CF) i jedan od vodećih nosokomijalnih patogena koji utječu na hospitalizirane bolesnike, a istovremeno je otporan na široki spektar antibiotika (17).

P. aeruginosa je vrlo prilagodljiva bakterija koja može kolonizirati različite prostore u okruženju, uključujući tlo, morska staništa, biljke i životinje. Ova bakterija je poznata i kao oportunistički ljudski patogen, koji uzrokuje infekcije očiju, uha, kože, uretre i dišnih putova kod cistične fibroze i opekline, kao i drugih imunokompromitiranih pojedinaca. Stoga je poznato da je ova bakterija vrlo prilagodljiva i da ima raznolike fenotipske karakteristike, koje joj omogućavaju naseljavanje različitih okolišnih uvjeta (16).

P. aeruginosa ima veliki broj čimbenika virulencije što mu omogućava preživljavanje u različitim okolišnim uvjetima te okruženjima domaćina. Primjerice, sekrecijski sustav tipa III *P. aeruginosa* kritični je faktor virulencije tijekom akutnih plućnih infekcija. Suprotno tome, prekomjerna proizvodnja alginata, polisaharida koji omogućavaju stvaranje mukoidnog biofilma, događa se gotovo isključivo tijekom kroničnih infekcija pluća. Ove prilagodbe ovise o regulatornim putovima koji koordiniraju ekspresiju različitih svojstava virulencije kao odgovor na specifične podražaje domaćina, pokazujući kritičnu ulogu regulacije gena u patogenezi infekcija uzrokovanih s *P. aeruginosa* (26).

1.7.2. Ekologija

Pokazalo se da *P. aeruginosa* preživljava u vodi više od 145 dana, što je znatno duže od ostalih patogena kao što su *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Sposobnost organizma da preživljava dugo u vodi ukazuje da voda može biti rezervoar okoliša za *P. aeruginosa*. Mikrobiomom podzemnih voda dominira rod *Pseudomonas*, za koji se pokazalo da čini 10% svih vrsta. Brojna su istraživanja pokazala prisustvo *P. aeruginosa* u bolnicama, vodi u jedinicama intenzivne njege, kao i sudoperima, umivaonicima, odvodima, tuševima i kupaonicama, što predstavlja potencijalni put prijenosa infekcije na ljude. Od velike je važnosti

razumjeti kako ovaj organizam može preživjeti u vodi te prienos na ljude s ciljem suzbijanja infekcije (10).

1.7.3. Put prijenosa

Točan mehanizam kroz koji dolazi do prijenosa nije jasan. Ruke zdravstvenih djelatnika predstavljaju važni potencijalni izvori infekcije. Razne epidemiološke studije pokazuju da je prilikom uzimanja obriska oko 80% umivaonika u dječjoj bolnici pozitivno na *P. aeruginosa*, sugerirajući da izravni kontakt može biti izvor prijenosa. Mnogi istraživači navode kako je prienos kapljičnim putem jedno od glavnih čimbenika unakrsne infekcije. Kada se infektivni agensi ispuštaju u zrak, oni mogu ostati suspendirani u obliku aerosola, kapljica ili jezgra kapljica i nakon toga zaraziti drugu osobu. Aerosoli su suspenzije krutih ili tekućih čestica unutar plina. Opstanak zaraznih uzročnika varira ovisno o česticama i karakteristikama okoliša, a otkrivanje ovisi o primijenjenoj metodi uzorkovanja (25).

1.7.4. Biofilm

Biofilmi su prisutni svugdje u okolišu i imaju veliki utjecaj na ljudski život, kako na pozitivne tako i na negativne načine. *P. aeruginosa* je bakterija za koju se zna da stvara snažne biofilme. Biofilmi *P. aeruginosa* uzrokuju ozbiljne probleme u imunokompromitiranih bolesnika, uključujući one s cističnom fibrozom ili infekcijom rana (9).

Stvaranje mukoidnog biofilma kod *P. aeruginosa* znak je kroničnih infekcija i pokazatelj je napredovanja bolesti i dugotrajne perzistentnosti (17).

Bakterije *P. aeruginosa* pričvršćuju se na površine i tvore stanične nakupine ili mikrokolonije ugrađene u vanstanične polimerne tvari kako bi zaštitile bakterije iz okruženja. Ove se strukture nazivaju biofilmima koji daju ekstremnu sposobnost postojanja protiv fagocitoze, oksidativnih naprežanja, ograničenja hranjivih tvari/kisika, nakupljanja metaboličkog otpada, natjecanja među vrstama i konvencionalnih antimikrobnih sredstava (17).

1.7.5. Prevencija

P. aeruginosa nije zakonski reguliran za komunalnu pitku vodu jer ne postoje dokazi da može biti izvor zaraze za opću populaciju. Međutim, njegova prisutnost u vodi iz zdravstvenih ustanova može biti značajna za stanovništvo rizičnog podrijetla, a neke zemlje preporučuju razne ciljeve i aktivnosti u zdravstvenim ustanovama (23).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj *P. aeruginosa* na rast i razmnožavanje bakterije *L. pneumophila* iz različitih uzoraka voda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski soj

U ovom eksperimentalnom radu korišteni su bakterijski sojevi *L. pneumophila* te *P. aeruginosa*. *L. pneumophila* uzgajana je na BCYE agaru na temperaturi od 37 °C 24-48 h, a *P. aeruginosa* na krvnom agaru pri temperaturi od 37 °C 24 h.

3.2. Uzorkovanje

Za ovaj rad korišteni uzorci su sterilna voda iz bazena i sterilna voda iz slavine. Temperatura uzorkovane vode iznosila je 22,2 °C, koncentracija kloridnih iona bila je 0,15 mg/L, a ukupan broj bakterija u 0,5 ml iznosio je 76 CFU/ml. *Pseudomonas* je izoliran iz bazena.

3.3. Hranjive podloge

U ovom radu korišteni su krvni agar i BCYE agar. *Pseudomonas* se nasadi na krvni agar i inkubira na 37 °C te se nakon 24 h formiraju velike sive kolonije, a na BCYE (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) agaru rastu i *Pseudomonas* i *Legionella*. BCYE agar inkubira se na 37 °C te se nakon 24-48 h očitava porast kolonija *Pseudomonas*, a nakon 3 dana očitava se porast *Legionella*.

Sastav BCYE agara:

Medij za agar:

- 10.0 g kvašćevog ekstrakta
- 10.0 g ACES puffer
- 2.0 g aktivnog ugljena
- 1.0 g α -ketoglutarat
- 20.0 g agara
- 900,0 ml destilirane vode

pH medija prilagodi se na 6.9 pomoću sterilne 1M ili 10M otopine KOH. Otopina se autoklavira na 121 °C 15 minuta, a zatim se ohladi.

Hranjivi bujon:

- 10 ml FeNO₃
- 10 ml L-Cistein

Za pripremu otopine FeNO₃ otopi se 1g FeNO₃ u 40 ml destilirane vode. Za pripremu otopine L-cisteina otopi se 1,6 g L-cisteina u 40 ml destilirane vode. Nakon autoklaviranja i hlađenja hranjivi bujon dodaje se u prethodno pripremljeni medij za agar.

3.4. Metode

Prvi dan nasadena je bakterija *L. pneumophila* na BCYE agar te *P. aeruginosa* na krvni agar za pripremu bakterijske suspenzije.

3.4.1. Priprema bakterijske suspenzije

Treći dan napravljena je bakterijska suspenzija *Pseudomonas* i *Legionella* koncentracije 10⁹ CFU/ml. Bakterijske suspenzije dodane su u 50 ml sterilne vode iz bazena i 50 ml sterilne vode iz slavine.

U epruvetu je dodano 3 ml vode, pomoću sterilnog štapića s vatom na vrhu pakupe se bakterijske kolonije, štapić se promiješa u vodi i mjeri se na spektrofotometru OD (engl. optical density). OD treba namjestiti na 1, odnosno ako je prvi put izmjereno OD = 0.5, u vodu se dodaje još bakterijskih kolonija kako bi se u konačnici dobio željeni OD. Kada OD iznosi 1, to znači da je koncentracija 10⁹ CFU/ml. Nije pogodno iz bakterijske suspenzije 10⁹CFU/ml raditi razrjeđenja 10⁴ i 10² CFU/ml u jednom koraku jer treba uzeti premali volumen te se stoga iz početne suspenzije (10⁹ CFU/ml) rade suspenzije 10⁷ i 10⁵ CFU/ml.

Da bi dobili navedene koncentracije potrebno je napraviti izračun (Slika 1). Rezultati izračuna pokazali su da treba uzeti 10μl bakterijske suspenzije koncentracije 10⁹ CFU/ml i dodati u 1ml vode da bi dobili bakterijsku suspenziju 10⁷ CFU/ml (Račun 1). Nakon toga uzima se 10 μl bakterijske suspenzije 10⁷ CFU/ml u 1ml vode da bi dobili bakterijsku suspenziju 10⁵

CFU/ml (Račun 2). Nakon dobivenih koncentracija bakterijskih suspenzija slijedi novi izračun za dobivanje koncentracija 10^4 i 10^2 CFU/ml. (Slika 2).

1.račun

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$c_1 = 10^9 \text{ CFU/ml}$$

$$c_2 = 10^7 \text{ CFU/ml}$$

$$V_2 = 1 \text{ ml}$$

$$10^9 \text{ CFU/ml} \times V_1 = 10^7 \text{ CFU/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{l}$$

2.račun

$$C_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$10^7 \text{ CFU/ml} \times V_1 = 10^5 \text{ CFU/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{l}$$

Slika 1. Izračun dobivanja bakterijske suspenzije koncentracije 10^7 CFU/ml i 10^5 CFU/ml

3.račun

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$10^7 \text{ CFU/ml} \times V_1 = 10^4 \text{ CFU/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l} \longrightarrow \text{količina suspenzije koncentracije } 10^7 \text{ CFU/ml koju treba uzeti da bi dobili } 10^4 \text{ CFU/ml u } 50 \text{ ml}$$

4.račun

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$10^5 \text{ CFU/ml} \times V_1 = 10^2 \text{ CFU/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l} \longrightarrow \text{količina suspenzije koncentracije } 10^5 \text{ CFU/ml koju treba uzeti da bi dobili } 10^2 \text{ CFU/ml u } 50 \text{ ml}$$

Slika 2. Izračun dobivanja bakterijskih suspenzija koncentracija 10^4 CFU/ml i 10^2 CFU/ml u 50ml

Rezultat trećeg računa prikazuje da je potrebno uzeti 50 µl suspenzije koncentracije 10^7 CFU/ml da bi dobili 50 ml suspenzije koncentracije 10^4 CFU/ml (Slika 2). Rezultat četvrtog računa prikazuje da je potrebno uzeti 50 µl suspenzije koncentracije 10^5 CFU/ml da bi dobili 50 ml suspenzije koncentracije 10^2 CFU/ml (Slika 2).

3.4.2. Dodavanje bakterijske suspenzije

Imamo 4 uzorka za vodu iz bazena i 4 uzorka voda iz slavine. Epruvete s 50 ml vode iz bazena i 50 ml vode iz slavine sadrže navedene uzorke.

1. uzorak – *L. pneumophila* (10^4 CFU/ml)
2. uzorak – *L. pneumophila* (10^4 CFU/ml) i *P. aeruginosa* (10^2 CFU/ml)
3. uzorak – *L. pneumophila* (10^2 CFU/ml) i *P. aeruginosa* (10^4 CFU/ml)
4. uzorak – *P. aeruginosa* (10^2 CFU/ml)

U svaku epruvetu dodane su bakterijske suspenzije: u prvu epruvetu dodano je 50 µl *L. pneumophila* 10^7 CFU/ml, u drugu epruvetu dodano je 50 µl *L. pneumophila* 10^7 + 50 µl *P. aeruginosa* 10^5 CFU/ml, u treću 50 µl *L. pneumophila* 10^5 + 50µl *P. aeruginosa* 10^7 CFU/ml, a u četvrtu 50 µl *P. aeruginosa* 10^5 CFU/ml. Epruvete s 50 ml vode iz slavine koje sadrže iste uzorke dodano je 50 µl istih suspenzija u svaku epruvetu.

Svaka 2 dana, iz svake vode uzima se uzorak po 10 µl vode, nasađuje se na BCYE agar za očitavanje *L. pneumophila* sg 1 i krvni agar za očitavanje *P. aeruginosa*. BCYE agar se inkubira na 37 °C 3-4 dana, krvni agar se inkubira na 37 °C 24h. Nakon inkubacije očitava se broj poraslih kolonija u CFU/ml.

4. REZULTATI

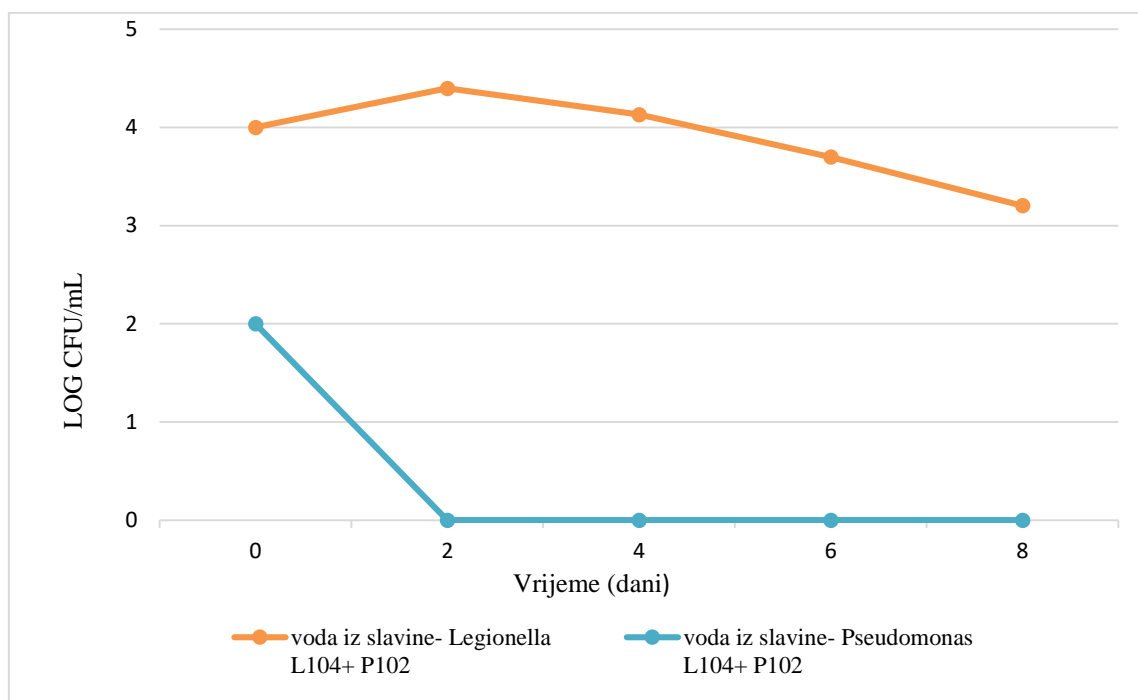
4.1. Broj bakterija *Legionella* i *Pseudomonas* u sterilnoj vodi iz slavine

U svaki uzorak dodane su bakterijske suspenzije *L. pneumophila* i *P. aeruginosa* te je svaka 2 dana uzeto 10 μ L uzorka i nasađeno na BCYE i krvni agar. Podloge su inkubirane na 37 °C 24-72 h te je očitani porast bakterija (CFU/ml).

Nakon dva dana u prvom uzorku (*L. pneumophila* 10^4 CFU/ml) nije bilo prisutnih *Legionella* ni *Pseudomonas*, u drugom uzorku koji sadrži *L. pneumophila* 10^4 CFU/ml i *P. aeruginosa* 10^2 CFU/ml broj *L. pneumophila* iznosio je $2,5 \times 10^4$ CFU/ml dok je *P. aeruginosa* 0 CFU/ml. U trećem uzorku koji sadrži *L. pneumophila* (10^2 CFU/ml) i *P. aeruginosa* (10^4 CFU/ml) broj *L. pneumophila* se smanjio na 3×10^2 CFU/ml, a *P. aeruginosa* je iznosio 0 CFU/ml (Slika 3).

Nadalje, nakon četiri dana bakterije su prisutne samo u drugom uzorku (*L. pneumophila* 10^4 CFU/ml i *P. aeruginosa* 10^2 CFU/ml). Četvrti dan prisutna je samo *L. pneumophila*, broj bakterija se smanjio i iznosio je $1,3 \times 10^4$ CFU/ml (Slika 3).

Nakon šest dana broj *L. pneumophila* se smanjuje te iznosi 5×10^3 CFU/ml, dok *P. aeruginosa* nije prisutan. Nakon osam dana broj *L. pneumophila* se ponovno smanjio te je iznosio $1,6 \times 10^3$ CFU/ml (Slika 3).



Slika 3. Usporedba kinetike rasta *Pseudomonas* i *Legionella* u sterilnoj vodi iz slavine.

Bakterije *L. pneumophila* i *P. aeruginosa* dodane su u uzorak vode iz slavine te su u periodu od 10 dana svaka 2 dana nasađene na BCYE agar i krvni agar te inkubirane na 37 °C nakon čega je određen broj bakterija (CFU).

Iz navedenih rezultata vidljivo je da broj *L. pneumophila* opada u prisutnosti *P. aeruginosa*. Iz slike je vidljivo da je na kraju pokusa broj *L. pneumophila* manji nego na početku iako nakon drugog dana nije zabilježena prisutnost bakterija *P. aeruginosa*.

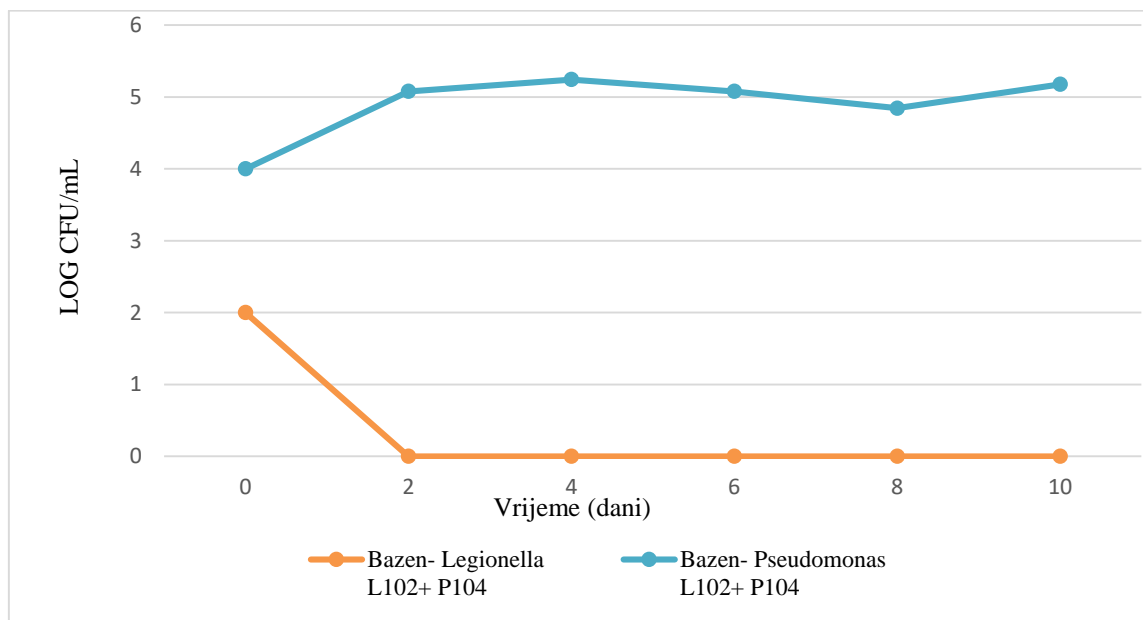
4.2. Broj bakterija *P. aeruginosa* i *L. pneumophila* u sterilnoj vodi iz bazena

Nakon dva dana u prvom uzorku koji je sadržavao *L. pneumophila* (10^4 CFU/ml) i drugom uzorku koji je sadržavao *L. pneumophila* (10^4 CFU/ml) i *P. aeruginosa* (10^2 CFU/ml) nije bilo prisutnih bakterija. U trećem uzorku (*L. pneumophila* (10^2 CFU/ml) i *P. aeruginosa* (10^4 CFU/ml)) bio je prisutan samo *P. aeruginosa* te je broj bakterija iznosio je $1,2 \times 10^5$ CFU/ml (Slika 4).

Nakon četiri dana broj bakterija *P. aeruginosa* se povećao u odnosu na prethodni dan, a iznosio je $1,7 \times 10^5$ CFU/ml (Slika 4). Šesti dan broj bakterija *P. aeruginosa* manji je nego

četvrti dan, a iznosio je $1,2 \times 10^5$ CFU/ml. Osmi dan broj bakterija se ponovno smanjuje te iznosi $7,1 \times 10^4$ CFU/ml (Slika 4).

Nakon deset dana broj bakterija *P. aeruginosa* se u konačnici povećava te iznosi $1,5 \times 10^5$ CFU/ml (Slika 4).



Slika 4. Usporedba kinetike rasta *P. aeruginosa* i *L. pneumophila* u sterilnoj bazenskoj vodi tijekom 10 dana.

Bakterije *L. pneumophila* i *P. aeruginosa* dodane su u uzorak vode iz bazena te su u periodu od 10 dana svaka 2 dana nasađene na BCYE agar i krvni agar te inkubirane na 37 °C nakon čega je određen broj bakterija (CFU).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se *L. pneumophila* u sterilnoj bazenskoj vodi ne razmnožava u prisutnosti *P. aeruginosa*. Također, vidljivo je da *L. pneumophila* nakon 2 dana ugiba, a broj bakterija *P. aeruginosa* je u konačnici veći nego na početku pokusa (Slika 4).

5. RASPRAVA

Nekoliko studija opisuje sve veću učestalost kontaminacija od *Legionella* spp. demonstrirajući široku rasprostranjenost mikroorganizama i povezanost izoliranih sojeva iz okoliša i biološkog primjera zaraženih ljudi (25).

Cilj je bio ispitati utjecaj *P. aeruginosa* na rast i razmnožavanje bakterije *L. pneumophila* iz različitih uzorka voda. *L. pneumophila* serogrupe 1 bolje preživljava u vodi iz slavine bez prisutnosti *P. aeruginosa*. U uzorak vode iz slavine dodan je veći broj bakterija *L. pneumophila* te to može biti jedan od razloga boljeg rasta i razmnožavanja.

Biofilm omogućuje bakterijama *L. pneumophila* da se pričvršćuju na površine ili da budu dio drugih bakterijskih zajednica. To se može postići formiranjem izvanstaničnog matriksa koji je sastavljen uglavnom od vode, egzopolisaharida, proteina, lipida, DNK, RNK i anorganskih spojeva. Faza stvaranja biofilma pokreće se vezanjem na supstrat, nakon čega slijedi sazrijevanje biofilma i stvaranje izvanstaničnog matriksa, zatim odvajanje i disperzija bakterija. Tijekom tih faza bakterijski biofilmi tvore trodimenzionalne strukture razdvojene vodenim kanalima koji omogućuju unos hranjivih tvari, kisika i ispuštanje otpadnih proizvoda (8).

L. pneumophila je u stanju preživjeti i postojati u biofilmima više vrsta koji pokrivaju površine unutar vodnih sustava. Formiranje biofilma pomoću *L. pneumophila* povoljno je za patogene jer dovodi do postojanosti, širenja, otpornosti na tretmane i povećanja virulencije ove bakterije. Nadalje, pojavnost legioneloze povezana su s prisutnošću *L. pneumophila* u biofilmima, čak i nakon opsežnih kemijskih i fizikalnih tretmana (8).

Neka istraživanja pokazala su da prisutnost raznih mikroorganizama u mikrobnoj zajednici *Legionella* mogu imati pozitivne i negativne učinke. U ovom slučaju *P. aeruginosa* onemogućuje daljnji rast i razmnožavanje *L. pneumophila* u vodi iz bazena. *P. aeruginosa* je bakterija koja stvara biofilm koji joj omogućuje lakše preživljavanje u vodi.

Za *P. aeruginosa* nađeno je da mnogi geni održavaju ekspresiju u nekom trenutku dugotrajnog preživljavanja u vodi te izgleda da je prilagodba preživljavanja u vodi složena i uključuje više od jednog gena (10).

Nadalje, moguće je da je prisutnost većeg broja gena kod *P. aeruginosa* odgovorna za bolje preživljavanje u vodi iz bazena. Ukupan broj bakterija u uzorku vode prije ispitivanja iznosio je 76 CFU/ml. Rezultati pokazuju da *L. pneumophila* ne preživljava dugo u vodi iz bazena zbog prevelikog broja bakterija te nema dovoljno hranjivih tvari za preživljavanje. Također, u uzorak iz bazena dodan je veći broj bakterija *P. aeruginosa* od broja *L. pneumophila* te to može biti razlog boljeg preživljavanja *P. aeruginosa* u vodi iz bazena.

Neka istraživanja su pokazala da vrste poput *P. aeruginosa* ometaju interakciju *L. pneumophila* i ameba, iako su točni mehanizmi nepoznati. Također ometaju rast i postojanost *L. pneumophila* u biofilmima. Međutim, sva ta istraživanja provedena su korištenjem čiste kulture ili mješavine dvije ili tri vrste, ali ne i u prirodnim vrstama vodenih biofilmova (12).

U konačnici potrebne su redovite kontrole i analize bazenske vode kao i mikrobiološke analize vode za ljudsku potrošnju kako bi se smanjila mogućnost zaraze ovim bakterijama.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata doneseni su slijedeći zaključci:

- *L. pneumophila* serogrupe 1 bolje preživljava u vodi iz slavine
- U vodi iz slavine *P. aeruginosa* ne utječe na daljnje preživljavanje i razmnožavanje *L. pneumophila*
- U vodi iz bazena *L. pneumophila* se ne razmnožava u prisutnosti *P. aeruginosa*

7. LITERATURA

1. Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Current Microbiology*. 2008, Oct;57(4):294-300. DOI: 10.1007/s00284-008-9192-y
2. Tićac B, Žižić I, Kesovija P, Farkaš M, Pahor Đ, Rukavina T. Infekcije vrstom *Legionella pneumophila* u Primorsko-goranskoj županiji. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2009, [pristupljeno 25.06.2020.] 45(1):78-86. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/34710>
3. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Health and Medicine Division, Division on Earth and Life Studies, Board on Population Health and Public Health Practice, Board on Life Sciences, Water Science and Technology Board, Committee on Management of Legionella in Water Systems. Management of *Legionella* in Water Systems. Washington (DC): National Academies Press (US). 2019, Aug 14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555109/>. DOI: 10.17226/25474
4. Rakić A, Ljoljo D, Ljubas D. Tehničke mjere za sprječavanje razmnožavanja bakterija *Legionella* spp. u sustavima za opskrbu toplom vodom. *Hrvatske vode* [Internet]. 2016, [pristupljeno 25.06.2020.] 24(96):109-118. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/160335>
5. Graham FF, Hales S, White PS, Baker MG. Review Global seroprevalence of legionellosis - a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2020, Apr;10(1):7337. DOI: 10.1038/s41598-020-63740-y
6. De Giglio O, Fasano F, Diella G, et al. *Legionella* and legionellosis in touristic-recreational facilities: Influence of climate factors and geostatistical analysis in Southern Italy (2001-2017). *Environmental Research*. 2019, Nov;178:108721. DOI: 10.1016/j.envres.2019.108721
7. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*. 2002, 15(3):506-526. DOI:10.1128/cmr.15.3.506-526.2002
8. Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, 8:38. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00038
9. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*. 2017, 27(6):1053-1064. DOI:10.4014/jmb.1611.11056
10. Lewenza S, Abboud J, Poon K, i sur. *Pseudomonas aeruginosa* displays a dormancy phenotype during long-term survival in water. *Plos one*. 2018, 13(9):e0198384. DOI: 10.1371/journal.pone.0198384
11. De Giglio O, Napoli C, Apollonio F, Brigida S, Marzella A, Diella G, i sur. Occurrence of *Legionella* in groundwater used for sprinkler irrigation in Southern Italy. *Elsevier*. 2019, March;170, 215-221. DOI:10.1016/j.envres.2018.12.041

12. Shaheen M, Nicholas C.S, J.Ashbolt. Long-term persistence of infectious *Legionella* with free-living amoebae in drinking water biofilms. Elsevier. 2019, May;222-4, 678-686. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.04.007
13. Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ. From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of *Legionella*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017, 7:477. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00477
14. Nishida T, Nakagawa N, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M. Attenuated *Legionella pneumophila* Survives for a Long Period in an Environmental Water Site. *Biomed Research International*. 2019, 2019:8601346. DOI: 10.1155/2019/8601346
15. Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, May;69(5):2540-2547. DOI: 10.1128/aem.69.5.2540-2547.2003
16. Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and Environments*. 2013, 28(1):13-24. DOI: 10.1264/jsme2.me12167
17. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017, 7:39. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00039
18. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*. 1977, 297(22):1189-1197. DOI:10.1056/NEJM197712012972201
19. Blackmon JA, Chandler FW, Cherry WB, et al. Legionellosis. *Am J Pathol*. 1981, 103(3):429-465.
20. Đaković Rode O. Etiološka dijagnostika atipičnih pneumonija. *Medicus* [Internet]. 2005, [pristupljeno 29.06.2020.] 14(1_ARI):45-53. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/18540>
21. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, 8:3. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00003
22. Felice A, Franchi M, De Martin S, et al. Environmental surveillance and spatio-temporal analysis of *Legionella* spp. in a region of northeastern Italy (2002-2017). *Plos one*. 2019, 14(7):e0218687. DOI: 10.1371/journal.pone.0218687
23. Bédard E, Prévost M, Déziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiologyopen*. 2016, Dec;5(6):937-956. DOI: 10.1002/mbo3.391
24. Iatta R, Cuna T, Napoli C, De Giglio O, M.T. Environmental surveillance and molecular investigation of *Legionella* spp. in Apulia, in the years 2008-2011. 2013, 25: 435-441 DOI:10.7416/ai.2013.1945

25. Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018, Oct;31(4). DOI: 10.1128/cmr.00019-18
26. Reinhart AA, Oglesby-Sherrouse AG. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes*. 2016, Oct;7(12). DOI: 10.3390/genes7120126
27. Kovačić A, Tafra D, Hrenović J, Goić-Barišić I, Dumanić T. Preživljavanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u destiliranoj vodi. *Hrvatske vode* [Internet]. 2018 [pristupljeno 26.06.2020.] 26(105):181-186. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/205803>

8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA

OSOBNJE INFORMACIJE:

IME I PREZIME: Laura Bilaver
DATUM I MJESTO ROĐENJA: 15.06.1998., Zadar
ADRESA STANOVANJA: Fučkovo 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
KONTAKT: +385 95/3581804
MAIL: laura.bilaver@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2005. – 2013.: Osnovna škola „Šimuna Kožičića Benje“ Zadar
2013. – 2017.: Medicinska škola „Ante Kuzmanića“ u Zadru
2017. – 2020.: Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva
Medicinski fakultet Rijeka