

Utjecaj klornih preparata na biofilm *Legionella pneumophila*

Ćustić, Toni

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:184:034396>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Toni Ćustić

UTJECAJ KLORNIH PREPARATA NA BIOFILM *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Diplomski rad

Rijeka, 2024. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Toni Ćustić

UTJECAJ KLORNIH PREPARATA NA BIOFILM *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Diplomski rad

Rijeka, 2024. godina

Mentor rada: Prof. dr. sc. Ivana Gobin dipl. sanit. ing.

Komentor rada: Nasl. doc. dr. sc. Igor Dubrović

Završni rad obranjen je dana 30.09.2024 u/na Medicinskom fakultetu u Rijeci

, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Vanja Vasiljev

2. doc. dr. sc. Mirna Mihelčić

3. prof. dr. sc. Ivana Gobin

4. nasl. doc. dr. sc. Igor Dubrović

Rad ima 42 stranice, 8 slika, 3 tablice, 13 grafova, 44 literaturna navoda.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ivani Gobin i komentoru nasl. doc. dr. sc. Igoru Dubroviću na savjetima, pomoći i ponajviše strpljenju kod istraživanja i izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem roditeljima, obitelji, prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška prilikom cijelog studija pa tako i tokom izrade ovog rada.

SAŽETAK

Legionele se često pronalaze unutar građevinskih vodovodnih sustava i kućnih vodovodnih instalacija. Mogu predstavljati problem u svakom dijelu distribucije pitke vode, od glavnog vodovoda do krajnje točke potrošnje. U vodovodnom sustavu, u kojem se nalaze unutar cijevi, mogu s lakoćom u biofilmu preživjeti i više godina. Iz vodovodnog sustava ove bakterije dolaze u bazene gdje mogu stvarati mješovite biofilmove s ostalim bakterijama iz vode i tako predstavljati izvor zaraze za kupaće. Porastom trenda izgradnje bazena može doći i do novih javnozdravstvenih izazova.

Glavni cilj ovog istraživanja je ustanoviti djelotvornost klornih preparata na ponašanje biofilma legionele. Testiranja su rađena sa pet različitih sredstava na biofilmu *Legionella pneumophila* starom pet dana. Uz osnovni tretman je rađen i ponovni porast bakterija nakon djelovanja klornih preparata. Dodatno na temu su izmjerene vrijednosti trihalometana i razine rezidualnog klora u preparatima koji su odradili tretiranje biofilma.

Rezultatima ovog rada se ukazuje potreba za daljnjim istraživanjem biofilma *L. pneumophila*. U istraživanju je korišteno pet različitih sredstava od kojih niti jedan nije u potpunosti razorio biofilm. Preparati pod nazivom Kloromix i Sani-granulat su pokazali najbolju učinkovitost. Najslabije djelovanje na razaranje biofilma je imao preparat BIS C5330 koji bi kao sredstvo za čišćenje trebao imati bolju učinkovitost. Kod svih pet klornih preparata, nakon tretmana, dolazi do ponovnog rasta biofilma. Ustanovljeni ponovni porast je pokazatelj ne učinkovitosti na razaranje biofilma.

Ključne riječi: biofilm, *Legionella pneumophila*, klor, klorni preparati, ponovni porast, trihalometani

SUMMARY

Legionella are often found within building water systems and domestic plumbing. They can be a problem in every part of the distribution of drinking water, from the main water supply to the final point of consumption. In the water system, where they are inside the pipes, they can easily survive in the biofilm for several years. From the water supply system, these bacteria come to swimming pools where they can create mixed biofilms with other bacteria from the water and thus represent a source of infection for bathers. The rise in the trend of building swimming pools can lead to new public health challenges.

The main goal of this research is to establish the effectiveness of chlorine solutions on the behavior of *Legionella* biofilms. Tests were performed with five different agents on a five-day-old *Legionella pneumophila* biofilm. In addition to the basic treatment, the regrowth of bacteria after the action of chlorine preparations was also performed. In addition to the topic, trihalomethane values and residual chlorine levels were measured in the solutions that treated the biofilm.

The results of this work indicate the need for further research into *L. pneumophila* biofilm. Five different agents were used in the research, none of which completely destroyed the biofilm. The solutions called Kloromix and Sani-granulat showed the best effectiveness. The solution BIS C5330 had the weakest effect on biofilm destruction, which should have better efficiency as a cleaning agent. With all five chlorine preparations, biofilm regrowth occurs after treatment. The established regrowth is an indicator of the lack of efficiency in biofilm destruction.

Key words: biofilm, *Legionella pneumophila*, chlorine, chlorine solutions, regrowth, trihalomethanes

1 SADRŽAJ

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Uvod i pregled područja istraživanja | 1 |
| 1.1 | Legionella spp..... | 1 |
| 1.2 | Karakteristike <i>Legionella pneumophila</i> | 3 |
| 1.2.1 | Patogeneza..... | 3 |
| 1.2.2 | Klinička slika..... | 4 |
| 1.2.3 | Liječenje | 4 |
| 1.2.4 | Laboratorijska dijagnostika | 5 |
| 1.3 | Bakterijski biofilm | 6 |
| 1.3.1 | Početno pričvršćivanje | 8 |
| 1.3.2 | Stvaranje mikrokolonija | 9 |
| 1.3.3 | Stvaranje zrelog biofilma | 9 |
| 1.3.4 | Disperzija biofilma | 10 |
| 1.4 | Zakonska regulativa za zdravstvenu ispravnost bazenske vode | 11 |
| 1.4.1 | Djelovanje klora | 13 |
| 1.5 | Trihalometani (THM) | 14 |
| 1.5.1 | Određivanje trihalometana | 14 |
| 2 | Cilj istraživanja | 17 |
| 3 | Materijali i metode | 18 |
| 3.1 | Bakterijski soj | 18 |
| 3.2 | Hranjiva podloga | 18 |
| 3.3 | Uređaji | 18 |
| 3.4 | Korišteni preparati | 18 |
| 3.5 | Ostali materijali i pribor | 19 |
| 3.6 | Metode rada | 19 |
| 3.6.1 | Određivanje razine trihalometana | 20 |
| 3.6.2 | Mjerenje razine slobodnog klora..... | 21 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4 | Rezultati | 22 |
| 4.1 | Tretiranje sredstvima za čišćenje i dezinfekciju | 22 |
| 4.2 | Tretiranje klorom za dezinfekciju vode | 24 |
| 4.3 | Ponovni porast nakon 24 sata | 25 |
| 4.4 | Ponovni porast nakon 72 sata | 27 |
| 4.5 | Usporedba vrijednosti svih pet korištenih sredstava | 29 |
| 4.6 | Usporedba bakterijskog porasta prema vremenskim intervalima tretiranja | 30 |
| 4.7 | Trihalometani..... | 33 |
| 4.8 | Udio slobodnog klora | 34 |
| 5 | Rasprava | 35 |
| 6 | Zaključci..... | 37 |
| 7 | Literatura | 38 |
| 8 | Životopis..... | 42 |

1. Uvod i pregled područja istraživanja

Legionella pneumophila predstavlja najviše istraženog člana roda *Legionella* (1). Ova bakterija nastanjuje slatke vode gdje parazitira unutar protozoa. Nakon prijenosa iz prirodnih vodenih staništa u ostale sustave slatkih voda, može dovesti do posljedica opasnih po zdravlje. Čest je uzročnik teške bakterijske pneumonije, koja je poznata pod nazivom Legionarska bolest (2). Ljudsko mijenjanje okoliša je dovelo do pojave legioneloze kao bolesti u drugoj polovici 20. stoljeća. Njihov život u prirodnom stanju i okruženju bio predstavljao vrlo rijetkog uzročnika bolesti kod ljudi jer prirodna slatkovodna staništa ne predstavljaju rezervoare izbijanja legioneloze (3). U okolišu se *L. pneumophila* nalazi u različitim staništima, to uključuje i stvaranje biofilмова više vrsta. Na kolonizaciju s ovom bakterijom mogu utjecati druge vrste mikroorganizama od kojih se protozoe ističu kao najvažnije u određivanju postojanosti *Legionella*. Povezanost je u korištenju protozoe za intracelularnu replikaciju. Evoluiranje s različitim vrstama protozoa je omogućila razvoj mehanizma koji omogućuje ovoj bakteriji širenje na veliki raspon domaćina, uključujući ljude (4).

Tema ovog rada je utjecaj kloriranih preparata na biofilm, *Legionella pneumophila*, koji nastaje u slatkovodnim bazenskim vodama. Uz samo djelovanje kloriranih preparata izmjerene su vrijednosti trihalometana koji nastaju kao posljedica kloriranja. Biofilm predstavlja skupinu različitih bakterijskih vrsta koje su odgovorne za većinski dio kroničnih i rekurentnih infekcija. Bakterije unutar biofilma su vrlo otporne kako na antibiotike tako i na sredstva za čišćenje i dezinfekciju. Otpornost se pripisuje egzopolisaharidnoj matrici koja osigurava hvatanje za površinu i daje čvrstoću biofilmu (5).

1.1 *Legionella* spp.

Legionella spp. se nalaze se u tlu i prirodnim vodenim staništima gdje su izložene predatorstvu protozoa (6).

Broj poznatih vrsta i serogrupa roda *Legionella* konstantno raste. Trenutno postoji više od 50 poznatih vrsta. Najviše istražen, *L. pneumophila* obuhvaća minimalno 16 različitih serogrupa (7). Neke vrste ove bakterije ne mogu rasti na standardnim medijima koji su specifični za legionele. Oni su nazvani amebnim patogenima sličnim legioneli (8).

| Species | Serogroup | Strain, source |
|-----------------------|-----------|----------------------------|
| <i>L. pneumophila</i> | 1 | 130b, Wadsworth |
| | 1 | Philadelphia-1, ATCC 33217 |
| | 1 | Oxford-4032E, ATCC 43110 |
| | 2 | Togus-1, ATCC 33154 |
| | 3 | Bloomington-2, ATCC 33155 |
| | 4 | Los Angeles-1, ATCC 33156 |
| | 5 | Dallas-1E, ATCC 33216 |
| | 6 | Chicago-2, ATCC 33215 |
| | 7 | Chicago-8, ATCC 33823 |
| | 8 | Concord-3, ATCC 35096 |
| | 13 | B2A3105, ATCC 43736 |
| | 14 | 1169-MN-H, ATCC 43703 |

Slika 1. Prikaz različitih sojeva *Legionella pneumophila* (Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Strains-of-Legionella-a-used-in-this-study_tbl1_12681569)

Legionele su često pronađene unutar građevinskih vodovodnih sustava ili kućnih vodovodnih instalacija. Predstavljaju problem unutar cijelog sustava distribucije pitke vode, od glavnog vodovoda do krajnje točke potrošnje. Ovi sustavi imaju visok omjer površine i volumena. Uz stagnaciju vode i promjenjive temperature i brzine vode, problem su i niske razine dezinficijensa (9). Sve ove stavke pridonose postojanosti i ponovnom porastu oportunističkih patogena, kao što su *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* te slobodnoživuće amebe, *Acanthamoeba spp.* i *Naegleria fowleri* (10) Legionela preživljava i napreduje u okruženjima s malo hranjivih tvari, primjer tomu je voda za piće. Boraveći u biofilmu koji su bogati hranjivim tvarima im je omogućeno preživljavanje. Uz to, biofilm im nudi zaštitu od predatorske probave raznih ameba (11).

Neki članovi ovog roda kao što su *L. dumoffii*, *L. longbeacheae* i *L. pneumophila*, mogu uzrokovati pontijačku groznicu, bolest sličnu gripi. Može doći i do teškog oblika smrtonosne upale pluća nazvane legionarska bolest (12).

1.2 Karakteristike *Legionella pneumophila*

L. pneumophila je identificirana i imenovana vrlo kasno, tek 1976. godine. Naravno danas je jasno kako je ova bakterija stvarala probleme i prije toga. Pojavljivala se u vodenim sustavima koje je sagradio čovjek čak i nekoliko desetljeća prije njenog otkrića (13).

Ova bakterija je prirodni patogen ameba (14). Gram-negativni, aerobni štapić. Njena širina je 0,5 μm i duljina 2 μm u prirodnom vodenom okolišu. Koristi aminokiseline za izvor energije i ugljika. Uz to ne oksidiraju niti fermentiraju ugljikohidrate (2).

L. pneumophila najbolje raste na pH rasponu od 5.0 do 8.5 (12) i na sobnoj temperaturi, od 25°C do 42°C s optimumom temperature rasta od 35°C (3). Svakako ove bakterije mogu preživjeti na temperaturama iznad 60°C ako su u suživotu s termo-tolerantnim amebama kao što su *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* (15).



Slika 2. Bojanje po gramu *Legionella pneumophila* (Izvor:

<https://www.idimages.org/m/atlas/organism/?atlasentryID=1&organism=Legionella>)

1.2.1 Patogeneza

Bakterije vrste *L. pneumophila* predstavljaju sve veći javnozdravstveni problem. Kod ljudi dolazi do teške upale pluća koja se naziva legionarska bolest (14) Pnevmonije uzrokovane rodnom *Legionella* čine oko 2% do 15%, u Europi i Sjevernoj Americi, svih vanbolnički stečenih upala koje zahtijevaju hospitalizaciju (16).

Zaraza i pojava bolesti je posljedica udisanja legionelom kontaminiranog aerosola. Prijenos s osobe na osobu je izrazito rijedak. Naknadno dolazi do umnažanja samih bakterija unutar alveolarnih makrofaga. Glavni mehanizam replikacije legionele unutar makrofaga slučajnih domaćina, sisavaca, je isti kod njima prirodnih domaćina ameba. Početnom pričvršćivanju i fagocitozi ove bakterije sljeduje unutarstanična replikacija. Replikacija ovisi o biogenezi, replikativnom okruženju i o regulaciji vremena izlaska. Problem predstavlja kolonizacija legionele u umjetnim slatkovodnim staništima, kao što su vodovodni sustavi pitke vode, rashladni tornjevi za klimatizaciju prostora te bazeni u javnoj uporabi, npr. toplički bazeni (14).

1.2.2 Klinička slika

U ljudskom organizmu bakterije legionele uzrokuju različitu težinu respiratornih infekcija. Najlakša infekcija slična gripi je pontijačka groznica, koja ne zahtijeva specijalizirano liječenje. Ima opće simptome kao što su povišena tjelesna temperatura, bolovi u mišićima te blage simptome kod dišnog sustava. Pored blage infekcije može dovesti do akutne upale pluća nazvane legionarska bolest, koja može dovesti do smrti (17).

Legionarska bolest je atipična upala pluća. Vrijeme inkubacije je 2-14 dana. Glavni simptomi su glavobolja, bolovi u mišićima, fizička iscrpljenost i anoreksija. Legioneloza je opasna po život kod starijih muškaraca s oslabljenim imunitetom (18). U nekim oblicima plućnih bolesti budu zahvaćeni organi kao što su CNS, jetra i crijeva, a najčešće srce kod hospitaliziranog pacijenta (19).

Visoka ozbiljnost bolesti i smrtnosti kod legionele je povezana sa čimbenicima:

- ekstremna dob (dojenčad i starije osobe),
- bolnička akvizicija,
- temeljna stanja (npr. kronična bolest pluća, transplantacija organa, završni stadij bubrežne bolesti, maligne bolesti i šećerna bolest) i
- odgađanje započinjanja antimikrobne terapije (16).

1.2.3 Liječenje

Bakterijski patogeni iz okoliša poput roda *Legionella* su glavna problematika u industrijaliziranim zemljama koje imaju sve više umjetnih ekosustava. Uz to je i čimbenik

modernog načina života i prekomjernog unosa lijekova koji dovode do povećanja učestalosti unosa nenamjernih patogena. Zbog sve veće otpornosti legionele, pronalaženje novih i učinkovitih antibiotika je izazovno. Unutarstanično porasla *L. pneumophila* je izrazito otporna na antibiotsku terapiju. Iako bi kombinirana terapija antibioticima mogla biti očiti izbor u nekim prilikama zaraze ovom bolesti, ne preporučuje se svim bolesnicima (19).

Genska terapija je tehnika koja bi mogla imati utjecaj na liječenje ove bolesti. Iako postoji dobar napredak u području senkvencioniranja genoma, još postoje problemi prilikom korištenja u terapijske svrhe. Svrha genske terapije je umetanje, utišavanje ili promjena gena kako bi se bolest prevenirala ili liječila. RNA i DNA remodeliranje molekula je pokazalo napredak u liječenju. Kombinacija nazvana CRISPR (engl. Clusters regularly interspaced short palindromic repeats) i antisense RNA sustav je predstavljena kao kontrola ekspresije bakterijskih gena. Blokiranjem gena koji manipuliraju i inaktiviraju stanicu proteina dolazi do zaustavljanja formacije vakuole koja sadrži legionelu. Blokiranjem formiranja vakuole bakterija gubi mogućnost replikacije (19).

1.2.4 Laboratorijska dijagnostika

Dijagnoza se većinom bazira na izolaciji uzročnika iz sputuma, pleuralne tekućine, bronhoalveolarne tekućine i ponekad iz hemokulture. Molekularno dijagnostičke metode su u razvoju i trebale bi poboljšati dijagnozu legioneloze u budućnosti. Za sad je ova tehnika i dalje inferiorna u odnosu na dijagnostičku točnost kultura. Standard je i dalje BCYE (puferirani ugljeni agar s ekstraktom kvasca) agar (16). Kako bi se podržao rast bakterija bitno je regulirati pH. Prilagođava se na vrijednost od 6,9, dodavanjem N-2-acetamino-2-aminoetansulfonske kiseline (ACES). Umjesto ugljikohidrata se koriste proteini kao izvor energije. Klinički važne vrste *Legionella* najbolje rastu na 35 °C u vlažnom zraku na BCYE agru. Potrebno je 2-5 dana za razvoj bakterija nakon inokulacije ploča. Ponekad inkubacija traje i do 10 dana ako su u pitanju neobične vrste legionele (12).



Slika 3. Porast *Legionella pneumophila* na BCYE agru (Izvor: <https://www.eolabs.com/product/pp0870-legionella-with-gvpc/>)

Specifičan radiološki nalaz s kojim bi se detektirala legionelna upala pluća još ne postoji. Na snimci prsnog koša se ne može razlikovati od nekih drugih pneumonia. *Legionela* je obično povezana s nakupinama na plućima (infiltratima) čiji se prikaz pogoršava na radiografiji prsnog koša kako bolest napreduje. Prikaz se može nastaviti pogoršavati unatoč već postojećem antimikrobnom liječenju (16).

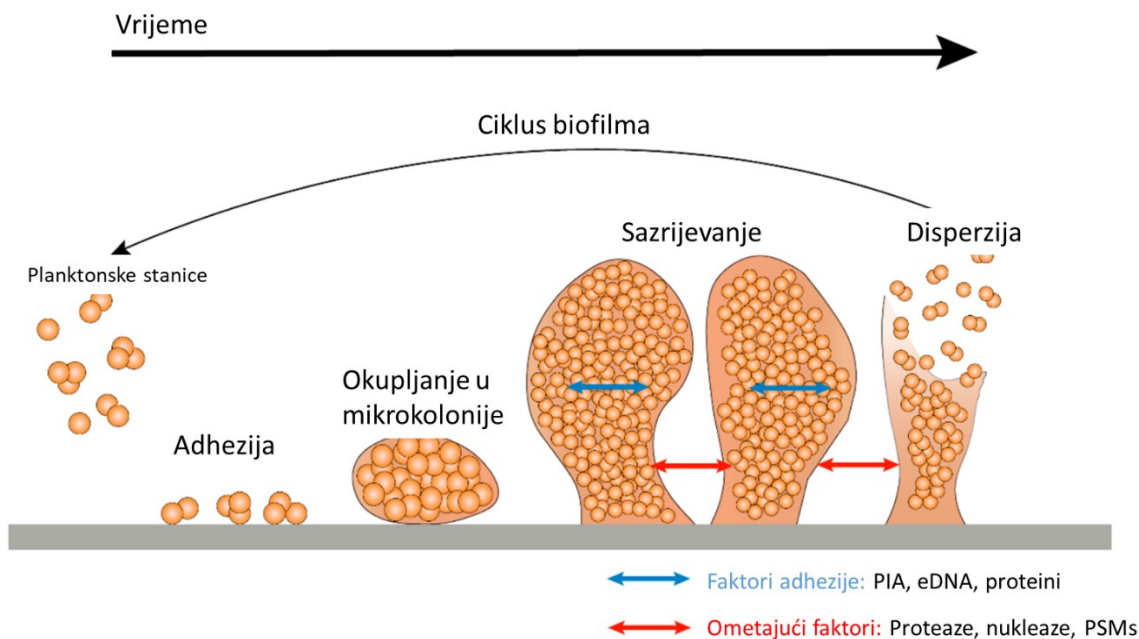
1.3 Bakterijski biofilm

Biofilmovi se definiraju kao složene mikrobne zajednice koje karakteriziraju stanice pričvršćene na supstrat a međusobno su povezani pomoću matrice samostalno proizvedenih izvanstaničnih polimernih tvari (engl. extracellular polymeric substances – EPS) (20). Glavne komponente EPS-a su i proteini i polisaharidi koji stvaraju strukturni okvir matriksa. Kolonije bakterijskih stanica obložene matriksom su odvojene jedna od druge vodenim kanalima. Kanali dopuštaju transport hranjivih tvari, kisika, gena i antimikrobnih sredstava (21). EPS je glavni put interakcije između bakterija s vanjskim okruženjem i kao takav je ključan u stvaranju biofilma. Debljina EPS-a je u rasponu od 0.2 do 10 μm , dok ukupna veličina biofilma nije veća od 10 mm. Bakterijske zajednice čine samo 5.35% njegovog sveukupnog volumena, dok je preostali volumen EPS. Polimerni sloj određuje uvjete života unutar samog biofilma. Utječe na njegovu gustoću, stabilnost, sadržaj vode, poroznost i poroznost, gustoću, sadržaj vode, naboj, hidrofobnost i mehaničku stabilnost (22). Struktura i sastav EPS-a uglavnom varira ovisno o

vrsti mikroorganizama, okolišnim faktorima i dostupnosti hranjivih tvari. Osnovne biomolekule koje čine građu EPS-a su podijeljene u dvije kategorije. Prva su molekule koje su povezane sa površinom stanice a druga kategorija su molekule izlučene van stanice. Primjer kod prve kategorije su: nastavci bakterijskih organizama koji su unutar izvanstaničnog matriksa. Molekule koje su vanstanično mogu biti: proteini, bakterijski egzopolisaharidi, DNA i eRNA (23).

Biomolekule koje su izvorno od domaćina ili okoliša također mogu biti uključene u strukturu matriksa. Proteini i glikoproteini domaćina, npr. iz sline, pridonose čvrstoći biofilma. Uz to služe kao izvor hranjivih tvari i pomažu bakteriji kod pričvršćivanja. Dokazana je prisutnost i kalcijevog karbonata u matriksu biofilma bakterije *Bacillus subtilis*. Mineral kalcit je povezan s biofilmovima bakterije *Proteus mirabilis*, i *Pseudomonas aeruginosa*. Prisutnost ovih i drugih minerala je rezultat biomineralizacije, procesa koji je reguliran djelovanjem bakterija i njihovog okoliša. Posebna klasa EPS molekula su funkcionalni amiloidi, visoko organizirane proteinske fibrile. Funkcionalni amiloidi u biofilmu djeluju na svojstva bakterijske adehezije. Osiguravaju im mehaničku stabilnost i čvrstoću. Molekularne strukture ovog tipa su prepoznate od strane imunološkog sustava i time potiču autoimuni odgovor (23).

Formiranje biofilma je složen proces koji se sastoji od nestabilne faze površinske adhezije kojoj slijedi stabilna faza gomilanja. U stabilnoj fazi dolazi do koagregacije bakterija kako bi se formirao zreli biofilm. Tijekom ovog procesa, mikroorganizmi podliježu promjenama u genskoj ekspresiji ovisno o fazi njihovog razvoja (24). Mikroorganizmi samo svojim kontaktom s površinom ili taloženjem na nju ne moraju dovesti do stvaranja biofilma (25).



Slika 4. Faze stvaranja biofilma (26)

Model ciklusa stvaranja biofilma na Slici 3. prikazuje razvoj biofilma na bilo kojoj površini i sastoji se od niza od 4 faze:

1. U prvom koraku se planktonske stanice reverzibilno pričvršćuju na površinu preko proteina povezanih s površinom.
2. Nakon pričvršćivanja, stanice se postepeno okupljaju i kreću proizvoditi ECM (tako tvore mikrokolonije) koji je ireverzibilno pričvršćen za podlogu.
3. U trećem koraku stanice se dijele tvoreći zreli biofilm.
4. U zadnjoj fazi, fazi odvajanja, enzimi kao što su proteaza i nukleaza potiču disperziju biofilma. Dolazi do odvajanja mikroorganizama koji se vrate u planktonsko stanje kako bi kolonizirali nove ekološke niše (26).

Zbog njihovog dinamičkog karaktera, biofilmovi konstantno rade promjene u vremenu i prostoru. Tako osiguravaju bolje preživljavanje i rast povezanih mikroorganizama. Upravo iz tih razloga u većini prirodnih staništa prevladava način života u biofilmu (27).

1.3.1 Početno pričvršćivanje

Kako bi početak stvaranja biofilma bio uspješan, bitno je o čvrsto vezanje mikroorganizama za površinu. Adhezija je proces definiran samim mikroorganizmom,

površinom na koju se pričvršćuje i neposrednom okolinom. Glavno pitanje je koji okidač tjera bakteriju da napusti planktonski način života i zakači se za određenu površinu. Samim time ovaj proces i dalje nije potpuno jasan (25)

Nemaju sve bakterije tendenciju prianjanja na površinu. Različiti mikroorganizmi dolaze u kontakt s određenom površinom putem sedimentacije, kretanja s tekućinom, bakterijske pokretljivosti ili putujući s drugim stanicama. Pili tipa IV, površinski nastavci, omogućuju određivanje vrste površine na koju će bakterija adherirati. Omogućuje joj mijenjanje orijentacije iz horizontalnu kao preduvjet za prianjanje. Adhezija koja je posredovana pilima tipa IV nije specifična jer omogućuje bakteriji prianjanje na gotovo sve žive i nežive površine. Kada bakterija dođe na 1 nm od podloge, razlika između privlačnih i odbojnih sila određuje proces prianjanja. Sastoje se od elektrostatskih i hidrofobnih interakcija, temperature i hidrodinamičke sile i dr. (25). Hidrofobne površine (npr. teflona ili plastika), bolje prihvaćaju mikrobnu kolonizaciju u usporedbi sa hidrofilnim površinama (npr. staklo ili metal) (24).

1.3.2 Stvaranje mikrokolonija

Nakon povezivanja mikroorganizama za površinom, slijedi stvaranje zajednice i umrežavanja mikroorganizama. Rezultat tome je trodimenzionalna struktura biofilma. Kako bi se pokretljivost bakterija smanjila sinteza bičeva se potiskuje, u svrhu boljeg pričvršćivanja na podlogu. Uz to, komponente staničnog zida prolaze kroz promjene i postaju ključni faktor u razvojnim koracima biofilma koji slijede. Sastavni dio stanične stijenke, Lipoteihoična kiselina se pokazala izrazito važnom kod stvaranje biofilma. Ima utjecaj putem elektrostatskih sila. Kod nekih vrsta gram-negativnih bakterija, specifičnim adhezinama se pojačava pričvršćivanje. Adhezini se nalaze na površini bakterijske stanice ili na pilima i flagelama (25).

1.3.3 Stvaranje zrelog biofilma

Sljedeći proces je stvaranje trodimenzionalne zajednice u prostoru. Granica između mladog i zrelog biofilma često nije jasna. Značajke poput stvaranja izvanstaničnog matriksa uvelike olakšavaju njihovo razlikovanje. Bakterijskoj zajednici EPS pruža zaštitu od djelovanja lijekova i ostalih štetnih tvari. Olakšava im hvatanje za površinu i naknadno stvaranje više slojeva samog biofilma. Prisutnost EPS-a definira zrelu strukturu, ali krajnji oblik je ipak određen čimbenicima okoliša. Jedan od čimbenika je brzina protoka tekućine koja direktno

utječe na građu biofilma. Zreli biofilmovi se sastoje od više slojeva mikrobnih stanica. Oni se nalaze unutar matriksa, a čine ih heterogene stanične populacije. Višeslojnom strukturom dolazi do podjele aktivnosti unutar biofilma. Donji slojevi uglavnom miruju, dok srednji i gornji slojevi imaju metaboličku aktivnost. Daljnjim sazrijevanjem dolazi do smanjenja metaboličke aktivnosti i mirovanja staničnih populacija. Ove populacije stanica nazivaju se "perzisterima" i podižu razinu otpornosti na antibiotike (25).

1.3.4 Disperzija biofilma

Životni ciklus biofilma završava stadijem disperzije. Dolazi do raspršenja stanica od biofilma i njihova kolonizacija na nove površine. Proces odvajanja je pasivan i pod utjecajem je sila naprezanja. Prema nekim istraživanjima, do odvajanja dolazi samo kod biofilmova kojima laminarnim silama odjednom pređu u turbulentne sile naprezanja. Suprotno tomu je disperzija koja je aktivan proces. Uglavnom je pokreću okolišni čimbenici i detekcija kvoruma (engl. Quorum Sensing - QS) mehanizmi. Važna je za proces širenja mikrobnih zajednica i ima veliki utjecaj na infekcije koje su povezane s biofilmom. Stanice koje su se odvojile učestalo stvaraju teže infekcije na drugim lokacijama u tijelu domaćina, također stvarajući novi biofilm (25). Izlaskom iz biofilma, stanice dolaze do gubitka svih prednosti koje su imale u zajednici, samim time i otpornost na lijekove. Čemu onda disperzija? Činjenica je da život u biofilmu ima i razne nedostatke. Bakterije imaju različite lokacije u zajednici a time imaju i pristup različitim koncentracijama hranjivih tvari i otpadnih tvari. Rastom biofilma dolazi do sve većih razlika u pristupu hranjivim tvarima i otpadnim produktima. Kako biofilm postaje sve gušći dolazi do natjecanja za nutrijente. Upravo se to smatra kao pokretač disperzije (27).

Disperzija je najsloženiji i najmanje shvaćen proces u procesu razvoja bakterijskog biofilma. Ovaj proces se razlikuje među mikroorganizmima. Čimbenici koji utječu na disperziju su razni, od podražaja iz okoliša, hranjivih tvari sve do cis-2-decenske kiseline ili dušikovog oksida. Razumijevanje procesa disperzije je ključno razvoju novih i alternativnih metoda djelovanja na biofilm (25)

1.4 Zakonska regulativa za zdravstvenu ispravnost bazenske vode

Pravilnik o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 59/2020) definira bazensku vodu kao „voda u bazenima za rekreativne, sportske, terapijske ili druge aktivnosti“. Sljedeći navod iz pravilnika govori da je bazen „objekt, različitih dimenzija i oblika, u kojem se nalazi bazenska voda, a koristi se za rekreativne, sportske, terapijske ili druge aktivnosti. Ovisno o načinu pripreme bazenske vode, bazeni se dijele na konvencionalne i biološke bazene“ (28).

Važan dio održivosti same bazenske vode ovisi o vodi za punjenje koja se koristi kod prvog punjenja ili dopunjavanja bazena (28). Voda kojom se puni bazen mora ispuniti uvjete propisane propisima o vodi za ljudsku potrošnju, iznimka su mineralne tvari koje ne ometaju postupke pripreme bazenske vode. Ako voda nije iz javnog vodoopskrbnog sustava, kvaliteta se provjerava jednom godišnje za parametre A. Ulazna voda se još provjerava jednom u tri godine na parametre B koji su definirani Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/2023) (28,29).

Tablica 1. Uvjeti za bazensku vodu u konvencionalnim bazenima (preuzeto iz NN 59/2020).

| Broj | Pokazatelj | Mjerna jedinica | Vrijednost | |
|------------|--|-------------------|------------|----------|
| | | | min. | max. |
| 1 | Mikrobiološki | | | |
| 1.1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | cfu/100 ml | | 0 |
| 1.2 | <i>Escherichia coli</i> | cfu/100 ml | | 0 |
| 1.3 | <i>Legionella</i> spp. (Napomena 1) | cfu/100 ml | | 0 |
| 1.4 | <i>Staphylococcus aureus</i> (Napomena 2) | cfu/100 ml | | 100 |
| 1.5 | Broj kolonija pri (36±2)°C/(44±4) h | cfu/ml | | 200 |
| 2 | Fizikalno – kemijski | | | |
| 2.1 | Boja | Pt/Co skale | | 20 |
| 2.2 | Mutnoća | NTU | | 1,0 |
| 2.3 | Koncentracija vodikovih iona (Napomena 3) | pH jedinica | 6,5 | 7,8 |
| 2.4 | Redoks potencijal prema Ag/AgCl, 3.5 M KCl, rezultat izražen prema HSE (Napomena 4, 5) | mV | | |

| | | | | |
|------------|--|---|------------|------------|
| | a) slatka voda pH 6,5-7,3 | | >750 | |
| | pH 7,3-7,8 | | >770 | |
| | b) morska voda pH 6,5-7,3 | | >700 | |
| | pH 7,3-7,8 | | >720 | |
| | c) prirodna mineralna voda | Granična vrijednost određuje se eksperimentalno | | |
| 2.5 | Električna vodljivost (pri 20 °C) | μS/cm | | |
| 2.6 | Slobodni klor (Napomena 4, 6, 7,8) | mg/l | 0,2 | 1,0 |
| 2.7 | Trihalometani (ukupni) (Napomena 9) | μg/l | - | 100 |
| 2.8 | Klor dioksid (Napomena 10) | mg/l | 0,2 | 0,3 |
| 2.9 | Klorit (Napomena 10) | μg/L | | 400 |
| 2.10. | Ozon (Napomena 11) | mg/L | | 0,05 |
| 2.11. | Cijanurna kiselina (Napomena 12) | mg/L | | 50 |

Napomene:

(1) Pokazatelj se provjerava jednom godišnje u bazenima s miješanjem vode i/ili u bazenima kod kojih se može stvarati aerosol, ako je temperatura vode u bazenu ≥ 23 °C. Kod bazena koji rade sezonski pokazatelj se provjerava na početku sezone kupanja.

(2) Dva puta godišnje, u bazenima s morskom vodom.

(3) Mjerenje na terenu ili laboratoriju.

(4) Mjerenje na terenu.

(5) U kontinuiranom mjerenju redoks potencijala, dopuštena pogreška mjerenja je ± 20 mV. Kod znatno nižih vrijednosti od onih navedenih u tablici, mora se provjeriti rad uređaja za pripremu vode. Kod navođenja izmjerene vrijednosti mora se navesti referentna elektroda ili podatak da je vrijednost izračunata.

(6) Iznimno su za ograničeno vrijeme radi ispunjavanja sukladnosti s propisanim mikrobiološkim pokazateljima za bazenske vode dozvoljene više koncentracije, ali koncentracija slobodnog klora ne smije biti iznad 1,2 mg/l.

(7) Iznimno kod hidromasažnih kada su dozvoljene veće koncentracije slobodnog klora, ali ne iznad 3,0 mg/L.

(8) U bazenima s temperaturom vode $\geq 23^{\circ}\text{C}$ i mogućnošću aerosolizacije vode, koncentracija slobodnog klora mora biti najmanje 0,7 i ne veća od 1,0 mg/L.

(9) Jednom mjesečno. Trihalometani ukupni podrazumijevaju zbroj spojeva: triklorometan, tribrometan, bromodiklorometan i dibromoklorometan.

(10) Ako se prilikom pripreme vode upotrebljava klor dioksid.

(11) Ako se prilikom pripreme vode upotrebljava ozon.

(12) Ako se prilikom pripreme vode upotrebljavaju kloroizocijanurati (28).

Očitanjem iz tablice su vidljivi podatci koji su ključni u ovom radu. Na prvom mjestu je mikrobiološki parametar porasta *Legionella spp.* kojeg ne smije biti (cfu/100 ml =0). Nadalje su važni fizikalno-kemijski pokazatelji slobodnog klora i ukupnih trihalometana. Vrijednost slobodnog klora mora biti između 0,2 i 1,0 mg/l. Ukupni trihalometani ne smiju prelaziti brojku od 100 $\mu\text{g/l}$

1.4.1 Djelovanje klora

Biofilmovi su rasprostranjeni gotovo u svim vodoopskrbama, s velikim udjelom pitke vode unutar biofilmova, uključujući i patogene mikroorganizme (30). Kemijska dezinfekcija sa slobodnim klorom ili monokloraminom većinom se koristi kod potrebe za inaktivacijom patogena i kontrole rasta biofilma unutar vodenih sustava. Klor je izrazito jak oksidans i pokazao je izrazito snažno oštećivanje bakterijske membrane. S tim uzrokuje curenje proteina i nukleinske kiseline uz smrtonosno oštećenje DNA (31, 32)

Monokloramin je pokazao sporo djelovanje na DNA i RNA, ali brzo s nekoliko aminokiselina. Uzrokuje mala oštećenja bakterijskih membrana. Pretpostavka je da manja snaga monokloramina zahtijeva ciljano djelovanje prije nego što se može uočiti mikroba inaktivacija (33).

Usporedno mjerenje prodiranja slobodnog klora i monokloramina u biofilm je ustanovilo da monokloramin učinkovitije prodire u biofilm od slobodnog klora. Svakako povećano prodiranje nije povezano s boljom djelotvornosti na mikroorganizme unutar biofilma (34).

1.5 Trihalometani (THM)

Klor se smatra najkorištenijim sredstvom za kemijsku dezinfekciju vode zbog svoje učinkovitosti i niske cijene. Postupak dezinfekcije kloriranjem se rutinski provodi još od početka dvadesetog stoljeća. Cilj je uvijek bio isti, iskorijeniti i inaktivirati patogene u vodi za piće. Proces kloriranja vode je jedan od većih napredaka u javnom zdravstvu zbog smanjena pojave bolesti koje se prenose vodom. Ovaj spoj je izabran zbog niskih operativnih troškova, jednostavno se rukuje s njim, ima visoku učinkovitost na sobnoj temperaturi i kratko je vrijeme uključeno u proces. Pored glavnog i prvog djelovanja, klor štiti vodu i od daljnje kontaminacije. Usprkos velikoj učinkovitosti klora kao dezinficijensa, svojom oksidacijskom moći može stvoriti nusprodukte. Oni nastaju reakcijom oksidacije klora sa organskim tvarima, jodom i bromidima. Najčešće praćeni nusprodukti su trihalometani (THM). Trihalometani nastaju u procesu dezinfekcije kada oslobođeni klor reagira s prirodnim organskim tvarima (huminske i fulvinske kiseline) koje su prisutne u vodi (35).

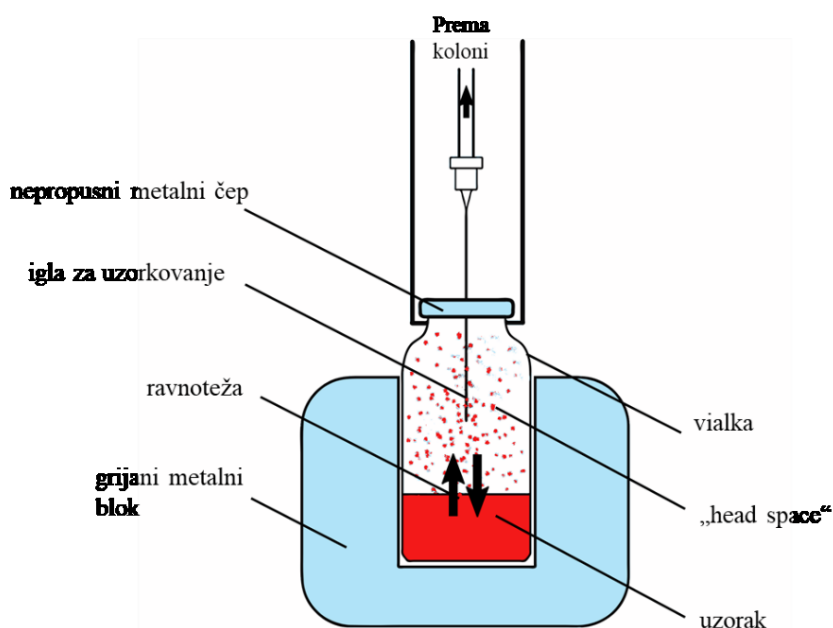
Putevi izlaganja THM-ima su oralno, dermalno i inhalacijom ovog nusprodukta. Nakon apsorpcije ovi spojevi teže bioakumulaciji kako u masnom tkivu tako i u jetri, bubrezima i plućima, ovisno o načinu izloženosti. Bitan put unosa je udisanje. Trihalometani su hlapljivi i lako se akumuliraju u unutarnjem zraku zatvorenih prostora bazena tijekom kupanja i sličnih radnji (35).

1.5.1 Određivanje trihalometana

Metoda određivanja trihalometana koristi tehniku kromatografije, kojom se kemijski sastojci u vodi razdvajaju, identificiraju i kvantitativno određuju. Ova tehnika omogućuje razdvajanje složenih smjesa na temelju različitih interakcija između komponenata uzorka i dvije faze unutar kromatografskog sustava. Pokretna faza može biti plin ili tekućina, dok je nepokretna faza krutina. Učinkovitost uzorkovanja ovisi o topljivosti uzorka u pokretnoj fazi te njegovoj interakciji s nepokretnom fazom, a ključni su faktori otapanje, apsorpcija i kemijska reakcija komponenata uzorka (36)

Trihalometani se određuju pomoću plinske kromatografije (GC), uz korištenje detektora za (ECD) ili masene spektrometrije (MS). Ovi spojevi mogu se kvantitativno odrediti koristeći metode poput ekstrakcije tekuće-tekuće, pri čemu se organska otapala dodaju u vodeni uzorak kako bi se trihalometani izdvojili. Nakon miješanja, spojevi se razdvajaju na temelju njihove topljivosti u različitim tekućinama (37)

U „headspace“ tehnici, uzorak se uzima iz plinovite faze zatvorene unutar začepljenih vialki nakon što se na povišenoj temperaturi uspostavi ravnoteža između plinovite i tekuće faze. Ova metoda zahtijeva da analizirani spojevi, poput trihalometana, imaju visoku hlapljivost, dok ostale komponente uzorka ostaju manje hlapljive ili uopće nehlapljive. Tehnika je posebno učinkovita za hlapljive spojeve, omogućujući preciznu kvantifikaciju plinovitih komponenti unutar složenih uzoraka (38). Metoda određivanja trihalometana akreditirana je prema normi HRN EN ISO 10301:2002 en; Odjeljak 3: Statička „head space“ metoda i analiza na plinskom kromatografu.



Slika 5. Prikaz automatskog uzimanja uzorka kod "headspace" plinske kromatografije (Izvor: <https://blog.biomall.in/headspace-gas-chromatography-gc-hs-for-residual-solvent-analysis>)

Određivanje trihalometana u vodi regulirano je Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/2023) koji propisuje standarde kvalitete vode i metode analize. Uz to, Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju (NN 125/17) regulira monitoring, planove sigurnosti vode te način vođenja registra pravnih osoba koje se bave javnom vodoopskrbom (29, 39).

Plinska kromatografija je metoda kojom se određuju trihalometani u vodi, a temelji se na korištenju plina kao pokretne faze i krute tvari kao nepokretne faze. Ova tehnika se može promatrati kroz dva aspekta – kao razdjelna ili apsorpcijska kromatografija, ovisno o fizičko-

kemijskim interakcijama. U postupku plinske kromatografije, inertni plin nosi uzorak kroz kromatografsku kolonu ispunjenu stacionarnom krutom fazom. Uzorak se, pri povišenoj temperaturi, injektira u plinsku struju gdje ishlapljuje i ulazi u kolonu. Komponente uzorka apsorbiraju se na nepokretnu fazu, a zatim ponovno isparavaju, što omogućuje njihovo razdvajanje. Zadržavanje svake komponente ovisi o njihovoj hlapljivosti i polarnosti, što rezultira njihovim različitim vremenima izlaska iz kolone. Nakon razdvajanja, detektor bilježi rezultate u obliku kromatograma, a uspješno razdvajanje se očituje u jasnim, odvojenim krivuljama na kromatogramu (40).

U procesu plinske kromatografije kao plinovi nosioci koriste se inertni plinovi visoke čistoće, poput vodika, dušika i helija, pri čemu je helij najčešće korišten. Sustav kromatografije uključuje reguliranje brzine protoka plina kroz kolonu. Važno je da brzina protoka plina bude optimalna – prebrz protok može otežati ravnotežu između pokretne i nepokretne faze, što rezultira lošim razdvajanjem komponenata. S druge strane, prespor protok uzrokuje difuziju plinova, što produžuje vremenski interval prolaska komponenata kroz kolonu, smanjujući učinkovitost analize. Injektor, koji je na visokoj temperaturi, omogućuje ubrizgavanje uzorka u sustav pomoću šprice, što osigurava brzo isparavanje uzorka. Dulja kolona povećava preciznost analize, dok manji promjer kolone poboljšava učinkovitost razdvajanja. Na kraju kolone nalazi se detektor, koji bilježi prolazak odvojenih komponenata slanjem električnog signala pri svakom prolasku. Detektor reagira na prisutnost specifičnih kemijskih ili fizičkih svojstava plina nosioca, što omogućuje identifikaciju odvojenih tvari u uzorku (40).

2 Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je saznati utjecaj klornih preparata na već stvoreni biofilm *Legionella pneumoniae*. Testiranja su rađena sa pet različitih sredstava na biofilmu starom pet dana. Uz osnovni tretman je rađen i ponovni porast nakon djelovanja klornih preparata kako bi se ustanovilo stvarno inhibiranje porasta bakterija. Dodatno na temu su određene vrijednosti trihalometana i mjerene su razine rezidualnog klora u preparatima nakon tretmana biofilma. Glavni cilj je ustanoviti djelotvornost klornih preparata u bazenskoj vodi i ponašanje biofilma legionele.

3 Materijali i metode

3.1 Bakterijski soj

U istraživanju je korišten soj bakterije *Legionella pneumophila* 130b. Bakterija je čuvana u 10% glicerol bujonu na -80°C. Prije izvođenja pokusa, bakterija je izvađena iz hladnjaka i nasadena na BCYE agar te uzgajana na 37°C tijekom 3 dana.

3.2 Hranjiva podloga

Korišten je BCYE agar koji je selektivna podloga. Najčešće se uporabljuje za rast gram-negativne *Legionella pneumophila*. Hranjiva podloga se sastoji od ekstrakta kvasca, ugljena, kalijevog karbonata, željezovog pirofosfata, ACES pufera i agra (41).

3.3 Uređaji

- UV-VIS eppendorf BioPhotometer
- ECD GC-ECD Thermo Trace 1300 GC
- Ultrazvučna kada

3.4 Korišteni preparati

Sredstva za čišćenje i dezinfekciju:

1. Kloromix – <5% neionske površinski aktivne tvari, fosfonat, polikarboksilat. Sadrži natrijev hipoklorit; natrijev hidroksid
2. Sani-granulat – Sadrži 99% natrijevog dikloroizocijanurat dihidrata
3. BIS C5330 – Sadrži 3% natrijevog dikloroizocijanurat dihidrata, 30% fosfata, <5% neionske površinski aktivne tvari

Sredstva za dezinfekciju bazenske vode:

1. Klor granule – 600 g/kg aktivnog klora u obliku troklosen natrij dihidrata 1000g/kg
2. Klor tablete – 891 g/kg aktivnog klora na bazi trikloroizocijanuronske kiseline

3.5 Ostali materijali i pribor

- Test trakice za mjerenje slobodnog klora
- Automatske pipete
- Epruvete
- Kivete
- Odmjerne tikvice
- Staklene bočice s nepropusnim metalnim čepom (vialke)
- Kliješta za hermetičko zatvaranje vialki

3.6 Metode rada

Bakterijski soj je prenesen s podloge u tekući hranjivi medij (pripravljen od sterilne vode, željeza i L-cisteina) u kojem je homogeniziran i izmjeren je broj bakterija s UV-VIS fotometrom kako bi dobili traženu koncentraciju. Pripravljena je koncentracija bakterija od 10^7 /ml. Nakon toga slijedi postupak prenošenja prethodno pripremljene otopine bakterija na plastične (polistiren) podloge.

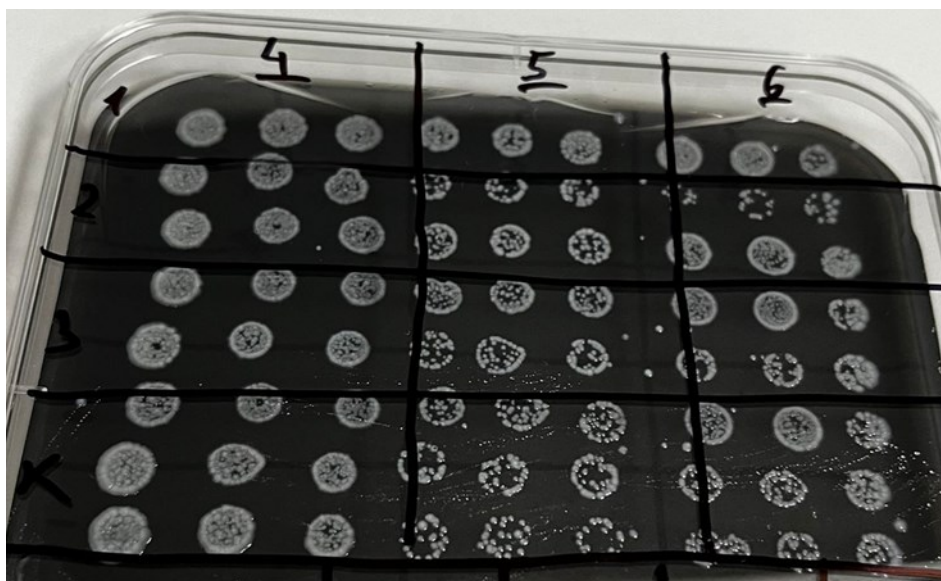
Bakterijski soj *L. pneumophila* 130b je stavljen u hranjivi tekući medij (pripravljen od sterilne vode, željeza i L-cisteina) na plastičnu podlogu kako bi se stvorio biofilm. Postupak je rađen na sobnoj temperaturi, 25°C, u trajanju od 5 dana.

Drugi dio pokusa zahtjeva pripremu otopina klornih preparata prema uputi proizvođača. Nakon same pripreme slijedi tretiranje biofilma. Sredstva za čišćenje (Kloromix, Sani-granulat i BIS C5330) su djelovala u vremenskom razdoblju od 15 i 30 minuta. Preporučeno od proizvođača je 15 minuta pa je uz to i testirano dvostruko duže vrijeme djelovanja preparata na biofilm kako bi se istražilo djelovanje. Pripremljena sredstva za kloriranje bazenske vode (klor granule i klor tablete) su djelovala na biofilm u vremenskom od 24 sata. Klor granule su otopljene u količini koja je preporučena za naglo podizanje razine klora u bazenskoj vodi (šok kloriranje). Klor tablete su pripremljene u razini koja zadovoljava redovno održavanje prihvatljive razine klora u bazenima.

Nakon što se stvorio biofilm, hranjivi tekući medij je odstranjen kako bi ostala plastična podloga samo sa biofilmom legionele. Podloge su još jednom isprane sterilnom vodom da bi se uklonili ostatci živih bakterija. Slijedi tretman klornim preparatima koji su prijašnje pripremljeni. Ostavljeno je da sredstva djeluju točno određeno vremensko razdoblje. Nakon

procesa tretiranja, uklanja se medij za tretiranje i ispire sterilnom vodom. Kako bi bili sigurni da je klor inaktiviran dodan je natrij tiosulfat na 15 minuta. Opet slijedi pražnjenje plastičnih podloga i dodaje se sterilna voda. Tako pripremljene podloge idu u ultrazvučnu kadu na jednu minutu. Ovaj postupak se radi kako bi odvojili biofilm od podloge i samim time ga mogli kultivirati. Nakon ultrazvuka slijedi nakapavanje (kapi od 10 μ l) na hranjivu podlogu (BCYE) u više razrjeđenja. Inkubacija na 35°C u trajanju od 3 dana.

Ponovni porast (engl. re-growth) bakterija je rađen sličnim postupkom kao i obično tretiranje objašnjeno u prijašnjem koraku. Nakon djelovanja klornih preparata i inaktivacije klora sa natrij tiosulfatom, slijedi ispiranje i tretirani se biofilmovi ostavljaju na sobnoj temperaturi od 25°C, 24 sata i 72 sata. Ovim postupkom se testira ponašanje biofilma *Legionella pneumophila* nakon što ostane u vodenom mediju poslije tretiranja. Nakon perioda ponovnog porasta slijedi sonikacija te određivanje broja bakterija nakapavanjem serija razrjeđenja na na hranjivu podlogu (BCYE) i inkubacija na 35°C u trajanju od 3 dana.



Slika 6. Rast *Legionella pneumophila* na BCYE agru (slika iz osobne arhive)

3.6.1 Određivanje razine trihalometana

Paralelno sa tretiranjem je određivana razina trihalometana. Klorni preparati koje bi vadili nakon tretiranja biofilma su preneseni u epruvete i odneseni na plinsku kromatografiju za određivanje razine trihalometana. Metoda određivanja se temelji na „headspace“ tehnici koja ubacuje plinoviti uzorak u plinski kromatograf s MS ili ECD detektorom. Odvija se tekuće-tekuće određivanje sa otapalom i određuje se para nad tekućim uzorkom bez ekstrakcije.

Određivanje pare bez ekstrakcije se zasniva na principu isparavanja hlapljivih komponenata iz tekućeg u plinovito stanje. Postiže se ravnoteža između koncentracija u tekućini i pari. Metoda određivanja trihalometana se provodi i akreditirana je prema normi HRN EN ISO 10301:2002. Trihalometani u bazenskoj vodi se određuju plinskom kromatografijom sa MS i ECD detektorom. Određuju se razine kloroforma, bromdiklormetana, dibromklormetana i bromoforma.

3.6.2 Mjerenje razine slobodnog klora

Provjeravanje razine slobodnog klora nakon tretmana je određivan test trakicama. Trakice promjenom boje ukazuju na razinu preostalog klora u ppm. Trakice su korištene po uputi. Uroni se u suspenziju na tri sekunde, zatim izvadi i pričekaj 10-15 sekundi. Odmah slijedi očitavanje na principu usporedbe boje na trakici i referentne boje na originalnom pakiranju.

Tablica 2. Koncentracije pripremljenih preparata

| Vrsta sredstva | Koncentracija |
|----------------|---------------|
| SANI-GRANULAT | 0,2g/L |
| BIS C5330 | 15g/L |
| KLOROMIX | 20% |
| KLOR TABLETE | 1,9mg/L |
| KLOR GRANULE | 15mg/L |

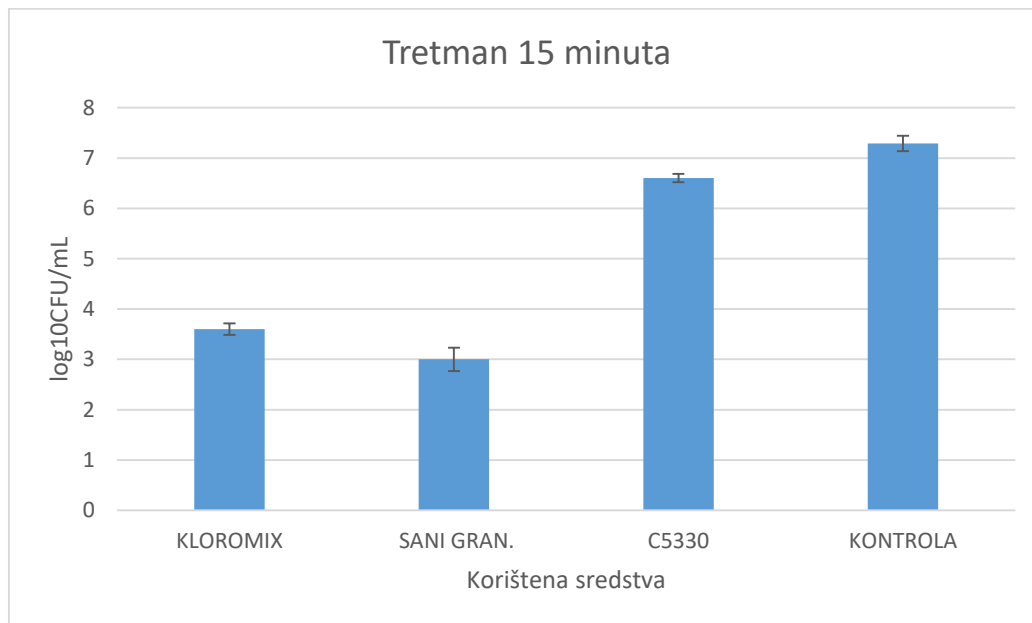


Slika 6. Test trakice za određivanje razine slobodnog klora (slika iz osobne arhive)

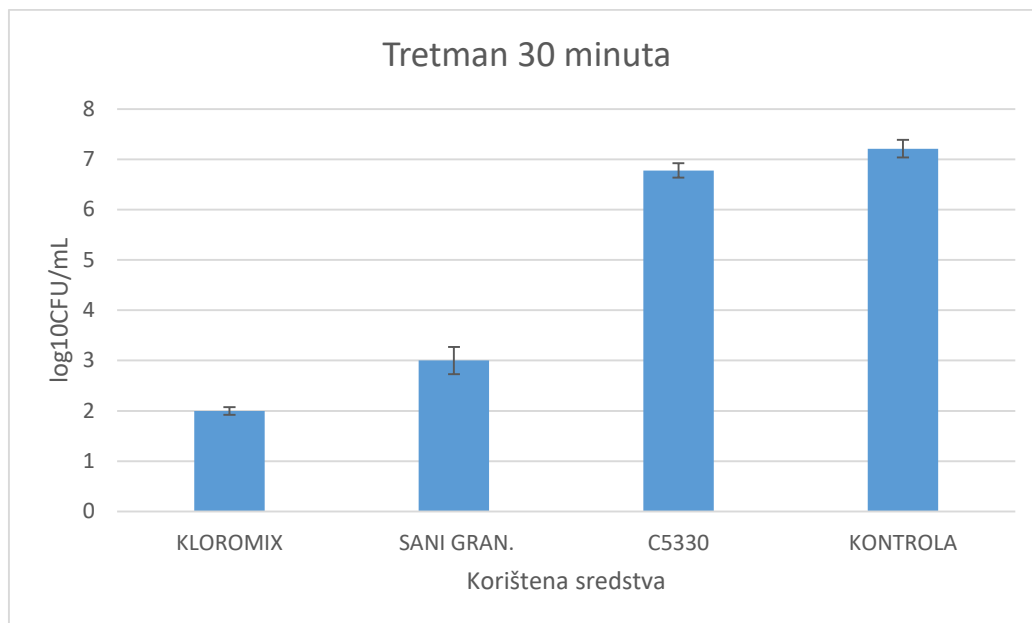
4 Rezultati

Praćen je utjecaj klornih preparata na pet dana star biofilm *Legionella pneumophila*, u različitim vremenskim intervalima tretmana. Bakterije su nasađene na BCYE agar i uzgajana na 37°C tijekom 3 dana. Zabilježen je porast bakterija na hranjivim podlogama, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1 Tretiranje sredstvima za čišćenje i dezinfekciju



.Graf 1. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tretiranja u trajanju od 15 minuta. Korištena su tri različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

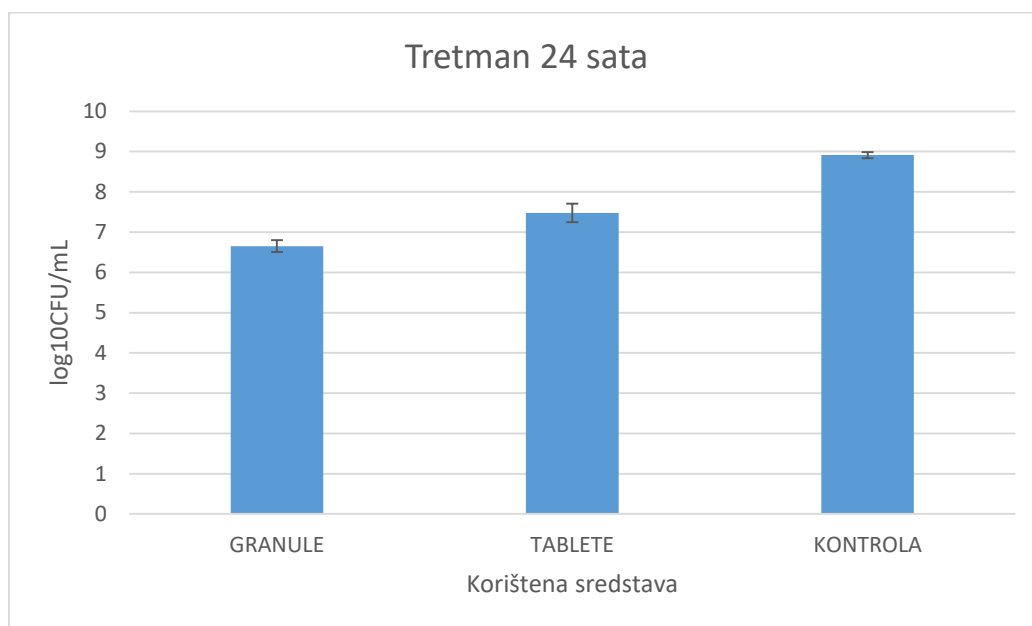


Graf 2. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tretiranja u trajanju od 30 minuta. Korištena su tri različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Na grafu 1. je vidljiv utjecaj sredstava za čišćenje i dezinfekciju. U usporedbi s kontrolnim porastom sredstvo pod nazivom Sani-granulat je pokazalo najbolji učinak u tretiranju biofilma *L. pneumophila* u vremenu od 15 minuta. Kloromix je pokazao malo lošije djelovanje, ali i dalje učinkovito. Dok je sredstvo C5330 pokazalo izrazito loš učinak.

Na grafu 2. se vidi promjena kod djelovanja sredstava u dužem vremenskom periodu od 30 minuta. Kloromix ima izrazito jače djelovanje na bakterijski porast u usporedbi s ostala dva sredstva. Sredstva Sani-granulat i C5330 su se zadržala na istoj razini djelotvornosti kao i u slučaju kad djeluju 15 minuta na stvoreni biofilm. Usporedno s kontrolnom vrijednosti Kloromix i Sani-granulat pokazuju učinkovitost a vrijednost porasta za djelovanje sredstva C5330 se zanemarivo malo razlikuje od kontrole.

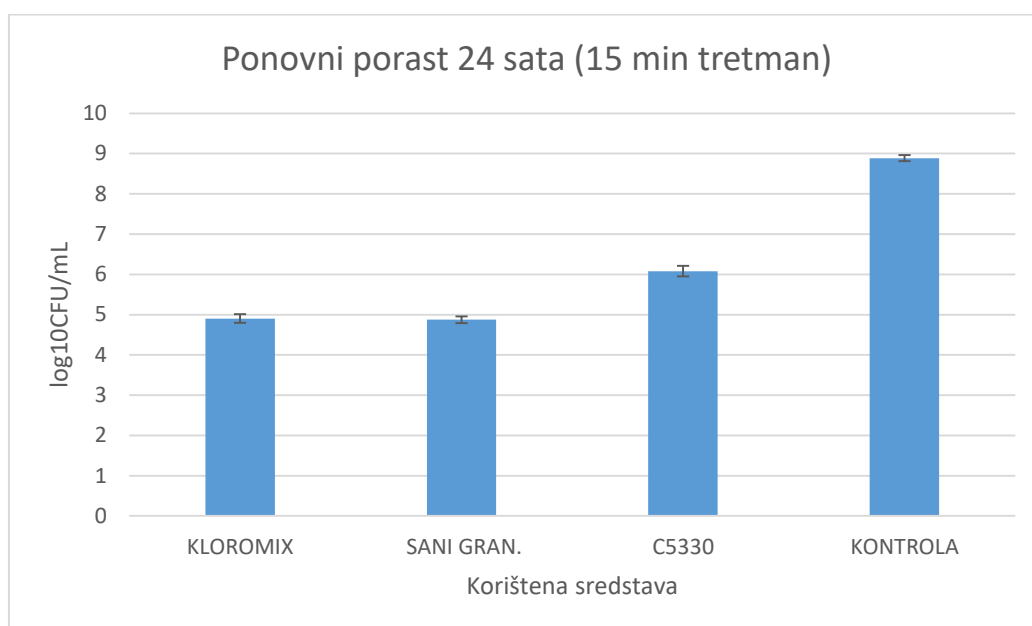
4.2 Tretiranje klorom za dezinfekciju vode



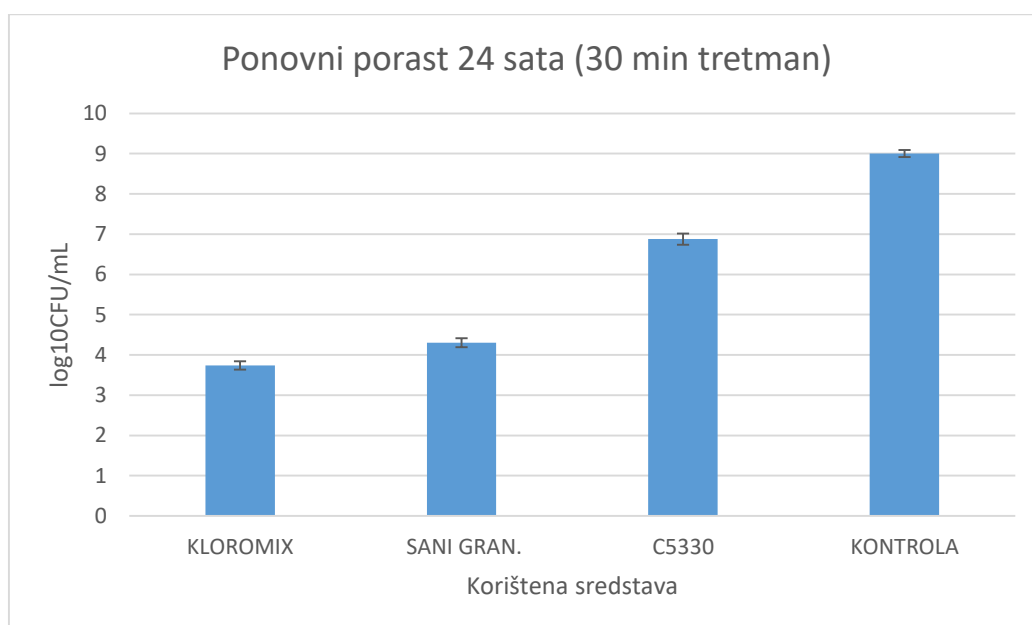
Graf 3. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tretiranja u trajanju od 24 sata. Korištena su dva različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Na grafu 3. su prikazane razlike djelovanja klor granula i klor tableta. U usporedbi s kontrolnim porastom uočena je veća učinkovitost klor granula. Iako su granule djelotvornije, vrijednosti porasta bakterija za oba sredstva su velika.

4.3 Ponovni porast nakon 24 sata

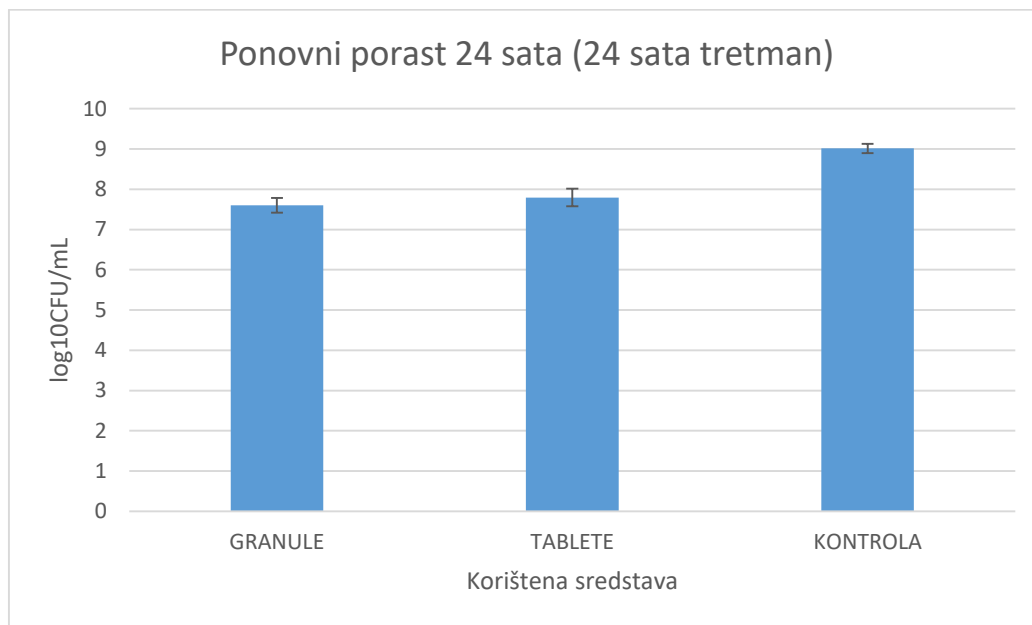


Graf 4. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon ponovnog porasta od 24 sata s trajanjem tretiranja od 15 minuta. Korištena su tri različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.



Graf 5. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon ponovnog porasta od 24 sata s trajanjem tretiranja od 30 minuta. Korištena su tri različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

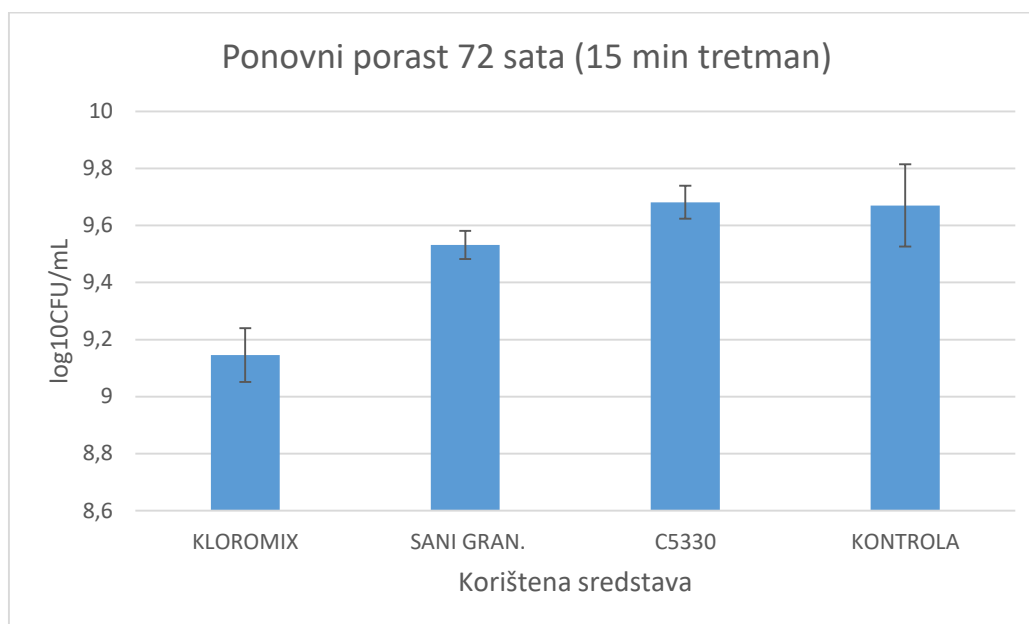
Grafički prikaz ponovnog porasta nakon 24 sata u oba slučaja nam ukazuje na povećavanje broja bakterija *L. pneumophila*. Graf 4. prikazuje veće vrijednosti od grafa 5. To je posljedično dvostruko dužem djelovanju tretmana u slučaju drugog prikaza koji iznosi 30 minuta.



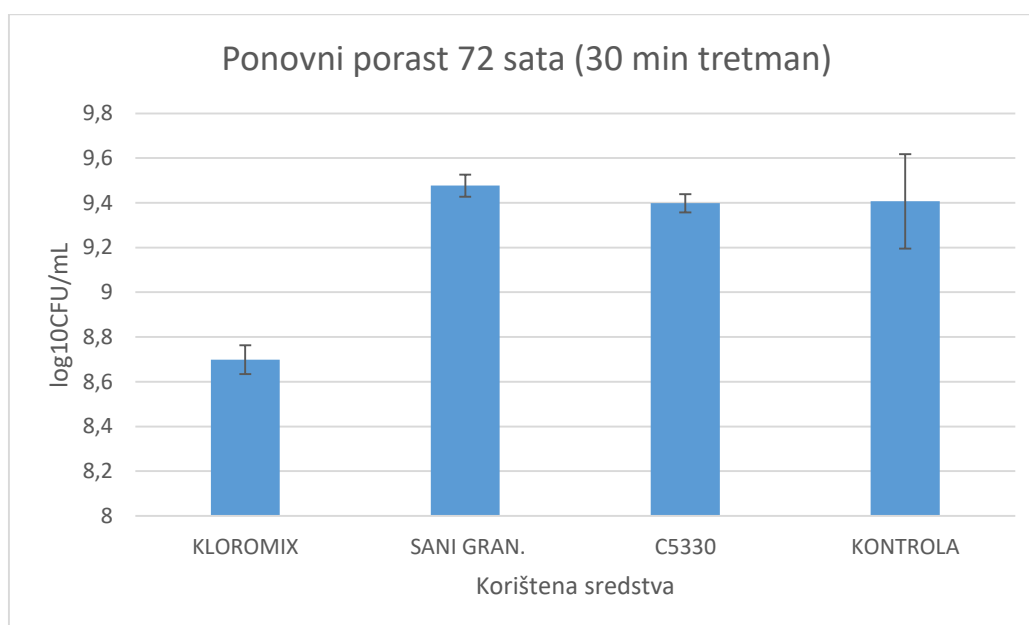
Graf 6. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon ponovnog porasta od 24 sata s trajanjem tretiranja od 24 sata. Korištena su dva različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Grafičkim prikazom je vidljiv slabiji ponovni porast kod klor granula u odnosu na klor tablete. Iako se vrijednosti statistički ne razlikuju, odnos veličina približno odgovara grafu 3. gdje je prikazana djelotvornost nakon tretmana 24 sata. Uspoređujući s kontrolnim porastom, oba sredstva su pokazala blago djelovanje na inhibiciju bakterijskog rasta.

4.4 Ponovni porast nakon 72 sata

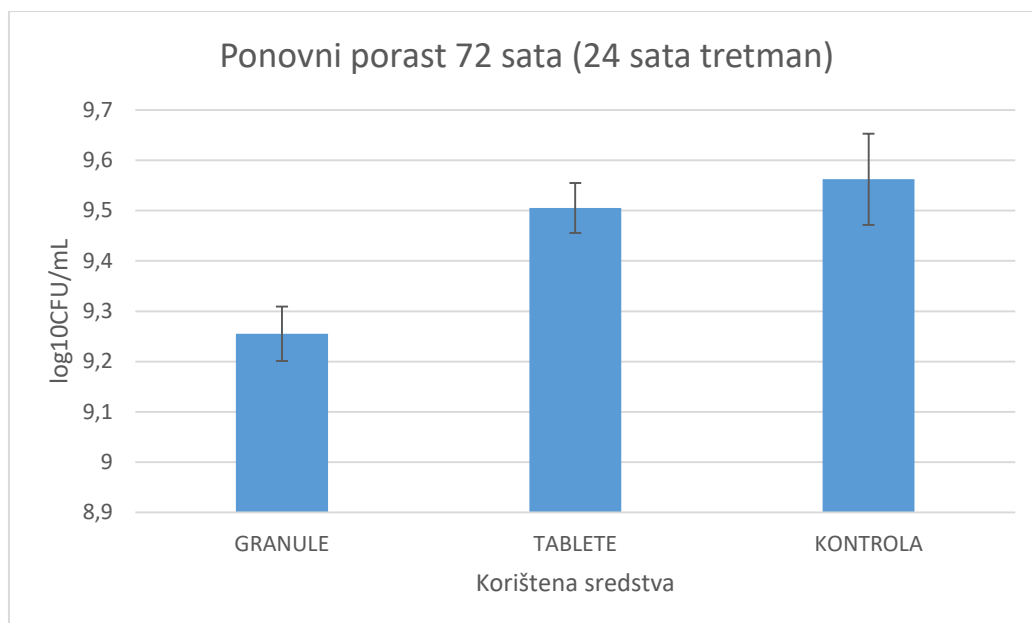


Graf 7. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon ponovnog porasta od 72 sata s trajanjem tretiranja od 15 minuta. Korištena su tri različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.



Graf 8. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon ponovnog porasta od 72 sata s trajanjem tretiranja od 30 minuta. Korištena su tri različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

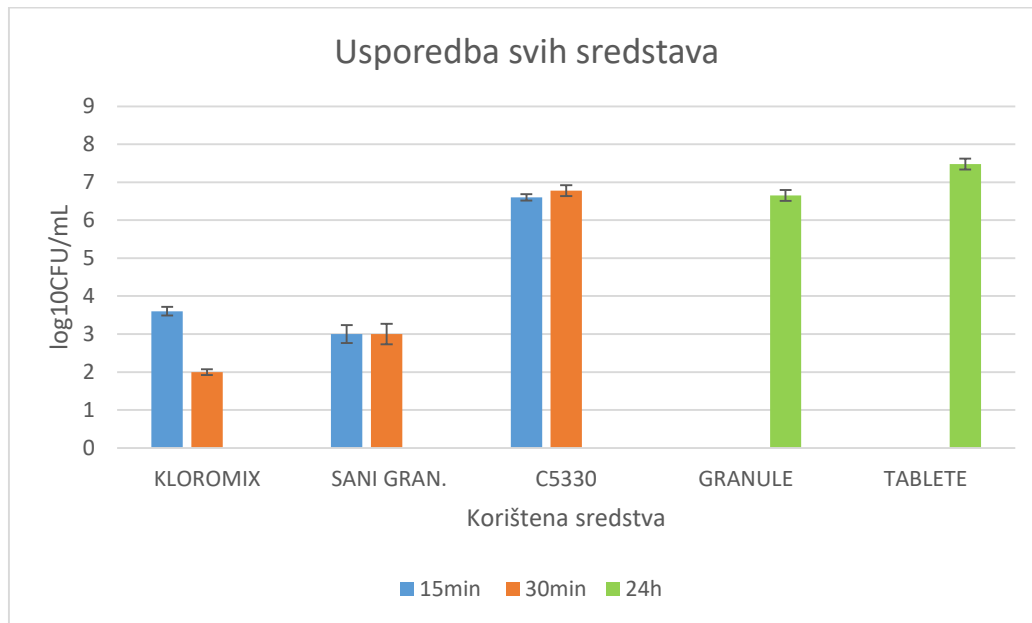
Oba grafička prikaza pokazuju slične rezultate. Kloromix ima najbolje djelovanje i usporio je rast bakterija u odnosu na druga dva sredstva kod kojih je porast bakterija ujednačen s kontrolom. Graf 7. pokazuje veći porast u odnosu na Graf 8. gdje je pokazan ponovni porast nakon 30 minuta djelovanja sredstava. U oba slučaja su vrijednosti velike i pokazuju da se biofilm od *L. pneumophila* lako oporavlja nakon djelovanja klornih preparata.



Graf 9. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon ponovnog porasta od 72 sata s trajanjem tretiranja od 24 sata. Korištena su dva različita sredstva i prikazan je kontrolni porast. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Vrijednosti na grafu 9. pokazuju izraziti porast broja bakterija u odnosu na prijašnje tretmane sa ova dva sredstva. Sličnih su vrijednosti sa sredstvima za čišćenje i dezinfekciju koja su korištena u značajno višim koncentracijama.

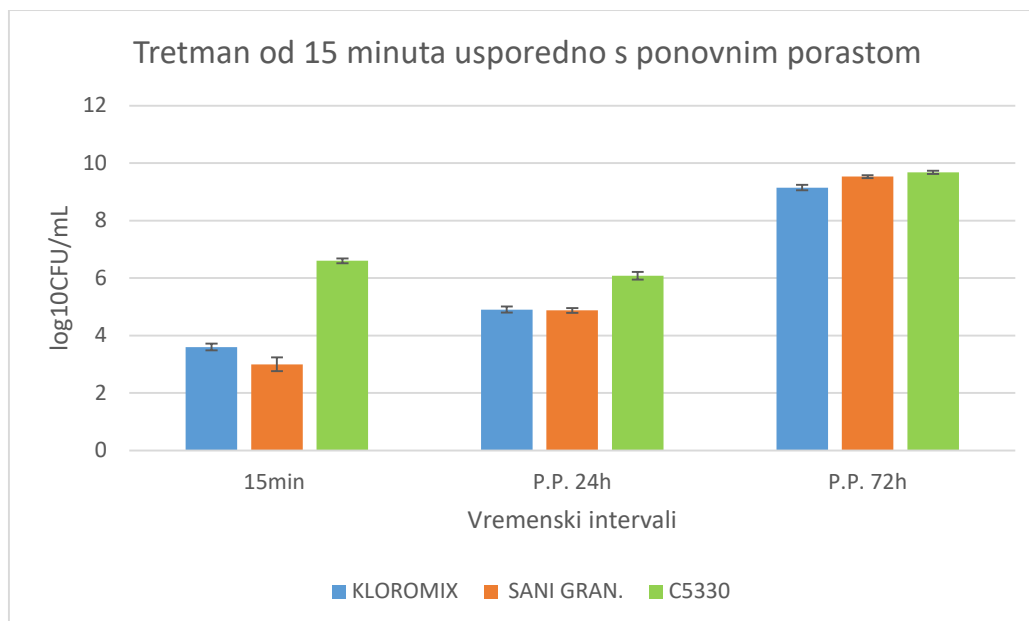
4.5 Usporedba vrijednosti svih pet korištenih sredstava



Graf 10. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tretiranja od 15 minuta, 30minuta i 24 sata. Korišteno je svih pet sredstava. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

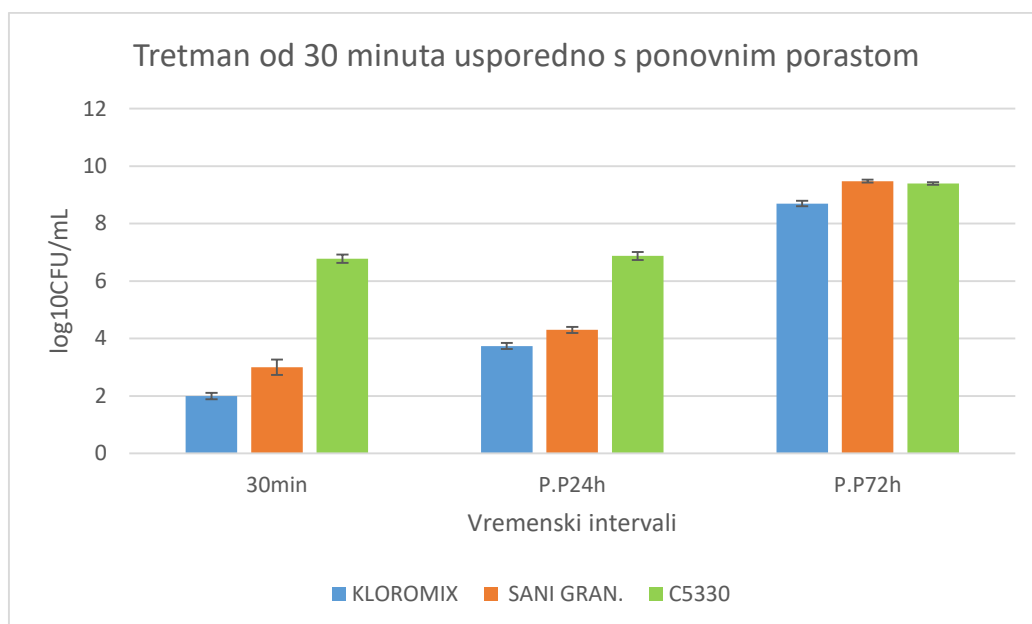
Ovaj grafički prikaz nam pokazuje odnose između djelotvornosti svih sredstava koji su korišteni tokom ovog istraživanja. Sredstvo kloromix pokazuje bolju djelotvornost ako se bakterijski biofilm tretira 30 minuta. Sani-granulat pokazuje iste vrijednosti porasta bakterija u oba vremenska intervala. Njegovo korištenje duže od 15 minuta ne pridonosi dodatnom uništavanju biofilma. Sredstvo za čišćenje i dezinfekciju, C5330, ima izrazito slabu djelotvornost u odnosu na druga dva sredstva iz ove skupine. Vidljivo je da ima jednaku djelotvornost kao i sredstva za kloriranje bazenske vode koja se koriste u izrazito manjim količinama.

4.6 Usporedba bakterijskog porasta prema vremenskim intervalima tretiranja



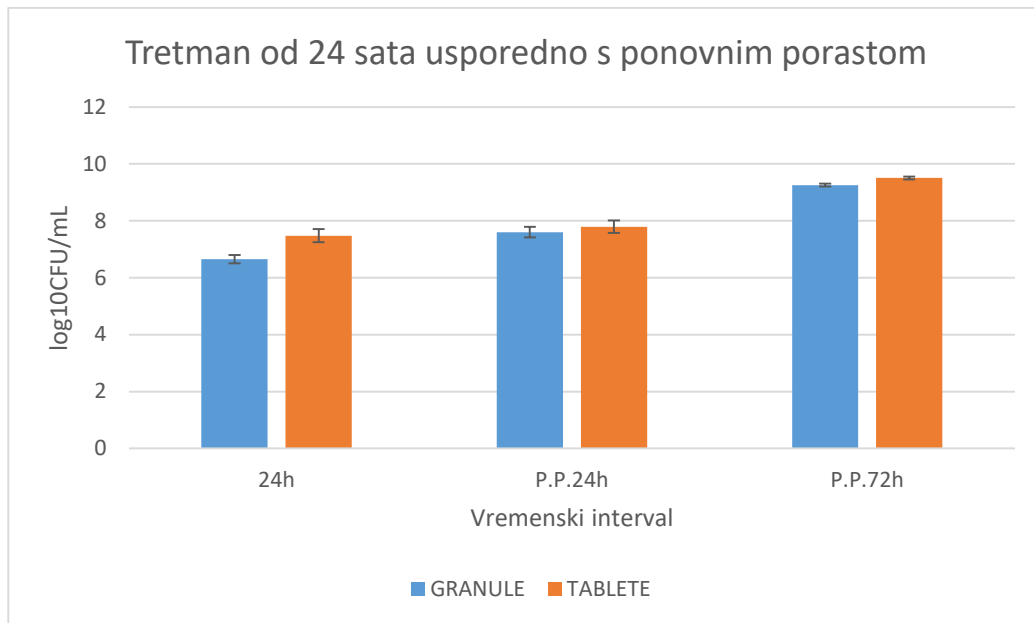
Graf 11. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon početnog tretiranja od 15 minuta i naknadnog ponovnog porasta od 24 i 72 sata. Korištena su tri sredstva. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Vrijednosti iz grafa 11. nam ukazuju na porast broja bakterija kako je duljina ponovnog porasta veća. Osnovni tretman od 15 minuta pokazuje niže vrijednosti u odnosu na ponovni porast u trajanju od 24 i 72 sata, s iznimkom za sredstvo C5330 koje ima slične učinke u slučaju tretmana od 15 minuta i naknadnog ponovnog porasta od 24 sata. Ponovni porast od 72 sata ima iznimno visoke brojeke bakterija u odnosu na ponovni porast od 24 sata, što je lako vidljivo očitavanjem iz grafa.



Graf 12. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon početnog tretiranja od 30 minuta i naknadnog ponovnog porasta od 24 i 72 sata. Korištena su tri sredstva. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Ovaj graf slikovito pokazuje razlike u broju bakterija nakon tretiranja klornim preparatima u trajanju od 30 minuta i naknadnog ponovnog porasta od 24 i 72 sata. Kod sredstava Kloromix i Sani-granulat vidljiv je graduirani porast u vrijednostima kako vrijeme ponovnog porasta raste. Kod sredstva C5330 vidljive su poprilično iste vrijednosti kod tretiranja od 30 minuta i ponovnog porasta u trajanju od 24 sata. Broj bakterija za ovo sredstvo raste nakon 72 sata.



Graf 13. Prikaz broja preživjelih bakterija nakon početnog tretiranja od 24 sata i naknadnog ponovnog porasta od 24 i 72 sata. Korištena su dva sredstva. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti \pm standardna devijacija.

Grafički prikaz tretiranja biofilma *Legionella pneumophila* s klor granulama i klor tabletama pokazuje također postepen porast broja očitanih bakterija na hranjivim podlogama. Vrijednosti nakon 24 sata tretiranja su najniže. Vrijeme od 24 sata ponovnog porasta nakon tretmana ukazuje na povišenje razine broja bakterija. Najveće očitavanje imaju bakterije koje su ostavljene na 72 sata ponovnog porasta nakon tretmana. Vidljiv je bolji učinak klor granula od klor tableta.

4.7 Trihalometani

Tablica 1. Prikaz trihalometana u korištenim klornim preparatima

| UZORAK | Trajanje tretiranja | Koncentracija | THM-Koncentracija u µg/L | | | | UKUPNO |
|---------------|---------------------|---------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------|-------------|
| | | | Kloroform | Bromdiklormetan | Dibromklormetan | Bromoform | |
| SANI-GRANULAT | 15 minuta | 0,2g/L | 35 | 7,9 | 5,7 | 1,8 | 50 |
| | 2h | 0,2g/L | 97 | 11 | 6,8 | 1,2 | 116 |
| BIS C5330 | 15 minuta | 15g/L | 728 | 4,3 | <0,75 | <0,75 | 732 |
| | 2h | 15g/L | 881 | 10 | 0,88 | <0,75 | 892 |
| KLOROMIX | 15 minuta | 20% | 1256 | 2,0 | 1,4 | 3,6 | 1263 |
| | 2h | 20% | 1405 | 2,2 | 0,9 | 2,2 | 1410 |
| KLOR TABLETE | 1h | 1,9mg/L | 46 | 3,4 | 1,1 | 1,8 | 52 |
| | 2h | 1,9mg/L | 41 | 4,1 | <0,75 | 2 | 47 |
| | 24h | 1,9mg/L | 29 | 3,6 | <0,75 | 3,8 | 36 |
| KLOR GRANULE | 1h | 15mg/L | 70 | 3,6 | <0,75 | 5,2 | 79 |
| | 2h | 15mg/L | 69 | 2,9 | <0,75 | 4,2 | 76 |
| | 24h | 15mg/L | 66 | 2 | <0,75 | 3,2 | 71 |

Tablica prikazuje izmjerene vrijednosti trihalometana u korištenim sredstvima za tretiranje biofilma *L. pneumophila*. Zakonski propisana vrijednost ukupnih trihalometana u bazenskoj vodi ne smiju prelaziti brojku od 100 µg/l. (NN 59/2020) Sva sredstva za čišćenje prelaze dopuštenu vrijednost trihalometna osim tretmana sredstva Sani-granulat u trajanju od 15 minuta. Sredstvo BIS C5330 i Kloromix imaju ekstremno visoke vrijednosti. Iako su visoke, ovakve vrijednosti su s očekivanjima jer se ova sredstva koriste u malim volumenima u razlici s bazenskom vodom. Sredstva za redovnu dezinfekciju bazenske vode nisu prešla zakonski propisane vrijednosti. Klor granule ipak imaju malo više vrijednosti od tableta. To je rezultat više koncentracije klor granula koje su u ovom radu pripremljene za naglo podizanje razine klora u vodi.

4.8 Udio slobodnog klora

Tablica 2. Prikaz izmjerenog slobodnog klora

| Udio slobodnog klora u ppm (mg/l) | | | | |
|-----------------------------------|-------|-----|-----|-----|
| PREPARATI | 15min | 1h | 2h | 24h |
| Kloromix | 10+ | 10+ | 10+ | 10+ |
| Sani-granulat | 10+ | 10+ | 10+ | 10+ |
| BIS C5330 | 10+ | 10+ | 10+ | 10+ |
| Granule | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Tablete | 1,5 | 1,5 | 1 | 1 |

Vrijednosti iz tablice 3. daju podatke od slobodnom kloru koji je očitao u klornim preparatima nakon njihovog tretiranja biofilma na plastičnoj podlozi. Korištena su različita vremenska razdoblja tretmana. Sredstva za čišćenje (Kloromix, Sani-granulat, BIS C5330) imaju izrazito visoke vrijednosti jer su samo za čišćenje, ne dezinfekciju vode. Klor granule pokazuju vrijednost od 2 mg/l nakon djelovanja od 24 sata. Granule su ciljano pripremljene za naglo podizanje razine klora, tzv. šok kloriranje. Klor tablete su došle na zakonski propisanu razinu od 1 mg/l već nakon 2 sata od početka tretiranja.

5 Rasprava

Bakterije roda *Legionella* su prirodno prisutne u vodi. U okolišu ih nalazimo većinom u malim koncentracijama, kao posljedica njihovih posebnih nutritivnih potreba. Uz sve to je izrazito otporna na vanjske uvjete. Otporne su na niske pH vrijednosti i na temperature koje mogu preći i 60 °C. U vodovodnom sustavu, u kojem se nalaze unutar cijevi, mogu s lakoćom preživjeti godinama. Tako da u bazensku vodu uglavnom dolaze iz vodovodnog sustava i tako predstavljaju opasnost od zaraznih bolesti. Bazenska voda može lako predstavljati izvor infekcija ako se u njemu pojavi legionela. Dolazi do infekcija dišnih sustava što dovodi do blažih oblika respiratornih smetnji i naknadno moguće pneumonije. Do zaraze može doći samo u uvjetima stvaranja, bakterija punog, aerosola. Aerosol se stvara kod grijanih bazena, u saunama, ili bazenima sa hidromasažnom funkcijom. Izvješćem WHO-a iz 2006. godine se tvrdi da nije zabilježen slučaj infekcije legionelom povezane s bazenskom vodom (42).

Glavna svrha ovog istraživanja se bila ustanoviti djelovanje klornih preparata direktno na biofilm. Gledao se utjecaj samih sredstava bez ikakvog mehaničkog djelovanja, upravo kako bi se pokazala djelotvornost na stvoreni biofilm *Legionella pneumophila*. Korištena klorna sredstva obuhvaćena u ovom istraživanju su dostupna u komercijalnoj uporabi i kao takva su i korištena. Koncentracije svih pet sredstava su pripremljene prema uputi od samih proizvođača, jer se tako i koriste u javnoj uporabi. Ciljano su uzete dvije različite skupine preparata. Jedna su sredstva za čišćenje koja se koriste u malim količinama ali izrazito visokim koncentracijama. Druga skupina su dva različita oblika klornih preparata koji se koriste u komercijalnoj dezinfekciji i održavanju bazenskih voda. Klor granule koje se uglavnom koriste za početno kloriranje ili kloriranje u slučaju prekomjernog razvoja mikroorganizama. Dok se klor tablete koriste za redovno održavanje razine klora u bazenu.

Prilikom nasađivanja bakterija na podlogu je bilo bitno odrediti dovoljan broj razrjeđenja, kako bi očitavanje moglo biti izvedivo. Zbog slabijeg učinka nekih sredstava na biofilm, rađena su razrjeđenja i do šest puta. *L. pneumophila* raste u pravilnom okruglom obliku, sivo-bijele boje su i kremaste strukture. Lako su vidljive na BCYE agru jer je on sam crne boje, zbog korištenog ugljena u njegovoj pripremi.

Samim promatranjem direktnog učinka klornih sredstava na biofilm ne bi došli do potpunih informacija o ponašanju bakterija. Ciljano je rađen ponovni porast nakon tretmana na biofilmu starom 5 dana. Sredstva bi se uklonila sa plastičnih podloga i zatim bi se inaktivirao preostali klor sa natrij tiosulfatom. Biofilm bi se zatim pokrio sterilnom vodovodnom vodom u trajanju

od jednog i tri dana. Podatci dobiveni očitanjem tih porasta nam daju uvid u brzo obnavljanje razmnožavanje legionele koja je preživjela tretman. U svega 72 sata, broj bakterija od ponovnog porasta je bio istovjetan broju bakterija iz kontrolnog nasađivanja. Ovo je u skladu sa istraživanjima koja govore da broj bakterija u biofilmu ovisi o vrsti primijenjenog tretmana (43, 44). Pokazalo se da djelovanje klora od jedne minute na biofilm smanjuje broj bakterija za 25,4% u usporedbi s kontrolnim porastom (43). Kombinacija UV zračenja i klora se istaknula kao najučinkovitija (43, 44). Iako nije u potpunost iskorijenjen biofilm, djelovanje hiperkloriranja od 120 min i UV zračenja od 20 sekundi najviše je smanjilo biofilm (44).

Paralelno s porastom bakterija su određivani trihalometani na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. Određivane su akreditiranom metodom plinske kromatografije. Dobiven je uvid u podatke koji se mogu usporediti sa zakonskom regulativom koja propisuje maksimalnu vrijednost ukupnih trihalometana od 100 µg/l. Iako su većina sredstava značajno prešla tu vrijednost, dva sredstva za redovno kloriranje nisu. Što je bilo i očekivano s obzirom na njihovu namjenu. Uz to su mjerene i razine slobodnog klora u sredstvima nakon njihovog djelovanja na bakterijski biofilm. Korištene su test trakice dostupne javnosti u redovnoj prodaji. Promjenom svoje boje ukazuju na različite razine preostalog klora. Dobiven je uvid u razinu slobodnog klora koji je također zakonski propisan. Sredstva za kloriranje bazenske vode su imale očekivane vrijednosti, dok su vrijednosti sredstava za čišćenje izrazito visoka. Postigla su maksimum skale koja ide do deset.

6 Zaključci

- Biofilm *Legionella pneumophila* je izrazito otporan na djelovanje standardnih sredstava u komercijalnoj uporabi za dezinfekciju bazenske vode i čišćenje bazena.
- Sredstva za čišćenje su efikasnija od sredstava za dezinfekciju bazenske vode. Sredstva Kloromix i Sani-granulat su pokazala najbolji učinak na inhibiciju bakterijskog porasta u biofilmu.
- Stvaranje THM je bilo najizraženije nakon korištenja sredstva Kloromix. Sva tri sredstva za čišćenje prelaze zakonski propisanu vrijednost. Dok su oba sredstva za dezinfekciju bazenske vode
- Samo dezinfekcija klorom nije dovoljna u kontroli biofilma *L. pneumophila*

7 Literatura

1. Cianciotto N. (2001). Pathogenicity of. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(5), 331–343. doi:10.1078/1438-4221-00139
2. Steinert M, Hentschel U, Hacker J., *Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray*, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 26, Issue 2, June 2002, Pages 149–162, doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00607.x
3. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation*. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jul;15(3):506-26. doi: 10.1128/CMR.15.3.506-526.2002
4. Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D., & Guyard, C. (2013). Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 21660–21675. doi:10.3390/ijms141121660
5. Venkatesan, N., Perumal, G. and Doble, M. (2015) ‘Bacterial Resistance in Biofilm-Associated Bacteria’, *Future Microbiology*, 10(11), pp. 1743–1750. doi: 10.2217/fmb.15.69.
6. Fliermans CB. 1996. Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with little wisdom. *Microb Ecol* 32:203–228.
7. Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* 1998;13:90e9
8. Rowbotham TJ. *Legionella-like amoebal pathogens*. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AM, editors. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington, D.C.:American Society for Microbiology; 1993. p. 137e40.
9. National Research Council. 2006. *Drinking water distribution systems: assessing and reducing risks*. The National Academy Press, Washington, DC.
10. Wang H, Edwards MA, Falkinham JO, III, Pruden A. 2013. Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems? A review. *Environ Sci Technol* 47:10117–10128.
11. Berry D, Xi C, Raskin L. 2006. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Biotechnol* 17:297–302.
12. Diederer, B. M. W. (2008). *Legionella spp. and Legionnaires' disease*. *Journal of Infection*, 56(1), 1–12. doi:10.1016/j.jinf.2007.09.010
13. James T Walker, Paul J McDermott, *Confirming the Presence of Legionella pneumophila in Your Water System: A Review of Current Legionella Testing*

Methods, Journal of AOAC INTERNATIONAL, Volume 104, Issue 4, July-August 2021, Pages 1135–1147, doi.org/10.1093/jaoacint/qsab003

14. Chauhan, D. and Shames, S. R. (2021) 'Pathogenicity and Virulence of Legionella: Intracellular replication and host response', *Virulence*, 12(1), pp. 1122–1144. doi: 10.1080/21505594.2021.1903199.
15. Hochstrasser R, Hilbi H. Intra-Species and Inter-Kingdom Signaling of Legionella pneumophila. *Front Microbiol.* 2017 Feb 3;8:79. doi: 10.3389/fmicb.2017.00079.
16. Chahin A, Opal SM. Severe Pneumonia Caused by Legionella pneumophila: Differential Diagnosis and Therapeutic Considerations. *Infect Dis Clin North Am.* 2017 Mar;31(1):111-121. doi: 10.1016/j.idc.2016.10.009.
17. Kowalczyk B, Chmiel E, Palusinska-Szys M. The Role of Lipids in Legionella-Host Interaction. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 2;22(3):1487. doi: 10.3390/ijms22031487.
18. Eisenreich W, Heuner K. The life stage-specific pathometabolism of Legionella pneumophila. *FEBS Lett.* 2016 Nov;590(21):3868-3886. doi: 10.1002/1873-3468.12326.
19. Pashaei-Asl, R., Khodadadi, K., Pashaei-Asl, F., Haqshenas, G., Ahmadian, N., Pashaiasl, M., & Hajihosseini Baghdadabadi, R. (2017). Legionella Pneumophila and Dendrimers-Mediated Antisense Therapy. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(2), 179–187. doi:10.15171/apb.2017.022
20. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
21. Di Martino P. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiol.* 2018 Mar 30;4(2):274-288. doi: 10.3934/microbiol.2018.2.274.
22. Rina Rani Ray, Nag M, Lahiri D. *Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls.* Springer Nature; 2021.
23. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol.* 2020;28(8):668–681.
24. Nag M, Lahiri D. *Analytical Methodologies for Biofilm Research.* Springer; 2021.
25. Chaminda Jayampath Seneviratne. *Microbial Biofilms.* CRC Press; 2017.

26. Peng, Q.; Tang, X.; Dong, W.; Sun, N.; Yuan, W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics* 2023, 12, 12. doi.org/10.3390/antibiotics12010012
27. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* 2020;18(10):571–586.
28. Pravilnik o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 59/2020)
29. Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/2023).
30. Wingender J, Flemming HC. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health* 214:417–423
31. Dukan S, Touati D. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 178:6145–6150.
32. Virto R, Mañas P, Álvarez I, Condon S, Raso J. 2005. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Appl Environ Microbiol* 71:5022–5028.
33. Jacangelo JG, Olivieri VP, Kawata K. 1991. Investigating the mechanism of inactivation of *Escherichia coli* B by monochloramine. *J Am Water Works Assoc* 83:80–87.
34. Lee WH, Wahman DG, Bishop PL, Pressman JG. 2011. Free chlorine and monochloramine application to nitrifying biofilm: comparison of biofilm penetration, activity, and viability. *Environ Sci Technol* 45:1412–1419.
35. De Castro Medeiros, L., de Alencar, F. L. S., Navoni, J. A., de Araujo, A. L. C., & do Amaral, V. S. (2019). Toxicological aspects of trihalomethanes: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-018-3949-z
36. Sveučilište u Zagrebu, Kemija u grafičkoj tehnologiji, Kromatografija, dostupno na: http://chem.grf.unizg.hr/media/download_gallery/vje%C5%BEba%201..pdf (pristupljeno 16.09.2024.)
37. Cancho, B. (2000). Determination, synthesis and survey of iodinated trihalomethanes in water treatment processes. *Water Research*, 34(13), 3380–3390. doi:10.1016/s0043-1354(00)00079-8

38. Penton, Z. E. (2002). Chapter 10 Headspace gas chromatography. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 279–296. doi:10.1016/s0166-526x(02)80047-2
39. Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe (NN 125/2017).
40. Žvorc, D., Purić-Hranjec, M. P. H., Varga, A. V., & Pintarić, L. P. (2021). Instrumentizacija u analitici održivoga razvoja-Plinska kromatografija-masena spektrometrija GC-MS. *Zbornik radova Međimurskog veleučilišta u Čakovcu*, 12(1), 193-204.
41. Neogen, dostupno na: <https://www.neogen.com/categories/microbiology/bcye-agar-legionella-isolation-medium/> (pristupljeno 27.08.2024.)
42. World Health Organization "Guidelines for safe recreational water environments Volume 2: Swimming pools and similar environments". WHO. Geneva. Switzerland. 2006.
43. Sigler Zekanović M, Begić G, Medić A, Gobin I, Tomić Linšak D. Effects of a Combined Disinfection Method on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm in Freshwater Swimming Pool. *Environments*. 2022; 9(8):103. doi.org/10.3390/environments9080103
44. Zekanović MS, Begić G, Mežnarić S, Jelovica Badovinac I, Krištof R, Tomić Linšak D, Gobin I. Effect of UV Light and Sodium Hypochlorite on Formation and Destruction of *Pseudomonas fluorescens* Biofilm In Vitro. *Processes*. 2022; 10(10):1901. doi.org/10.3390/pr10101901

8 Životopis

Ime i prezime: Toni Ćustić

Datum rođenja: 11.09.1998.

Mjesto rođenja: Zadar, Hrvatska

Adresa: Vukovarska ulica 35 Murvica, Poličnik

E-mail: toni.custic1@gmail.com

Školovanje:

2022. – 2024. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Diplomski studij sanitarnog inženjerstva

2017. – 2022. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva

2013. – 2017. Medicinska škola Ante Kuzmanića, Zadar, Sanitarni tehničar

2005. – 2013. Osnovna škola Smiljevac, Zadar