

Univerza  
v Ljubljani  
Fakulteta  
za gradbeništvo  
in geodezijo



Jamova cesta 2  
1000 Ljubljana, Slovenija  
<http://www3.fgg.uni-lj.si/>

**DRUGG** – Digitalni repozitorij UL FGG  
<http://drugg.fgg.uni-lj.si/>

V zbirki je izvirna različica doktorske disertacije.

Prosimo, da se pri navajanju sklicujete na bibliografske podatke, kot je navedeno:

University  
of Ljubljana  
Faculty of  
*Civil and Geodetic  
Engineering*



Jamova cesta 2  
SI – 1000 Ljubljana, Slovenia  
<http://www3.fgg.uni-lj.si/en/>

**DRUGG** – The Digital Repository  
<http://drugg.fgg.uni-lj.si/>

This is an original PDF file of doctoral thesis.

When citing, please refer as follows:

Oder, M. 2015. Ugotavljanje intenzivnosti pritrjevanja bakterij vrste Legionella pneumophila na površine materialov za vodovodne napeljave: doktorska disertacija = Determination of the intensity of bacteria Legionella pneumophila attachment to the surface materials for plumbing: Dissertation thesis. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakultete za gradbeništvo in geodezijo (Mentor Godič Torkar, K, somentor Kompare, B.).

<http://drugg.fgg.uni-lj.si/5436/>

Datum arhiviranja / Archiving date: 25-01-2016

Univerza  
v Ljubljani

Fakulteta za  
*gradbeništvo in  
geodezijo*



INTERDISCIPLINARNI  
DOKTORSKI ŠTUDIJSKI  
PROGRAM VARSTVO OKOLJA

Kandidatka:

**MARTINA ODER**

**UGOTAVLJANJE INTENZIVNOSTI PRITRJEVANJA  
BAKTERIJ VRSTE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* NA  
POVRŠINE MATERIALOV ZA VODOVODNE  
NAPELJAVE**

Doktorska disertacija štev.: 3/VO

**DETERMINATION OF THE INTENSITY OF  
BACTERIA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*  
ATTACHMENT TO THE SURFACE MATERIALS FOR  
PLUMBING**

Doctoral thesis No.: 3/VO

Komisija za doktorski študij je na 41. seji, dne 3. julija 2013, po pooblastilu s 30. seje Senata Univerze v Ljubljani, z dne 20. januarja 2009, dala soglasje k temi doktorske disertacije.

Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Karmen Godič Torkar, UL ZF,  
za somentorja pa prof. dr. Boris Kompare, UL FGG.

Ljubljana, 17. december 2015



Univerza  
v Ljubljani

*Fakulteta za  
gradbeništvo in  
geodezijo*



**Komisijo za oceno ustreznosti teme doktorske disertacije v sestavi:**

- doc. dr. Karmen Godič Torkar, UL ZF,
- prof. dr. Boris Kompare, UL FGG,
- izr. prof. dr. Ivan Eržen, UL MF,
- izr. prof. dr. Martin Dobeic, UL VF,

je imenoval Senat Fakultete za gradbeništvo in geodezijo na 38. redni seji, 20. februarja 2013.

**Poročevalce za oceno doktorske disertacije v sestavi:**

- doc. dr. Darko Drev, IZVRS in UL FGG,
- izr. prof. dr. Ivan Eržen, UL MF,
- izr. prof. dr. Martin Dobeic, UL VF,

je imenoval Senat Fakultete za gradbeništvo in geodezijo na 21. redni seji, 1. julija 2015.

**Komisijo za zagovor doktorske disertacije v sestavi:**

- prof. dr. Matjaž Mikoš, dekan UL FGG, predsednik,
- doc. dr. Karmen Godič Torkar, UL ZF, mentorica,
- doc. dr. Darko Drev, IZVRS in UL FGG,
- izr. prof. dr. Ivan Eržen, UL MF,
- izr. prof. dr. Martin Dobeic, UL VF,

je imenoval Senat Fakultete za gradbeništvo in geodezijo na 24. redni seji, 9. decembra 2015.



## **Stran za popravke**

**Stran z napako**

**Vrstica z napako**

**Namesto**

**Naj bo**

## **IZJAVE**

**Podpisana Martina Oder izjavljam, da sem avtorica doktorskega dela z naslovom:  
»Ugotavljanje intenzivnosti pritrjevanja bakterij vrste *Legionella pneumophila* na  
površine materialov za vodovodne napeljave«.**

**Izjavljam, da je elektronska različica v vsem enaka tiskani različici.**

**Izjavljam, da dovoljujem objavo elektronske različice v repozitoriju UL FGG.**

**Ljubljana,**

**Martina Oder**

---

## BIBLIOGRAFSKO – DOKUMENTACIJSKA STRAN IN IZVLEČEK

<b>UDK:</b>	<b>628.19:628.1.032(043)</b>
<b>Avtorica:</b>	<b>Martina Oder</b>
<b>Mentorica:</b>	<b>doc. dr. Karmen Godič Torkar</b>
<b>Somentor:</b>	<b>prof. dr. Boris Kompare</b>
<b>Naslov:</b>	<b>Ugotavljanje intenzivnosti pritrjevanja bakterij vrste <i>Legionella pneumophila</i> na površine materialov za vodovodne napeljave</b>
<b>Obseg in oprema:</b>	<b>162 str., 15 pregl., 24 sl., 2 en.</b>
<b>Ključne besede:</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i>, bakterijska adhezija, biofilmi</b>

### Izveček

V raziskavi smo želeli preučiti, kako na oprijem bakterijskih celic *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 vplivajo lastnosti različnih vrst materialov, kot so njihova hrapavost, hidrofobnost in naboj, vpliv različnih temperaturnih pogojev, strižnih sil in prisotnost razkužila dikloroizocianurne kisline ter mehčala natrijevega polifosfata. V prvem delu raziskave smo ugotavljali oprijem bakterijskih celic na steklene borosilikatne ploščice različnih hrapavosti, v drugem delu pa na površine materialov, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne napeljave v zgradbah. Ti materiali so imeli različno sestavo, hrapavost in mejni kot. Za ugotavljanje intenzivnosti oprijema bakterij na površine smo uporabili spektrofotometrično metodo merjenja optične gostote barvila kristal vijolično, ki se sprosti iz predhodno obarvanih bakterijskih celic, oprijetih na testno površino. V prvem delu študije smo ugotovili, da hrapavost materiala vpliva na oprijem bakterijskih celic, saj je bil oprijem na bolj hrapavih steklenih ploščicah večji. Pri študiju oprijema na materiale, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne inštalacije, pa so rezultati pokazali, da oprijem na površine ni bil odvisen samo od hrapavosti materiala, ampak tudi od ostalih lastnosti, saj oprijem na najmanj hrapavem materialu ni bil najmanjši. Testna bakterija se je najintenzivneje oprijela na pocinkane cevi, najmanj pa na cevi iz polipropilena. Na oprijem bakterije je vplivala tudi temperatura inkubacije, saj je bil največji pri temperaturi 36 °C, najmanjši pa pri temperaturi 15 °C. Temperatura inkubacije 15 °C je na bakterijske celice delovala bakteriostatično, temperatura 55 °C pa baktericidno.



## BIBLIOGRAPHIC – DOCUMENTALISTIC INFORMATION

**UDC:** 628.19:628.1.032(043)  
**Author:** Martina Oder  
**Supervisor:** doc. dr. Karmen Godič Torkar  
**Co-supervisor:** prof. dr. Boris Kompare  
**Title:** Determination of the intensity of bacteria *Legionella pneumophila* attachment to the surface materials for plumbing  
**Notes:** 162 p., 15 tab., 24 fig., 2 eq.  
**Key words:** *Legionella pneumophila*, bacterial adhesion, biofilms

### Abstract

In this study we wanted to examine how the adhesion of *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells is affected by the properties of various types of materials, such as roughness, hydrophobicity and charge, and how the bacteria are affected by different temperature conditions, shear forces and the presence of disinfectants dichloroisocyanuric acid and water softeners sodium polyphosphate. In the first part of the study we determined the adhesion of bacterial cells on borosilicate glass coupons of different roughness, while in the second part adhesion on the surface of materials that are most commonly used for plumbing and ventilation systems in buildings. The materials differed in composition, roughness and contact angle. The adhesion of the bacteria to different surfaces was determined by the spectrophotometric measurement of the optical density of crystal violet dye released from the stained bacterial cells adhering to the test surface. In the first part of the study, it was established that the roughness of the material affects the adhesion of bacterial cells, as adhesion was higher on rougher glass coupons. The results of the study of bacterial adhesion to materials most commonly used in plumbing showed that adhesion not only depended on the roughness of the material but also on its other properties, as adhesion was not the lowest on the smoothest material. The test bacteria adhered the most firmly to galvanised pipes and the least firmly to polypropylene pipes. Bacteria adhesion was also affected by the incubation temperature, because adhesion was the highest at a temperature of 36 ° C and the lowest at a temperature of 15 ° C. The results show that incubation temperature of 15 ° C is bacteriostatic and temperature of 55 ° C is bactericidal.

## ZAHVALA

Za pomoč in strokovne nasvete se zahvaljujem mentorici doc. dr. Karmen Godič Torkar ter somentorju prof. dr. Borisu Komparetu, ki sta mi pomagala in me usmerjala pri opravljanju raziskovalnega dela doktorske disertacije. V zaključnem delu nastajanja pisnega izdelka, je zaradi smrti prof. Kompareta vlogo obeh prevzela dr. Godič Torkarjeva, za kar se ji želim še posebej zahvaliti.

Hvala tudi doc. ddr. Klemnu Bohincu, ki me je že pred doktorskim študijem vključil v svojo raziskovalno ekipo pri projektu ARRS in mi s tem dal idejo tudi za moje raziskovanje. Z ekipo raziskovalcev smo v sklopu projekta preizkušali in modificirali metode, ki sem jih pozneje tudi sama uporabila pri izvajanju poskusov v sklopu doktorske disertacije. Omogočil mi je izvedbo meritev na Institutu Jožef Stefan in uporabo pretočne komore, ki je bila narejena s pomočjo skupine raziskovalcev v podjetju Iskra Pio d.o.o.

Zahvaljujem se ekipi dr. Dražiča z Instituta Jožef Stefan, ki so opravili vse meritve lastnosti materialov, katere sem uporabila pri svoji raziskavi.

Na koncu hvala vsem, ki ste verjeli vame in me pri mojem delu spodbujali.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>NAMEN IN HIPOTEZE.....</b>	<b>3</b>
2.1	Namen.....	3
2.2	Raziskovalne hipoteze .....	3
2.3	Struktura raziskave .....	4
2.4	Časovni potek raziskave in izvajalci .....	5
<b>3</b>	<b>PREGLED OBJAV .....</b>	<b>7</b>
3.1	Bakterije iz rodu <i>Legionella</i> .....	7
3.1.1	Nahajališča bakterije iz rodu <i>Legionella</i> .....	8
3.1.2	Virulentnost in obolenja, ki jih povzroča <i>Legionella</i> .....	10
3.1.3	Dejavniki tveganja za pojav obolenja.....	15
3.1.4	Kontrola in spremljanje okužb z bakterijami iz rodu <i>Legionella</i> v svetu in Sloveniji ...	17
3.1.5	Postopki priprave vode in preventivni ukrepi.....	19
3.1.6	Drugi postopki obdelave vode .....	23
3.2	Oprijem bakterij na površine in tvorba biofilma .....	23
3.2.1	Vpliv lastnosti materialov na oprijem bakterijskih celic na površine .....	24
3.2.2	Vpliv lastnosti bakterij na oprijem na površine.....	28
3.2.3	Vpliv okolja na oprijem bakterij na površine .....	29
3.3	Vpliv strižnih sil na tvorbo biofilma in odcepljanje bakterij s površin .....	31
3.4	Metode ugotavljanja oprijema bakterij .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>34</b>
4.1	Materiali.....	34
4.1.1	Gojišča in reagenti .....	34
4.1.2	Materiali za študij oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> .....	35
4.2	Značilnosti celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 ter vplivi fizikalnih in kemijskih dejavnikov na njeno preživetje in razmnoževanje .....	37

4.2.1	Vpliv temperature na rastno krivuljo .....	38
4.2.2	Vpliv razkužila dikloroizocianurne kisline in mehčala natrijevega polifosfata na rastno krivuljo .....	39
4.2.3	Vpliv dinamičnih pogojev na rastno krivuljo.....	40
4.2.4	Elektroforetska mobilnost in hidrofobnost celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	42
4.3	Meritve hrapavosti in hidrofobnosti materialov za študij oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	43
4.4	Ugotavljanje oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine .....	45
4.4.1	Ugotavljanje intenzitete oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine steklenih ploščic definiranih lastnosti .....	46
4.4.2	Ugotavljanje intenzitete oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine materialov za vodovodne sisteme .....	47
4.4.3	Ugotavljanje oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine kovinskih ploščic v dinamičnih pogojih in vpliva strižnih sil na njihovo odcepitev .....	47
4.5	Analiza rezultatov .....	49
<b>5</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>51</b>
5.1	Vpliv temperature na razmnoževanje bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	51
5.2	Vpliv razkužila dikloroizocianurne kisline na razmnoževanje bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	53
5.3	Vpliv mehčala natrijevega polifosfata na razmnoževanje bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	55
5.4	Vpliv strižnih sil na razmnoževanje bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	57
5.5	Rezultati meritev elektroforetske mobilnosti in hidrofobnosti bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 .....	59

5.6	Rezultati meritev hrapavosti površin za oprijem bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152.....	60
5.7	Rezultati meritev mejnega kota površin za oprijem bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152.....	61
5.8	Oprijem bakterijskih celic na površine.....	63
5.8.1	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 36 °C .....	63
5.8.2	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 15 °C .....	64
5.8.3	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 55 °C .....	66
5.8.4	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine cevi pri temperaturi 36 °C pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur).....	70
5.8.5	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine cevi pri temperaturi 15 °C pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur).....	72
5.8.6	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine cevi pri temperaturi 55 °C pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur).....	74
5.8.7	Primerjava rezultatov oprijema celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 pri treh temperaturah inkubacije na površine cevi v odvisnosti od hrapavosti materialov .....	76
5.8.8	Oprijem bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine cevi z dodanim razkužilom dikloroizocianurno kislino pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur) .....	78
5.8.9	Oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine cevi z dodanim mehčalom natrijevim polifosfatom pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur) .....	80
5.8.10	Vpliv laminarnega toka na oprijem celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 na površine kovinskih ploščic .....	82
5.8.11	Vpliv laminarnega in turbulentnega toka na odstranjevanje oprijetih celic bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 s površin kovinskih ploščic.....	84

<b>6</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČKI.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>101</b>
	<b>VIRI.....</b>	<b>103</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Virulentni dejavniki bakterij iz rodu <i>Legionella</i> .....	11
Preglednica 2: Bolezenski znaki pri pontiaški vročici in legionarski bolezni. ....	14
Preglednica 3: Priporočene temperature, časi segrevanja in izpiranja sistema v primeru pojava bakterije iz rodu <i>Legionella</i> . ....	21
Preglednica 4: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU rastnih krivulj bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 pri treh temperaturah inkubacije (36 °C, 15 °C in 55 °C). ....	53
Preglednica 5: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU rastnih krivulj bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 ob dodanem razkužilu dikloroizocianurni kislini .....	55
Preglednica 6: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU rastnih krivulj bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 z in brez dodanega mehčala vode natrijevega polifosfata.....	57
Preglednica 7: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU vpliva dinamičnih (laminarni tok) in stacionarnih pogojev na razmnoževanje bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152. ....	59
Preglednica 8: Rezultati meritev bakterijske adherence za ogljikovodike pri določanju stopnje hidrofobnosti bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152. ....	60
Preglednica 9: Rezultati meritev hrapavosti materialov (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev), izmerjene s profilometrom.....	61
Preglednica 10: Rezultati meritev mejnega kota kapljice vode na površini za določitev hidrofobnosti izbranih materialov (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev).....	62
Preglednica 11: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic pri treh različnih temperaturah inkubacije na steklenih ploščicah dveh različnih hrapavosti. ....	68
Preglednica 12: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) pri treh različnih temperaturah inkubacije sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic na steklenih ploščicah hrapavosti 5,8 µm. ....	69

Preglednica 13: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) pri treh različnih temperaturah inkubacije sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic na steklenih ploščicah hrapavosti 0,07 $\mu\text{m}$ .....	69
Preglednica 14: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih celic na površinah kovinskih ploščic, gojenih pri stacionarnih in dinamičnih pogojih, pri temperaturi inkubacije 36 °C. ....	84
Preglednica 15: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih celic na površinah kovinskih ploščic po izpostavljenosti turbulentnemu toku, laminarnemu toku in v mirujočem mediju. ....	86



## LIST OF TABLES

Table 1: Virulence factors of <i>Legionella</i> bacteria.....	11
Table 2: Symptoms of Pontiac fever and Legionnaires' disease.....	14
Table 3: Recommended temperatures, times of heating and flushing of the system in the event of the occurrence of <i>Legionella</i> bacteria.....	21
Table 4: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the growth curves <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 at three different incubation temperatures (36 ° C, 15° C and 55 °C).....	53
Table 5: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the growth curves <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 with the addition of disinfectant dichloroisocyanuric acids.....	55
Table 6: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the growth curves <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 with and without the addition of chemical agents for water softening, sodium polyphosphate.....	57
Table 7: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the impact of dynamic (laminar flow) and static conditions on the growth of <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152.....	59
Table 8: The results of the tests of bacterial adherence to hydrocarbons for <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152, to determine the degree of hydrophobicity.....	60
Table 9: The results of materials roughness measurements (PP-R: polypropylene tube, Pex-Al-Pex: multitalpex tube; PE: polyethylene tube, Cu: copper tube, Zn: galvanized tube), measured using profilometer.....	61
Table 10: The results of contact angles measurements of a water drop on the surface to determine the hydrophobicity of selected materials (PP-R: polypropylene tube, Pex-Al-Pex: multitalpex tube, PE: polyethylene tube, Cu: copper tube, Zn: galvanized tube).....	62
Table 11: Statistical analysis of average values and differences in measuring optical density (OD) of crystal violet dye at three different temperatures and two different surface roughnesses of glass coupons.....	68
Table 12: Statistical analysis of average values and differences in measuring optical density (OD) of crystal violet dye at different incubation temperatures on a glass coupon with a roughness of 5.8 µm.....	69

Table 13: Statistical analysis of average values and differences in measuring optical density (OD) of crystal violet dye at different incubation temperatures on glass coupons with a roughness of 0.07 $\mu\text{m}$ . .....	69
Table 14: Statistical analysis of average values and differences measuring optical density (OD) of dye released from cells adhering to metal coupons in static and dynamic conditions at an incubation temperature of 36 °C.....	84
Table 15: Statistical analysis of average values and differences measurements of the optical density of dye released from cells adhering to metal coupons exposed to turbulent and laminar flow and cells grown in a static medium. ....	86

## KAZALO SLIK

Slika 1: Mikroskopski prikaz bakterije <i>Legionella</i> , na kateri so vidni bički (Haney Carr; <a href="http://soundml.com/legionella/">http://soundml.com/legionella/</a> ). .....	7
Slika 2: Število prijavljenih primerov in število smrti zaradi legioneloz v Sloveniji od leta 2000 do leta 2012. ....	19
Slika 3: Sistem pretočne komore s, hladilno/ogrevalno enoto (a), s pretočno celico (c) in peristaltičnima črpalkama (b), za ugotavljanje vpliva laminarnega in turbulentnega toka na oprijem in odstranjevanje mikroorganizmov s površin materialov. ....	41
Slika 4: Topografija površine steklene ploščice, narejena s pomočjo mikroskopa na atomsko silo na Institutu Jožef Stefan (foto: Dražič, 2012). ....	44
Slika 5: Pretočna komora za ugotavljanje vpliva laminarnega in turbulentnega toka na oprijem in odstranjevanje mikroorganizmov s površin materialov. ....	48
Slika 6: Rastne krivulje bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152, po metodi štetja bakterijskih kolonij, pri treh različnih temperaturah inkubacije. ....	52
Slika 7: Rastni krivulji bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152, po metodi štetja bakterijskih kolonij, v gojišču z dodano dikloroizocianurno kislino s koncentracijo klora $17 \text{ mg L}^{-1}$ . Manjša slika znotraj Slike 7 prikazuje zmanjšanje števila bakterij v vzorcu z dodanim razkužilom po desetih minutah izpostavljenosti. ....	54
Slika 8: Rastni krivulji bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152, po metodi štetja bakterijskih kolonij, v gojišču z in brez dodanega natrijevega polifosfata za mehčanje vode v koncentraciji $5 \text{ mg L}^{-1}$ . ....	56
Slika 9: Rastni krivulji bakterije <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 po metodi štetja bakterijskih kolonij v stacionarnih in dinamičnih pogojih (laminarni tok). ....	58
Slika 10: Oprijem bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na steklene ploščice dveh hrapavosti (hrapave $5,8 \text{ }\mu\text{m}$ in gladke $0,07 \text{ }\mu\text{m}$ ) pri temperaturi inkubacije $36 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	64
Slika 11: Oprijem bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na steklene ploščice dveh hrapavosti (hrapave $5,8 \text{ }\mu\text{m}$ in gladke $0,07 \text{ }\mu\text{m}$ ), pri temperaturi inkubacije $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	65

- Slika 12: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na steklene ploščice dveh hrapavosti (hrapave 5,8  $\mu\text{m}$  in gladke 0,07  $\mu\text{m}$ ) pri temperaturi inkubacije 55 °C.....67
- Slika 13: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multitalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) pri temperaturi inkubacije 36 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike..... 71
- Slika 14: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multitalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) pri temperaturi inkubacije 15 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike..... 73
- Slika 15: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multitalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) pri temperaturi inkubacije 55 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike..... 75
- Slika 16: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multitalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) v odvisnosti od hrapavosti materialov pri temperaturi inkubacije 36 °C. .... 77
- Slika 17: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multitalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) z dodano dikloroizocianurno kislino v koncentraciji klora 17 mg L<sup>-1</sup> pri temperaturi inkubacije 36 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90. in 10. percentilo. Osamelci so prikazani kot pike..... 79

Slika 18: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multialpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) z dodanim sredstvom za mehčanje vode natrijevim polifosfatom pri temperaturi inkubacije 36 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90. in 10. percentilo. V osamelci so prikazani kot pike. ....	81
Slika 19: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na kovinske ploščice pri stacionarnih in dinamičnih pogojih pri temperaturi inkubacije 36 °C.....	83
Slika 20: Vpliv turbulentnega in laminarnega toka na odstranjevanje oprijetih bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) s površin kovinskih ploščic po 72 urah inkubacije pri temperaturi 36 °C.....	85
Slika 21: Kovinske ploščice iz nerjavnega jekla v velikosti 20 x 20 mm z oprijetimi bakterijskimi celicami, obarvanimi z barvilom kristal vijolično. ....	87

## LIST OF FIGURES

Fig. 1: Microscopic view of <i>Legionella</i> bacteria, with visible flagella (Haney Carr; <a href="http://soundml.com/legionella/">http://soundml.com/legionella/</a> ).....	7
Fig. 2: The number of reported cases of legionellosis and the number of deaths in Slovenia from 2000 to 2012. ....	19
Fig. 3: The system of liquid flow chamber with a cooling / heating unit (a), a polyethylene tray (c) and a peristaltic pump (b) to determine the impact of laminar and turbulent flow to the attachment and removal of microorganisms from surfaces of materials.....	41
Fig. 4: Topography of the surface of the glass tiles made by atomic force microscope on Institute Jožef Stefan (foto: Dražič, 2012). ....	44
Fig. 5: The liquid flow chamber for monitoring the impact of laminar and turbulent flow on the adhesion and detaching of microorganisms from materials surfaces.....	48
Fig. 6: <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 growth curve, according to the count method of bacterial colonies at three different incubation temperatures.....	52
Fig. 7: <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 growth curves, according to the count method of bacterial colonies with the addition of dichloroisocyanuric acid at a chlorine concentration of 17 mg L <sup>-1</sup> . A small picture within the Figure 7 shows the reduction in the number of bacteria in the sample after ten minutes exposure to the disinfectant.....	54
Fig. 8: <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 growth curve, according to the count method of bacterial colonies with and without the addition of sodium polyphosphate for softening water in a concentration of 5 mg L <sup>-1</sup> . ....	56
Fig. 9: <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 growth curves, determined on the basis of the method of colonies counting the number in static and dynamic conditions (laminar flow).....	58
Fig. 10: The adhesion of <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) to glass plates of two different surface roughnesses (rough plates 5.8 µm and untreated plates 0.07 µm) at the incubation temperature of 36 °C.....	64
Fig. 11: The adhesion of <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) to glass plates of two different surface roughnesses (rough plates 5.8 µm and untreated plates 0.07 µm) at the incubation temperature of 15 °C.....	65

Fig. 12: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) to glass coupons of two different surface roughnesses (rough coupons 5.8  $\mu\text{m}$  and untreated coupons 0.07  $\mu\text{m}$ ) at the incubation temperature of 55  $^{\circ}\text{C}$ . ..... 67

Fig. 13: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) at the incubation temperature of 36  $^{\circ}\text{C}$ . The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots..... 71

Fig. 14: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) at the incubation temperature of 15  $^{\circ}\text{C}$ . The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots..... 73

Fig. 15: The adhesion *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) at the incubation temperature of 55  $^{\circ}\text{C}$ . The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots..... 75

Fig. 16: The average values of the adhesion *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube, Pex-Al-Pex: multidalpex tube, PE: polyethylene tube, Cu: copper tube, Zn: galvanized tube) depending on the roughness of the material at the incubation temperature of 55  $^{\circ}\text{C}$ . ..... 77

Fig. 17: The adhesion of *pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) with the addition of

dichloroisocyanuric acid at a chlorine concentration of  $17 \text{ mg L}^{-1}$  at an incubation temperature of  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ . The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots. .... 79

Fig. 18: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multitalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) with the addition of sodium polyphosphate for softening water. The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots..... 81

Fig. 19: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) on metal coupons in static and dynamic conditions at an incubation temperature of  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ..... 83

Fig. 20: Impact of turbulent and laminar flow on disposal of adhered *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) from the surfaces of metal coupons, after 72 hours of incubation at temperature of  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ..... 85

Fig. 21: Metal stainless steel coupons, size  $20 \times 20 \text{ mm}$ , with tight bacterial cells with crystal violet dye. .... 87



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>ACHD</b>	<i>angl.</i> Allegheny County Health Department; <i>slo.</i> Oddelek za zdravje države Alegeni.
<b>ASHRAE</b>	<i>angl.</i> American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers; <i>slo.</i> Ameriško združenje za ogrevanje, hlajenje in prezračevanje;
<b>AWWA</b>	<i>angl.</i> American Water Works Association; <i>slo.</i> Ameriško združenje za pripravo vode;
<b>BCYE</b>	<i>angl.</i> Buffered Charcoal Yeast Extract Medium; <i>slo.</i> gojišče z ogljem in kvasnim ekstraktom;
<b>YEB</b>	<i>angl.</i> Yeast Extract Broth; <i>slo.</i> bujion s kvasnim ekstraktom;
<b>CDC</b>	<i>angl.</i> Centers for Disease Control and Prevention; <i>slo.</i> Center za nadzor in preprečevanje bolezni;
<b>CFU</b>	<i>angl.</i> Colony Forming Units; <i>slo.</i> število kolonijjskih enot;
<b>CPSC</b>	<i>angl.</i> Consumer Product Safety Commission; <i>slo.</i> Komisija za varstvo potrošnikov;
<b>Cu</b>	bakrena cev;
<b>DLVO</b>	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek teorija;
<b>ECDC</b>	<i>angl.</i> European Centre for Disease Prevention and Control; <i>slo.</i> Evropski center za preprečevanje in nadzor bolezni;
<b>ELDSNet</b>	<i>angl.</i> European Legionnaires' disease Surveillance network; <i>slo.</i> Evropska mreža za nadzor nad legionelozami;
<b>EPA</b>	<i>angl.</i> Environmental Protection Agency; <i>slo.</i> Agencija za varstvo okolja;
<b>EWGLI</b>	<i>angl.</i> European Working Group for <i>Legionella</i> Infections; <i>slo.</i> Evropska delovna skupina za nadzor nad legionelozami;
<b>IJS</b>	Institut Jožef Stefan;
<b>IVZ</b>	Inštitut za varovanje zdravja;
<b>KV</b>	barvilo kristal vijolično;
<b>LPS</b>	lipopolisaharidi;
<b><i>L. pneumophila</i></b>	<i>Legionella pneumophila</i>

<b>MMWR</b>	Morbidity and Mortality Weekly Report; <i>slo.</i> Tedensko poročilo o obolevanju in umrljivosti;
<b>NIJZ</b>	Nacionalni inštitut za javno zdravje;
<b>OD</b>	<i>angl.</i> Optical Density; <i>slo.</i> optična gostota;
<b>OSHA</b>	<i>angl.</i> Occupational Safety and Health Administration; <i>slo.</i> Uprava za varnost in zdravje pri delu;
<b>PBS</b>	fosfatni pufer;
<b>PE</b>	polietilenska cev;
<b>Pex-Al-Pex</b>	material sestavljen iz dveh plasti polietilena, med katerima je plast aluminijevega traku;
<b>PP-R</b>	polipropilenska cev;
<b>SCBPS</b>	<i>angl.</i> Standing Committee on Building and Plumbing Services; <i>slo.</i> Komisija za gradbeništvo in vodovodne napeljave;
<b>SSKJ</b>	Slovar slovenskega knjižnega jezika;
<b>SWISS NOSO</b>	Švicarski sistem zdravstvenega varstva za zmanjševanje bolnišničnih okužb;
<b>TKI</b>	tovarna kemičnih izdelkov;
<b>WHO</b>	<i>angl.</i> World Health Organization; <i>slo.</i> Svetovna zdravstvena organizacija;
<b>ZF</b>	Zdravstvena fakulteta;
<b>Zn</b>	pocinkana litoželezna cev;
<b>ZZV</b>	Zavod za zdravstveno varstvo;

## SLOVAR MANJ ZNANIH BESED IN TUJK

adherentnost	Pritrjenost, zlepljenost (Mikrobiološki slovar); sposobnost za adhezijo; sprijet, zlepljen, zraščan (SSKJ).
adhezija	Privlačna sila med površinami dveh teles v stiku zaradi medmolekulske sile (Slovenski medicinski slovar); sila, ki privlači molekule različnih snovi (SSKJ).
antigen	Vsaka snov, ki povzroči imunski odziv (Slovenski medicinski slovar); snov, ki povzroča v organizmu nastajanje protiteles (SSKJ).
biček	Nitasti izrastek na celici, ki ji omogoča gibanje (SSKJ).
biofilm	Združba mikroorganizmov, ki so pritrjeni na površino.
ekstrahirati	Izvlечи iz (Tehniški metalurški slovar); izlužiti oz. izločiti snov iz trdnih ali tekočih zmesi s topilom tako, da se pri tem kemično ne spremeni (SSKJ).
flageli	Glej »biček«.
hidrofilnost	Lastnost kake skupine v molekuli, molekule ali snovi, da se veže z vodo ali jo privlači (Slovenski medicinski slovar); ki se veže z vodo (SSKJ).
hidrofobnost	Lastnost kake skupine v molekuli, molekule ali snovi, da se težko veže z vodo ali jo odbija (Slovenski medicinski slovar); ki se ne veže z vodo (SSKJ).
incidenčna stopnja	Število novih dogodkov, predvsem novih primerov bolezni v določenem časovnem intervalu oziroma obdobju (Slovenski medicinski slovar).
inkubacijska doba	Čas od okužbe, do izbruha bolezni.
inokulum	Vcepek (Mikrobiološki slovar).
intracelularen	Se nahaja oz. živi v celici, medceličen (Mikrobiološki slovar).
klorni šok	Je oblika razkuževanja vode, pri čemer se uporablja precej višje koncentracije klorovega sredstva kot v normalnih pogojih (NIJZ).
laminarni tok	Gibanje, pri katerem se posamezne plasti tekočine ali plina gibljejo druga ob drugi, ne da bi se med seboj mešale (SSKJ).
mikroaerofilni	Za življenje potrebuje prosti kisik (5-10 % kisika) (Mikrobiološki slovar).

monitoring	Je oblika nadzora oziroma preverjanja izpolnjevanja zakonodajnih zahtev (NIJZ).
sporulacija	Proces nastajanja spor neaktivnih oblik nekaterih bakterij, ki jih varujejo pred neugodnimi življenjskimi pogoji (Mikrobiološki slovar).
strižna sila	Je vzporedna z dano ploskvijo, npr. prelomno ploskvijo, na katero deluje; zmnožek strižne napetosti in pripadajoče površine prelomne ploskve (Inženirsko seizmološki terminološki slovar).
supernatant	Tekočina, ki ostane v epruveti nad usedlino po obarjanju ali centrifugiranju (Slovenski medicinski slovar); plavajoča tekočina, ki jo od usedline običajno ločimo s pomočjo centrifugiranja (Encyclopedia Britannica).
toplotni šok	Tudi vročinski šok, učinki izpostavljenosti visoki temperaturi (Slovenski medicinski slovar).
turbulentni tok	Vrtinčasto gibanje tekočine ali plina (Slovenski medicinski slovar); gibanje, v katerem so vrtinci in se plasti tekočine ali plina mešajo, pomeni tudi vrtinčast (SSKJ).
virulentnost	Sposobnost povzročiti bolezen (Slovenski medicinski slovar).



## 1 UVOD

Bakterije iz rodu *Legionella* so prisotne v vseh naravnih vodnih virih, vendar zaradi nizkih koncentracij ne predstavljajo večjega tveganja za zdravje ljudi. Problem se pojavi v notranjem okolju zgradb (vodovod, prezračevalne naprave, kotlovnice), kjer je temperatura vode v omrežju med 25 in 42 °C, to pa so idealni pogoji za njihovo razmnoževanje. Po podatkih Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ) se število legioneloz v Sloveniji povečuje. To lahko pomeni, da je sistem kontrole prisotnosti bakterij *Legionella* v vodovodnih sistemih boljši, da je prijavljanje legioneloz doslednejše ali da so postopki odstranjevanja povzročiteljev iz vodovodnih sistemov lahko tudi neuspešni. Posledično to predstavlja velik javnozdravstveni problem v ustanovah, kot so bolnišnice, domovi za ostarele in vrtci, kjer se pogosto nahajajo osebe, ki imajo zmanjšano telesno odpornost. Najpogosteje namreč zbolevalo osebe z oslabiljenim imunskim sistemom, pri katerih se lahko pojavijo zapleti, trajne posledice in tudi smrt. Okužbe se izrazijo v dveh oblikah: legionarska bolezen in pontiaška vročica. Najučinkovitejše preprečevanje zbolevanja za legionelozami je preprečevanje razmnoževanja bakterij iz rodu *Legionella* v vodovodnih sistemih. Tam so primerna mesta za razvoj mikrobnih združb, saj mikrobom omogočajo oprijem ter s tem zadrževanje in razmnoževanje v sistemu. Za boljše razumevanje mikrobne kontaminacije površin, so najnovejše raziskave usmerjene v določanje adhezijskega potenciala mikrobov.

O uspešnosti različnih metod za odstranjevanje bakterij rodu *Legionella* iz vodovodnih sistemov je bilo narejenih veliko študij. Najpogosteje uporabljene metode so izvajanje klornega šoka (20–50 mg rezidualnega klora na liter vode), toplotnega šoka (temperatura vode nad 70 °C), ionizacija z bakrom in srebrom ipd. Poleg tega je potrebno izvajanje preventivnih ukrepov, kot so zagotavljanje stalnega pretoka vode v sistemu, redno točenje vode iz pip, ki so manj v uporabi in čiščenje mrežic na njih ter na glavah tušev. Vendar je pomembno, da rešitev ne iščemo le v novih agresivnih postopkih za uničevanje bakterij v sistemih, ampak poskusimo najti materiale, na katere se ne bodo mogle tako uspešno oprijeti in posledično tudi ne razmnoževati.

V naši študiji smo želeli preveriti intenzivnost oprijema bakterij iz rodu *Legionella* na materiale, iz katerih so najpogosteje grajeni vodovodni in sistemi. Preučili smo tudi nekatere druge zunanje dejavnike, ki bi lahko vplivali na oprijem bakterij v vodovodnih sistemih. Izmed fizikalnih dejavnikov na oprijem bakterij in njihovo razmnoževanje vsekakor v prvi vrsti vplivata hrapavost materiala ter temperatura vode in okolja, izmed kemijskih pa dodatek razkužil in mehčal pri pripravi pitne vode, ki posledično uravnavajo tudi njeno vrednost pH.

## 2 NAMEN IN HIPOTEZE

### 2.1 Namen

Glavni cilj doktorske disertacije je ugotoviti, kako na intenzivnost oprijema bakterij iz rodu *Legionella* vplivajo vrsta, hrapavost, hidrofobnost in električni naboj površin materialov iz katerih so grajeni vodovodni sistemi. Namen raziskave je bil preveriti intenzivnost oprijema bakterijskih celic *Legionella* na materiale različne hrapavosti in sestave. Želeli smo ugotoviti tudi vpliv različnih fizikalnih (temperatura) in kemijskih dejavnikov (prisotnost dikloroizocianurne kisline, Na-polifosfata) v vodovodnih sistemih na intenzivnost oprijema bakterije.

### 2.2 Raziskovalne hipoteze

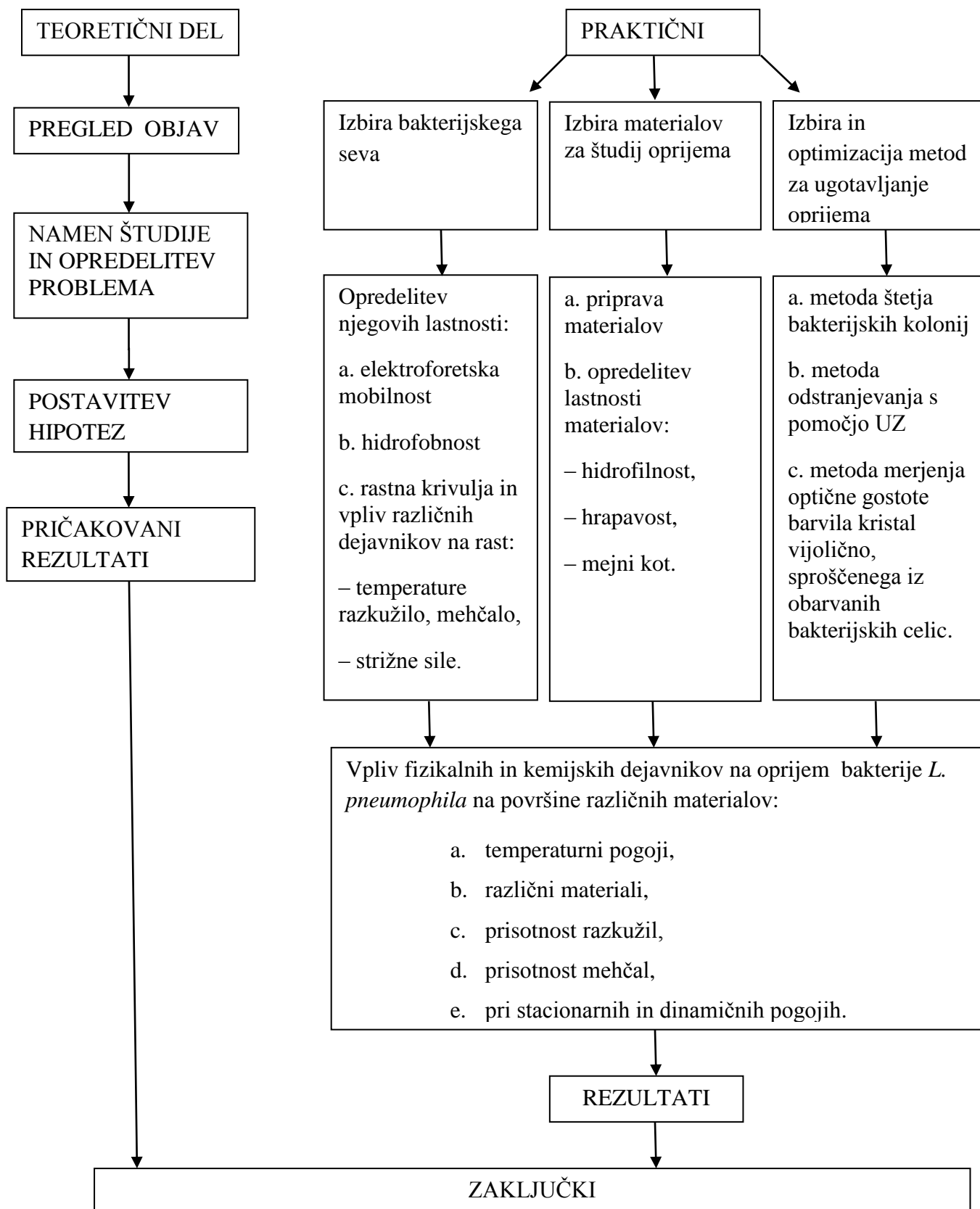
**H 1:** Intenzivnost oprijema bakterijskih celic bo odvisna od hidrofobnosti oz. hidrofilnosti in vrste izbranih materialov.

**H 2:** Bakterije iz rodu *Legionella* se bodo intenzivneje oprijele na površinah z večjo hrapavostjo.

**H 3:** Intenzivnost oprijema bakterij iz rodu *Legionella* bo odvisna od električnega naboja površin.



### 2.3 Struktura raziskave



## 2.4 Časovni potek raziskave in izvajalci

IZVEDBA (čas)	POSKUSI, MERITVE	IZVAJALCI *
februar – april 2012	Preliminarne študije - preizkušanje različnih metod adhezije mikroorganizmov na površine in izbira najustreznejše metode.	dr. Godič Torkar Karmen (ZF) <b>Oder Martina</b>
april - junij 2012	Modifikacija metode barvanja oprijetih bakterijskih celic na površinah z barvilom kristal vijoličnim.	dr. Godič Torkar Karmen (ZF) dr. Nipič Damijan (ZF) <b>Oder Martina</b>
julij 2012 – februar 2013	Izvedba poskusov adhezije bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> na površine steklenih ploščic.	<b>Oder Martina</b>
januar 2013	Izvedba meritev naboja bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> na Institutu Jožef Stefan	dr. Fink Rok (ZF) <b>Oder Martina</b>
februar 2013	Modifikacija metode bakterijske adherence za ogljikovodike za določanje stopnje hidrofobnosti bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> .	dr. Nipič Damijan (ZF) <b>Oder Martina</b>
februar 2013	Izvedba meritev za določanje hidrofobnosti bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i>	<b>Oder Martina</b>
junij 2012 – avgust 2014	Izdelava rastnih krivulj bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i>	<b>Oder Martina</b>
junij 2013 – oktober 2013	Izbira in priprava materialov, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne sisteme.	Dr. Kompare Boris (FGG) <b>Oder Martina</b>

»se nadaljuje...«

»... nadaljevanje«

---

oktober 2013 – avgust 2014	Izvedba poskusov adhezije bakterijskih celic <i>L. pneumophila</i> na površine materialov, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne sisteme.	<b>Oder Martina</b>
april 2014	Meritve mejnega kota kapljice vode na površini materialov, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne sisteme.	dr. Dražić Goran (IJS)
april 2014	Meritve hrapavosti materialov, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne sisteme.	dr. Dražić Goran (IJS)
januar – junij 2014	Razvoj in izdelava sistema pretočne komore za ugotavljanje vpliva strižnih sil na odstranjevanje bakterijskih celic v sodelovanju z Iskra Pio d.o.o..	dr. Bohinc Klemen (ZF) dr. Fink Rok (ZF) Rangus Dušan (Iskra Pio d.o.o.)
junij 2014	Preizkušanje metod za ugotavljanje vpliva strižnih sil na mikroorganizme s pretočno komoro.	dr. Fink Rok (ZF) <b>Oder Martina</b>
julij – september 2014	Poskusi oprijema in odstranjevanja bakterijskih celic s pomočjo pretočne komore.	<b>Oder Martina</b>

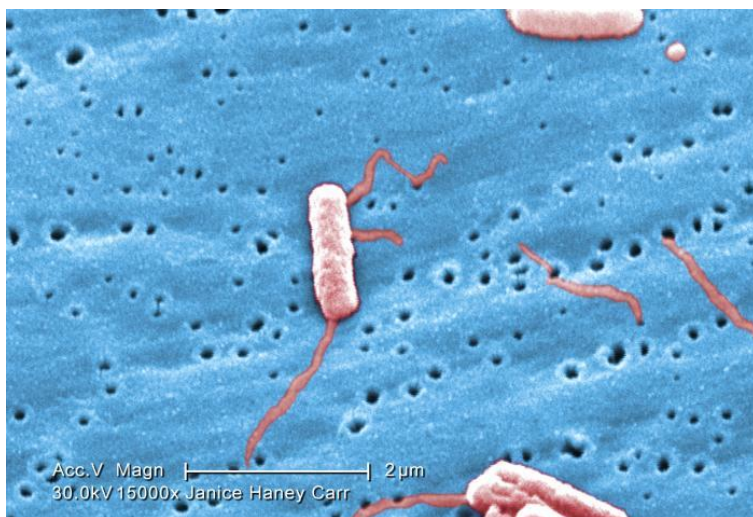
---

\*Opomba: Vsi zgoraj omenjeni izvajalci, razen dr. Kompare Boris, so bili del raziskovalne skupine projekta ARRS RPROJ-JR-2010-I/169 z naslovom »Obvladovanje mikrobne adhezije na kontaktnih površinah«, pri katerem so sodelovale Zdravstvena fakulteta, Veterinarska fakulteta, Biotehniška fakulteta, Institut Jožef Stefan in podjetje Iskra Pio, d. o. o..

### 3 PREGLED OBJAV

#### 3.1 Bakterije iz rodu *Legionella*

Bakterije iz rodu *Legionella* so prisotne v naravnih vodnih virih, vendar zaradi nizkih koncentracij ne predstavljajo večjega tveganja za zdravje ljudi (Fliermans in sod., 1981; Fields in sod., 2002). Spadajo v družino *Legionellaceae* in v rod *Legionella*. Poznanih je več kot 50 vrst in 70 seroloških skupin, ki se med seboj razlikujejo po polisaharidnih antigenskih determinantah na površini celice. Vse vrste živijo v različnih vodnih okoljih, razen *Legionella longbeachae*, ki jo lahko najdemo v zemlji (Diederer, 2008). Bakterije iz rodu *Legionella* so po Gramu-negativne palčke, dolge od 2 do več kot 20  $\mu\text{m}$  in široke od 0,3 do 0,9  $\mu\text{m}$ , ne tvorijo kapsul in spor (Winn, 1988). So mikroaerofilni aerobi in imajo respiratorni metabolizem. Večina znanih vrst ima enega ali več gibljivih bičkov (Slika 1) (Brenner in sod., 1984).



Slika 1: Mikroskopski prikaz bakterije *Legionella*, na kateri so vidni bički (Haney Carr; <http://soundml.com/legionella/>).

Fig. 1: Microscopic view of *Legionella* bacteria, with visible flagella (Haney Carr; <http://soundml.com/legionella/>).

Bakterije iz rodu *Legionella* se razmnožujejo znotrajcelično, zato potrebujejo gostitelja, ki je lahko pražival ali pa humani makrofag (Fields in sod., 2002). Zato parazitirajo v amebah, zlasti v vrstah *Hartmannella (Vermamoeba) vermiformis* (Yamamoto in sod., 1996; Hornei in sod., 2007). Mnenja o tem, ali se razmnožujejo le intracelularno ali tudi izven gostiteljevih celic, so deljena. Fields (1996) ter Murga in sod. (2001) trdijo, da se bakterije *Legionella* v odsotnosti protozojev razmnožujejo edino v laboratorijskih pogojih ali pa preživijo v plasti biofilma (Murga in sod., 2001). Z ostalimi vodnimi bakterijami in drugimi mikroorganizmi v biofilmu živijo v simbiozi (Kramer in Ford, 1994). Pomemben faktor za okužbo tako praživali kot tudi človeških makrofagov je virulentnost bakterije (Fields in sod., 1986). Kramer in Ford (1994) ugotavljata, da so sevi, ki se razmnožujejo v praživalih, veliko bolj virulentni, kot ostali. Virulentnost je tudi pomemben dejavnik pri preživetju bakterij iz rodu *Legionella* v aerosolih (Dennis in Lee, 1988).

### 3.1.1 Nahajališča bakterije iz rodu *Legionella*

Bakterije iz rodu *Legionella* so v naravi v hladni vodi običajno prisotne v nizkih koncentracijah. Izjema so naravni izviri tople vode, kjer višja temperatura vode spodbuja njihovo razmnoževanje (Atlas, 1999; WHO, 2002). Dokazali so jih tudi na kmetijskih površinah, v zemlji za rože, kompostu, podtalnici (Hughes in Steele, 1994; Koide in sod., 1999; Riffard in sod., 2001; Brooks in sod., 2004; den Boer in sod., 2007; Pravinkumar in sod., 2010; Velonakis in sod., 2009; Casati in sod., 2009; Travis in sod., 2012) in celo v morski vodi (Ortiz-Roque in Hazen, 1987). V naravnem okolju preživijo pri temperaturnih pogojih med 0 in 60 °C (Carvalho in sod., 2008). Bakterije so odporne tudi proti kislemu okolju, saj so jih izolirali iz različnih naravnih virov z vrednostjo pH med 2,7 do 8,3 (Anand in sod., 1983; Sheehan in sod., 2005). Postopke priprave in obdelave vode večinoma preživijo, zato jih lahko najdemo tudi v vodovodnih sistemih (Lee in Jones-Lee, 1993). Čeprav zaidejo vanje v majhnem številu, se začnejo zaradi ugodnih temperaturnih pogojev pospešeno razmnoževati (ASHRAE, 2000; IVZ, 2007), zlasti v mrtvih oz. slepih vodih, ki nastanejo ob različnih posegih na internem omrežju (Joseph in sod., 2001; Hojs in sod., 2002).

Bakterije iz rodu *Legionella* so našli tudi v hladilnih stolpih, vlažilcih zraka, klimatskih napravah, v vodnih sistemih zobozdravniških stolov in v bazenskih kopališčih z vrtinčenjem vode (OSHA, 1999). Atlas in sod. (1995) so potrdili prisotnost bakterij iz rodu *Legionella* kar v 68 % vzorcih vode, odvzetih v zobozdravniških stolih, Bentham (1993) pa v 60 do 65 % vzorcev vode v hladilnih stolpih v Avstraliji, odvzetih v poletnih mesecih. S to raziskavo je dokazal, da na razmnoževanje teh bakterij močno vpliva temperatura, saj je bilo pozitivnih vzorcev v zimskem obdobju le med 20 in 30 %. Leoni in sod. (2005) so potrdili prisotnost vrst bakterij *Legionella* v 61 % vzorcev vode v hotelih in v 93,7 % vzorcev v bolnišnicah v Italiji. Tudi raziskava v dveh bolnišnicah v Riu de Janeiru je dala podobne rezultate. V vzorcih vode iz bolnišnice A je bilo potrjenih 60 % vzorcev, iz bolnišnice B pa so bili vsi odvzeti vzorci pozitivni (Ferreira in da Cunha, 2007). Joseph (2004) je med letoma 2000 in 2002 raziskoval povezavo med pojavljanjem legionarske bolezni in viri pitne vode v Evropi. Ugotovil je, da je bila kar v 37,9 % primerov vir okužbe voda iz javnih vodovodov. Do podobnih zaključkov je prišel tudi Stout s sodelavci (1992), ki je opravil raziskavo v kraju Pittsburgh v Pensilvaniji. Kar 40 % primerov legionarske bolezni je lahko povezal s prisotnostjo vrst *Legionella* v vzorcih vode iz 20 javnih vodovodov.

Pojav teh bakterij v vodovodnih sistemih bolnišnic, hotelov in zdravilišč je pereč problem po vsej Evropi (ECDC, 2012; Beate in sod., 2013). Študija v Španiji je pokazala, da je bila v 17 od 20 odvzetih vzorcih vode iz bolnišnic prisotna *Legionella*. V 64,7 % primerov lahko povežejo pojav okužbe z bakterijo in pozitivnimi vzorci vode iz teh ustanov (Sabria in sod., 2004). Leoni in sod. (2001) so potrdili prisotnost bakterij *Legionella* v plavalnih bazenih in v filterih bazenov, toda do okužb med plavanjem naj ne bi prišlo (niso potrjene). Problem predstavljajo manjši bazeni z vročo vodo, imenovani tudi whirlpooli ali jacuzzi, ki niso namenjeni plavanju. V teh bazenih je voda ogreta na približno 32 °C, običajno kroži, ustvarja se brbotanje vode in posledično aerosoli (WHO, 2004). Izbruhi legioneloz, ki so povezani z uporabo bazenov z vročo vodo, so v Evropi v porastu (EWGLI, 2004a; EWGLI, 2004b).

Vprašanje pa je, ali lahko vse te podatke med seboj tudi primerjamo. Al-Matawah in sod. (2012) namreč opozarjajo, da je pri ugotavljanju prisotnosti vrste *L. pneumophila* v različnih

sistemih zelo pomembna pravilno izbrana metoda. Pri preiskavi 204 vzorcev so vzporedno uporabili standardno metodo gojenja bakterij na trdnih gojiščih in metodo PCR. Po prvi metodi so potrdili 48 pozitivnih vzorcev, po drugi pa 85.

### 3.1.2 Virulentnost in obolenja, ki jih povzroča *Legionella*

Bakterije iz rodu *Legionella* v naravnem okolju zaradi nizkega števila ne predstavljajo večjega tveganja za zdravje ljudi. Ljudje v naravi niso tako pogosto v stiku z vodnimi aerosoli. *Legionella* postane problematična v notranjem okolju zgradb v vodovodnih napeljavah, prezračevalnih napravah, kotlovnica, kjer je temperatura vode v omrežju med 25 in 42 °C. To so namreč idealni pogoji za njihovo razmnoževanje (ASHRAE, 2000; IVZ, 2007). Declerk in sod. (2007) se s tem ne strinjajo, saj so dokazali, da je koncentracija bakterij *Legionella* v vzorcih naravnih voda in tistih iz notranjega okolja enaka. Kljub prisotnosti bakterij v vodi ni nevarnosti za ljudi, da bi zboleli. Šele ko pride do tvorbe aerosolov, te bakterije zaidejo v dihala, kjer povzročijo obolenje. Problem predstavljajo majhne kapljice (premer < 5 mm), ki dosežejo pljuča (Kozak in sod., 2013). Zaradi tega smo ljudje najbolj izpostavljeni nevarnostim okužbe tam, kjer zaradi pršenja vode pride do nastanka aerosolov. Nevarna je lahko že najmanjša hišna naprava, kot je na primer vlažilec za rože ali kopalnica, ki proizvaja aerosole (Lee in Lee, 2013). Ni dokazov, da bi se te bakterije prenašale s človeka na človeka (WHO, 2004).

*Legionella* se preko aerosolov lahko prenaša po zraku na daljše razdalje. Tako Morton (1986) dokazuje, da so bakterije iz rodu *Legionella* povzročile okužbo pri ljudeh, ki so bili od vira oddaljeni 500 metrov, Addiss in sod. (1989) pa okužbe povezujejo tudi na razdalji več kot 3,2 kilometra. Nguyen in sod. (2006) celo trdijo, da lahko bakterije *Legionella* potujejo po zraku tudi do 8 kilometrov. V aerosolih preživijo tudi daljši čas, kar je povezano z njihovo virulentnostjo. Bolj virulentni sevi preživijo v aerosolih dlje kot manj virulentni (Dennis in Lee, 1988). O tem, kaj vse vpliva na virulentnost sevov, je bilo narejenih veliko študij, ki smo jih povzeli v Preglednici 1.

Preglednica 1: Virulentni dejavniki bakterij iz rodu *Legionella*.

Table 1: Virulence factors of *Legionella* bacteria.

FAKTOR VIRULENTNOSTI	OPIS	VIRI
1. Adherenca	Sposobnost oprijema na gostiteljeve celice. Pri tem sodelujejo različni geni: <ul style="list-style-type: none"><li>• Hsp60 – gen za oprijem;</li><li>• MOMP – protein na zunanji membrani celične stene, ki pomaga pri vstopu bakterij v makrofage;</li><li>• bički – sodelujejo pri oprijemu.</li></ul>	Stone in Abu Kwaik, 1998 Steinert in sod., 2002 Swanson in Hammer, 2000
2. Endotoksini	Toksične snovi, ki so v celični steni, sestavljene iz lipopolisaharidov (LPS). Za biološki odziv telesa na endotoksin je odgovoren del lipopolisaharida, imenovan lipid A.	Gorbet in Sefton, 2005 Caroff in Karibian, 2003
3. LPS	Zgornja plast celične stene pri po Gramu negativnih bakterijah. Zanja je pri rodu <i>Legionella</i> značilna fazna variabilnost.	Neumeister in sod., 1998 Lüneberg in sod., 2001 Lüneberg in sod., 1998
4. Encimi	Mip – sposobnost infekcije makrofagov. Protein, potreben tudi za znotrajcelično preživetje.	Swanson in Hammer, 2000 Riboldi-Tunncliffe in sod., 2001 Helbig in sod., 2003 Kohler in sod., 2003
5. Prezem železa	Železo je ključnega pomena za zunajcelično razmnoževanje, znotrajcelične infekcije in virulenco. Sodelujejo različni geni: <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>CcmC</i> – potreben za proizvodnjo citokroma, spodbuja asimilacijo železa in povzroči intracelularno infekcijo;</li><li>• <i>FeoAB</i> – odgovorni za zmanjšan prevzem <math>Fe^{2+}</math>;</li><li>• <i>FrgA</i> – izločki mikroorganizmov, ki pomagajo pri raztapljanju <math>Fe^{3+}</math>,</li><li>• <i>IraAB</i> – je odločilen za virulentost in pomaga pri transportu peptidov.</li></ul>	Viswanathan in sod., 2002 Robey in Cianciotto, 2002 Hickey in Cianciotto, 1997 Viswanathan in sod., 2000

»se nadaljuje ...«



»... nadaljevanje«

---

6. Gibljivost	Bički povečajo sposobnost invazije, niso pa potrebni za znotrajcelično razmnoževanje. Pri sami okužbi ne sodelujejo.	Merriam in sod., 1997 Swanson in Hammer, 2000 Dietrich in sod., 2001 Heuner in Steinert, 2003
7. Prevzem hranil	Za prenos hranil je odgovoren gen <i>PhtA</i> (phagosomal transporter), omogoča prenos esencialnih amino kislin.	Sauer in sod., 2005
8. Izločki bakterije	Izločki bakterij so ključnega pomena za znotrajcelično rast in virulentnost. Za 11 genov je dokazano, da so odgovorni za transport nekaterih fosfataz. Za 14 drugih genov pa so ugotovili, da igrajo odločilno vlogo pri okužbi pri nižjih temperaturah.	Hales in Shuman, 1999 Liles in sod., 1998 Aragon in sod., 2000 Flieger in sod., 2001 Rossier in Cianciotto, 2001 Rossier in sod., 2004 Soderberg in sod., 2004
9. Stresni proteini	Večina stresnih proteinov je pomembnih za preživetje bakterije izven gostitelja.	Sadosky in sod., 1994 St John in Steinman, 1996 Abu Kwaik in sod., 1997 Bandyopadhyay in sod., 2003
10. Toksini	<i>RtxA</i> je močan toksin, bistven za lizo gostiteljevih celic. Pomaga bakteriji, da zapusti gostitelja.	Cirillo in sod., 2001 D'Auria in sod., 2008
11. Nerazporejene lastnosti virulentnosti	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Eml</i> loci (early stage macrophage-induced locus) – neznana funkcija;</li><li>• <i>Enh</i> loci (enhanced entry) – pomaga pri vstopu bakterije v celico;</li><li>• <i>LigA</i> (<i>L. pneumophila</i> infectivity gene) – potreben za razmnoževanje v praživalih;</li><li>• <i>MilA</i> (macrophage infectivity loci A) – pomemben za vstop v celice;</li><li>• <i>Pmi</i> loci (protozoa and macrophage infectivity) – pomaga pri znotrajceličnem razmnoževanju.</li></ul>	Gao in sod., 1998 Cirillo in sod., 2000 Fettes in sod., 2000 Harb in Abu Kwaik, 2000. Abu Kwaik in Pederson, 1996

---

Izmed več kot 50 različnih vrst bakterij rodu *Legionella* jih več kot polovica lahko povzroči legionarsko bolezen in/ali pontiaško vročico (Fields in sod., 2002; Newton in sod., 2010). Na podlagi raziskave, ki so jo izvedli na vzorcih tkiv obolelih legionarjev iz leta 1977, so potrdili prisotnost več vrst bakterij iz rodu *Legionella* (Moos in sod., 1977). Znano je, da največ okužb pri ljudeh povzroči *Legionella pneumophila* (v nadaljevanju *L. pneumophila*) (OSHA, 1999). Diederer (2008) navaja, da *L. pneumophila* povzroča več kot 90 % vseh legioneloz, čeprav v okolju prevladujejo nekatere druge vrste (Harrison in sod., 2009). Francoski znanstveniki so iz vzorcev okolja to vrsto potrdili le v 28 % izolatov, medtem ko je bila dokazana pri bolnikih kar v 95,4 % kliničnih vzorcev (Doleans in sod., 2004). V vodovodnih sistemih pogosto najdemo tudi vrste *L. anisa*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii*, *L. micdadei* in *L. feeleii*, ki pa bolezen običajno povzročijo le pri osebah z zelo oslABLJENIM imunskim sistemom (Gomez-Valero in sod., 2009). Tudi v zadnjem poročilu ECDC (2014) za leto 2012 je bilo od skupno prijavljenih 661 primerov legioneloz v Evropi kar 649 primerov dokazanih z okužbo *L. pneumophila*, kar predstavlja 98 %. Nekaj okužb so povzročile tudi vrste *L. bozemanii* (3 primeri), *L. longbeachae* (2 primera), *L. anisa*, *L. dumoffii* in *L. micdadei* pa po en prijavljen primer. Pri poskusih na morskih prašičkih so ugotovili, da je tudi manj virulentni sev *L. micdadei* povzročil okužbo, a se ni razvila v bolezen. V primerjavi s sevom *L. pneumophila* je bilo tkivo pljuč bistveno manj poškodovano (Joshi in Swanson, 1999).

Okužba se odraža v dveh oblikah: kot pontiaška vročica in kot legionarska bolezen. Klinični znaki legioneloz (Preglednica 2) so velikokrat neprepoznavni ravno zaradi podobnosti z znaki drugih bakterijskih pljučnic in gripoznih obolenj (Campodonico in Roy, 2008; Wingender, 2011; Guyard in Low, 2011). Legionarska bolezen poteka kot pljučnica, ki brez zdravljenja hitro napreduje. Inkubacijska doba je od 2 do 10 dni in traja nekaj tednov. Če bolezen ne zdravimo, se stanje bolnika običajno poslabša v prvem tednu in je lahko za ljudi z oslABLJENIM imunskim sistemom tudi usodna. Pomembno je zgodnje odkrivanje in zdravljenje bolezen, saj v tem primeru običajno ne pusti posledic. Umrljivost lahko pri ljudeh z oslABLJENIM imunskim sistemom preseže 40 %. Nekateri bolniki imajo trajne posledice, kot so težave z ravnotežjem in spominom. Pontiaška vročica pa je po kliničnih znakih podobna gripi (Preglednica 2). Inkubacijska doba je od 12 do 48 ur. Bolniki ozdravijo najpozneje v enem

tednu (Baker in sod., 1981; Woodhead in Macfarlane, 1987; Stout in Yu, 1997; Yu, 2000; Akbas in Yu, 2001; Mülazimoglu in Yu, 2001).

Preglednica 2: Bolezenski znaki pri pontiaški vročici in legionarski boleznii.

Table 2: Symptoms of Pontiac fever and Legionnaires' disease.

<b>OBOLENJE</b>	<b>BOLEZENSKI ZNAKI</b>
<b>PONTIAŠKA VROČICA</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• gripi podobni bolezenski znaki</li><li>• oslabelost, utrujenost</li><li>• visoka telesna temperatura</li><li>• mrzlica</li><li>• bolečine v mišicah</li><li>• glavobol</li><li>• bolečine v sklepih</li><li>• driska</li><li>• slabost, bruhanje (redko)</li><li>• težko dihanje</li><li>• suh kašelj</li><li>• otrplost v predelu tilnika</li><li>• zmedenost</li><li>• fotofobija</li></ul>
<b>LEGIONARSKA BOLEZEN</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• v prvih dneh pogosto nespecifični</li><li>• oslabelost</li><li>• visoka telesna temperatura (lahko nad 40 °C)</li><li>• mrzlica</li><li>• glavobol</li><li>• suh kašelj, včasih izkašljevanje krvi</li><li>• bolečine v mišicah</li><li>• težave z dihanjem in bolečine v prsih</li><li>• driska (25–50 % primerov)</li><li>• bruhanje, slabost (10–30 % primerov)</li><li>• zmedenosti in delirij (50 % primerov)</li><li>• odpoved ledvic</li><li>• neodzivnost na <math>\beta</math>-laktamske antibiotike ali aminoglikozide</li></ul>

Viri: Baker in sod., 1981; Woodhead in Macfarlane, 1987; Stout in Yu, 1997; Yu, 2000; Akbas in Yu, 2001; Mülazimoglu in Yu, 2001.

### 3.1.3 Dejavniki tveganja za pojav obolenja

Legioneloze se v večini primerov pojavljajo posamično in le redko se zgodi, da se pojavijo v obliki epidemije. Torej obstajajo določeni dejavniki tveganja, ki pri nekaterih izpostavljenih osebah povzročijo bolezen, pri drugih pa ne. Razdelimo jih lahko na dejavnike tveganja pri človeku in dejavnike tveganja v okolju (Joseph in sod., 2001).

Med dejavnike tveganja pri človeku prištevamo:

- oslavljen imunski sistem,
- kronično obstruktivno pljučno bolezen,
- rakasta obolenja,
- kronično ledvično odpoved,
- sladkorno bolezen,
- srčno popuščanje,
- kajenje,
- alkoholizem,
- starost nad 65 let (Ruef in Francioli, 1997; Joseph in sod., 2001).

Približno ena četrtnina legioneloz je posledica okužbe v bolnišničnem okolju (Marie in sod., 1991). Bolniki imajo običajno oslavljen imunski sistem, in če so v vodovodnih sistemih bakterije iz rodu *Legionella*, so izpolnjeni osnovni pogoji za okužbo. Musič (2009) navaja, da naj bi po podatkih Swiss NOSO koncentracija bakterij med 1.000 in 10.000 CFU L<sup>-1</sup> predstavljala le nizko tveganje za okužbo zdravega človeka, za bolnišnično okolje pa so te koncentracije med 0 in 100 CFU L<sup>-1</sup>. Ljudje pa nismo ogroženi samo v bolnišničnem okolju; da bi preprečili ali vsaj zmanjšali možnost okužbe, moramo zmanjšati dejavnike tveganja v okolju.

Med dejavnike tveganja v okolju prištevamo:

- temperaturo vode, ki je ustrezna za razmnoževanje bakterij *Legionella* (25–40 °C),
- možnost nastanka aerosola,
- druge pogoje, ki ugodno vplivajo na razvoj bakterij iz rodu *Legionella*, kot so prisotnost biofilma, praživali, alg, kotlovca in rje,
- prisotnost hranil v vodi,
- neustrezno uporabo sredstev za razkuževanje vode,
- zastajanje vode v slepih vodih ter na manj uporabljenih pipah in tuših,
- daljšo prekinitev dobave vode,
- neustrezne posege v vodovno omrežje in interne sisteme (ASHRAE, 2000; Joseph in sod., 2001; Hojs in sod., 2002).

Dejavnike tveganja iz okolja lahko nadzorujemo z ustreznimi ukrepi. Za večje ustanove priporočajo pripravo pisnega dokumenta, t. i. načrta ukrepov, v katerem se oceni dejansko stanje v objektu, opredeli tveganje in pripravi preventivne ukrepe (Bartram in sod., 2007). Pri pripravi takšnih načrtov morajo sodelovati strokovnjaki različnih strok, kot so na primer inženirji gradbeništva, sanitarni inženirji, higieniki in drugi.

Načrt naj bo sestavljen iz treh delov:

- Ocena vodovodnega, prezračevalnega ali ogrevalnega sistema – za oceno sistema naj se ustanovi skupina, ki bo natančno preučila obstoječo dokumentacijo, pregledala dejansko stanje, opredelila tveganja in pripravila načrt preventivnih ukrepov. Zato potrebujemo skupino različnih strokovnjakov, ki so usposobljeni za različna področja in poznajo zgradbo. V pomoč so jim lahko sheme internega vodovoda, z vsemi spremembami (renoviranja, slepi vodi), ki so del tehnološkega načrta. Skupina mora ugotoviti ali je kakovost vode v sistemu na najbolj kritičnih mestih (npr. manj uporabljene pipe) ustrezna in ali obstaja možnost okužbe. Skupina pripravi predloge za izboljšanje stanja in izpostavi ukrepe, ki se lahko izvedejo brez večjih posegov v sistem.

- Monitoring – določiti kontrolne točke, ki so lahko tudi del sistema HACCP, na katerih bodo lahko spremljali uspešnost izvajanja preventivnih ukrepov in hitro zaznali pojav večjega števila mikroorganizmov. Določiti morajo mejne vrednosti števila mikroorganizmov, kdaj je treba začeti izvajati ukrepe (npr. razkuževanje vode), in določiti postopke, kako se bosta ocenila načrt in uspešnost izvajanja ukrepov (verifikacija načrta).
- Menedžment in komunikacija – v tem delu načrta naj se izdelajo podporni programi, ki zajemajo izobraževanja in usposabljanje osebja, pripravo dokumentacije za spremljanje izvajanja ukrepov in načrt izvajanja nadzora. Ti programi so lahko tudi del sistema HACCP. Določi se glavno odgovorno osebo, ki komunicira z izvajalci ukrepov, vodstvom in zunanjimi institucijami (Joseph in sod., 2001; Bartram in sod., 2007).

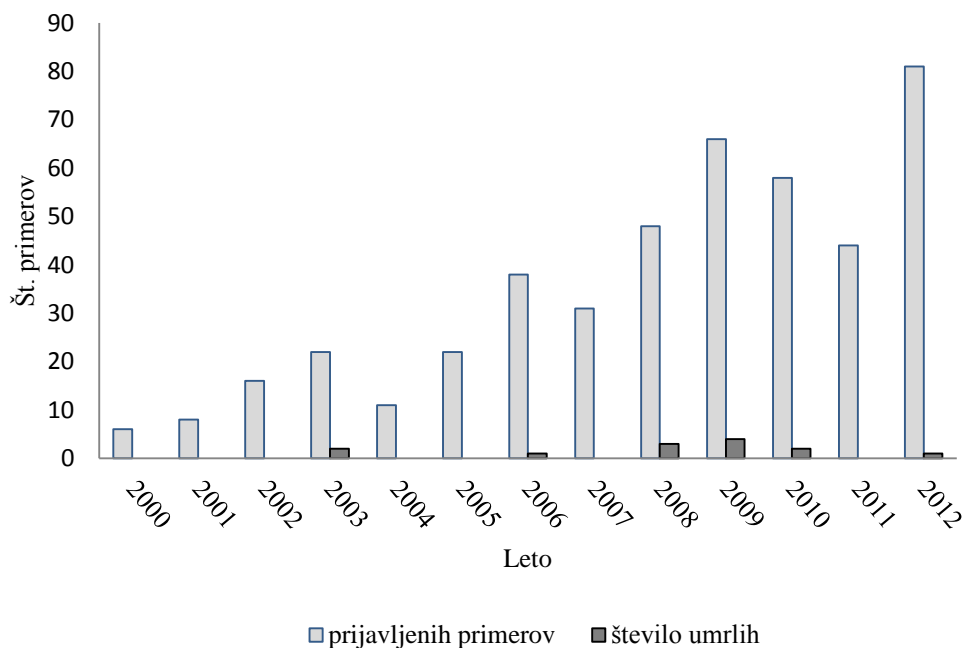
### **3.1.4 Kontrola in spremljanje okužb z bakterijami iz rodu *Legionella* v svetu in Sloveniji**

Pojavljajna okužb s patogenimi vrstami bakterij iz rodu *Legionella* že vrsto let spremljajo številne organizacije. Za ta namen so ustanovili Evropsko delovno skupino za nadzor okužb z bakterijami *Legionella* (angl. European Working Group for *Legionella* Infections – EWGLI) s sedežem v Londonu. Njihovo delo nadzira in usklajuje Evropski center za preventivo in nadzor bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC). Na Švedskem so za spremljanje legioneloz ustanovili Evropsko mrežo za nadzor legionarske bolezni (angl. European Legionnaires' Disease Surveillance Network – ELDSNet) (Joseph, 2013). Znotraj posameznih držav v Evropi so za zbiranje podatkov o pojavljanju legioneloz zadolžene državne institucije; v Sloveniji je to Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). Njegova naloga je med drugim tudi zbiranje in obdelava podatkov o pojavljanju nalezljivih bolezni. Vsako leto izdajo poročilo Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji, v katerem najdemo tudi informacije o številu prijavljenih primerov in o številu smrtnih primerov zaradi legioneloz ter kdaj se pojavlja največ okužb, kdo najpogosteje zboleva in druge informacije o legionelozah pri nas (IVZ, 2000–2012).

Prvi potrjeni izbruh legioneloze v svetu je bil leta 1976, ko je nenadoma zbolelo 182 in od teh umrlo 29 legionarjev, ki so se udeležili konference v Filadelfiji (Fraser in sod., 1977; cit. po Diederer, 2008; Vella, 1978). Že leta 1943 je Tatlock to bakterijo poimenoval rikeciji podoben organizem (Tatlock, 1944; cit. po Kuiper, 2006). Prav tako so leta 1954 osamili takrat še neznano bakterijo, ki je parazitirala v amebah (Drozanski, 1956; cit. po Kuiper, 2006). Že štiri leta po prvem potrjenem izbruhu so izvedli pilotno raziskavo, s katero so želeli ugotoviti, kako pogosto se bakterija iz rodu *Legionella* nahaja v vodnih sistemih in klimatskih napravah bolnišnic in hotelov (Tobin in sod., 1981).

Prijava legioneloze je v Sloveniji obvezna šele od leta 1999, zato točnih podatkov za obdobje pred tem nimamo. Slovenija se uvršča med države z visoko incidenčno stopnjo. Incidenčna stopnja za Evropsko unijo za leto 2009 je bila 1,2/100.000 prebivalcev, v Sloveniji pa je z 2,0/100.000 prebivalcev v letu 2006 narasla na 3,3/100.000 prebivalcev v letu 2009 in 4,0/100.000 prebivalcev v letu 2012. Po podatkih ECDC za leto 2012 je incidenčna stopnja v Sloveniji najvišja v Evropi (ECDC, 2014). Center za nadzor bolezni (CDC) za Združene države Amerike poroča, da je stopnja incidence 0,8/100.000 prebivalcev. Dejanska številka je veliko večja, predvsem zaradi slabe diagnostike in nedoslednega poročanja. V poročilih CDC navajajo, da je dejansko število obolelih v ZDA med 8.000 in 18.000 na leto (CDC, 2007), OSHA pa predvideva, da je številka še bistveno večja, celo do 23.000 primerov na leto (OSHA, 1999).

V Sloveniji smo legionarsko bolezen prvič zaznali leta 1991, ko je v bolnišnici na Jesenicah zbolelo 17 oseb (Likar, 2002). Od leta 1991 do leta 2012 je zbolelo 514 oseb, čeprav podatki niso popolni. Največje število primerov je bilo prijavljenih v letu 2012, tj. 81 obolelih. Na Sliki 2 so prikazani podatki o številu prijavljenih primerov legioneloz v Sloveniji od leta 2000 do leta 2012 ter število smrti v enakem obdobju. Največ primerov je bilo prijavljenih leta 2009, ko so zabeležili 66 obolelih, in leta 2012 z 81 obolelimi. Stopnja umrljivosti zaradi legioneloze je bila največja leta 2008, ko je znašala 6,25 %, ter leta 2009, ko je bila 6,1% (IVZ, 2000–2012).



Slika 2: Število prijavljenih primerov in število smrti zaradi legioneloz v Sloveniji od leta 2000 do leta 2012.

Fig. 2: The number of reported cases of legionellosis and the number of deaths in Slovenia from 2000 to 2012.

### 3.1.5 Postopki priprave vode in preventivni ukrepi

Pravilnik o pitni vodi (2004), lahko pa tudi nekatera tehnološka dokumentacija (npr. projektna dokumentacija, sistem HACCP) predpisuje, da mora biti pitna voda v Sloveniji zdravstveno ustrezna in skladna z določbami. Pitna voda ne sme vsebovati mikroorganizmov, parazitov in njihovih razvojnih oblik v številu, ki bi lahko predstavljali nevarnost za zdravje ljudi. Za preverjanje, ali pitna voda izpolnjuje zahteve tega pravilnika ter zlasti zahteve za mejne vrednosti parametrov, določene v Prilogi I, zagotavlja ministrstvo, pristojno za zdravje, spremljanje pitne vode v okviru državnega monitoringa. Z monitoringom pitne vode se ugotavlja prisotnost različnih mikroorganizmov, toda preiskave vzorcev ne zajemajo preizkušanj na prisotnost bakterij iz rodu *Legionella*. Je pa določeno s Pravilnikom o prezračevanju in klimatizaciji stavb (2002), da v 1 mL vzorca vode iz vlažilnih komor ne sme



biti bakterij vrste *Legionella*. Tudi Pravilnik o minimalnih higienskih in drugih zahtevah za kopalne vode (2003) v Prilogi I navaja, da v 100 mL kopalne vode ne sme biti prisotne bakterije *L. pneumophila*.

Njihova prisotnost v pitni vodi se ugotavlja v nekaterih javnih ustanovah, predvsem v bolnišnicah, zdraviliščih in kopališčih. Te ustanove imajo običajno izdelana pisna navodila, ki so lahko tudi del sistema HACCP, s katerimi med drugim natančno navajajo ukrepe ob prisotnosti nedovoljenih mikroorganizmov v internem vodovodnem sistemu. Velikokrat so za njihovo izvajanje zadolžene t. i. skupine za obvladovanje okužb (Hojs in sod., 2002; Grmšek-Košnik in Pohar, 2008). Najpogosteje uporabljene metode za odstranjevanje mikroorganizmov iz vodovodnih sistemov so toplotni šok s spiranjem sistema, klorni šok, dezinfekcija z bakrovimi in srebrovimi ioni, uporaba oksidantov (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, itd.), uporaba aktivnega oglja, uporaba UV-svetlobe, ki je običajno v kombinaciji z drugimi postopki, membranska filtracija in druge (Joseph in sod., 2001; Stout in Yu, 2003; ACHD, 1997; IVZ, 2010; Kompare in sod., 2010; Lenassi, 2012).

Če se v pitni vodi v objektih potrdi prisotnost bakterij iz rodu *Legionella*, se lahko uporabijo različni postopki za njihovo uničenje. Najpogosteje se izvaja razkuževanje s pomočjo klornega šoka ali uporaba toplotnega šoka, vendar je pomembno tudi preventivno delovanje (IVZ, 2008). Veliko lahko naredimo že z upoštevanjem navodil NIJZ, ki pred uporabo različnih postopkov razkuževanja vode predpisuje naslednje preventivne ukrepe:

- vzdrževanje temperature hladne vode pod 20 °C,
- vzdrževanje temperature tople vode nad 55 °C tudi na najbolj oddaljenih pipah in prhah,
- vzdrževanje temperature v grelcih vode nad 60 °C najmanj eno uro na dan,
- zagotavljanje stalnega pretoka vode v sistemu na mestih, kjer voda zastaja, naj se izvaja tedensko spiranje do stabilizacije temperature vode,
- redno čiščenje mrežic na pipah in glavah tušev, najmanj štiri krat letno oz. po potrebi,
- redno pregledovanje in po potrebi čiščenje grelcev vode, najmanj enkrat letno,
- po posegih v interni vodovodni sistem je treba zagotoviti čiščenje in klorni šok (IVZ, 2008).

Toplotni šok s spiranjem sistema pomeni, da zagotovimo temperaturo vode v grelcu 70 °C in spiramo celoten sistem 30 minut. Pri tem je treba zagotoviti temperaturo vode 60 °C tudi na najbolj oddaljeni pipi (ACHD, 1997; SCBPS, 2005), kar je v velikih sistemih težko doseči. Že znotraj grelcev oz. rezervoarjev prihaja do razlik, saj je lahko temperatura vode pri dnu veliko hladnejša, kot večina ostale vode. Na dnu rezervoarja se lahko nabira tudi sediment, ki lahko služi kot vir hrane za bakterije, ki so prisotne v vodi ter zmanjša učinek segrevanja (Stout in sod., 1985). Če ne zagotovimo temperature vode na vseh točilnih mestih vsaj 60 °C, lahko pričakujemo ponovno naselitev preživelih celic *Legionella* v nekaj tednih ali mesecih (Lin in sod., 1998a). V strokovni in znanstveni literaturi najdemo različna priporočila za izvajanje toplotnega šoka; razlikujejo se po temperaturi vode in tudi po času vzdrževanja predpisane temperature, kar da slutiti, da dejansko ne vemo, katera je tista temperatura, ki bi zagotovo uničila prisotne bakterije v sistemu. Priporočene temperature in časi vzdrževanja temperature so zbrani v Preglednici 3.

Preglednica 3: Priporočene temperature, časi segrevanja in izpiranja sistema v primeru pojava bakterije iz rodu *Legionella*.

Table 3: Recommended temperatures, times of heating and flushing of the system in the event of the occurrence of *Legionella* bacteria.

GRELEC VODE		PIPE in GLAVE TUŠEV		
Temperatura °C	Čas segrevanja	Temperatura °C	Čas spiranja	VIR
60	1 uro na dan	50–55	/	IVZ, 2008
70	/	60	30 minut	SCBPS, 2005
71–77	/	/	30 minut	ASHRAE, 2000
70	/	60	30 minut	Lin in sod., 1998a
/	/	65	5 minut	MMWR, 1997
70–80	do 3 dni	65	vsaj 5 minut	Joseph in sod., 2001
70–80	3 dni	60 in več	30 minut	Linee guida, 2005
/	/	65	30 minut	Ehrlich in sod., 2000
70	24 ur	/	20 minut	OSHA, 1999
70–80	3 dni	60	30 minut	Ruef in Francioli, 1997
60–77	nekaj dni	/	30 minut	Yu, 2000
70	/	60	30 minut	ACHD, 1997

Pri izvajanju klornega šoka se v sistem dovajajo različni klorovi pripravki, da dosežemo koncentracijo prostega klora 20-50 mg L<sup>-1</sup>. Klor pustimo delovati od 1 do 2 uri in potem celoten sistem spiramo (Lin in sod., 1998b). Po mnenju nekaterih strokovnjakov bi morali za vzdrževanje stanja v sistemu postopek ponoviti čez 2 do 5 mesecev, vendar s koncentracijo 2–6 mg L<sup>-1</sup>, hkrati pa vzdrževati koncentracijo klora v sistemu na 0,4 mg L<sup>-1</sup>, da bi uničili tudi bakterije v biofilmu. Toda v primeru vodovodnih sistemov iz kovinskih materialov lahko visoka koncentracija klora v sistemu povzroči korozijo in poškoduje cevi (Rutala in Weber, 1997). Klor je tudi manj učinkovit, če je pH vode več kot 8 (OSHA, 1999). Kloriranje ne učinkuje na nekatere praživali, za katere je dokazano, da v njih parazitira *Legionella*. Tako na primer *Hartmannellae* preživi pri koncentraciji prostega klora 4 mg L<sup>-1</sup>, ciste *Acanthamoebae* pa preživijo celo koncentracijo do 50 mg L<sup>-1</sup> (Kilvington in Price, 1990). Zhang in sod. (2009) so preverjali učinkovitost klora pri uničevanju bakterij iz rodu *Legionella* iz vodovodnega sistema bolnišnic. Sami sicer pravijo, da je kloriranje učinkovita metoda, toda njihovi rezultati kažejo, da bakterij tudi po štiridesetih mesecih konstantnega kloriranja niso uspeli popolnoma odstraniti.

Drugi pripravki za kemijsko razkuževanje vode so še kloramin, klorov dioksid, brom, ionizacija s srebrovimi in bakrovimi ioni in ozon. Kloramin ima veliko prednosti pred klorom, ker je stabilnejši in prodre globlje v biofilme (Lin in sod., 2000). Vendar deluje veliko počasneje kot klor, zato je potreben daljši kontaktni čas delovanja, kar je v praksi težko izvedljivo. Tudi brom ima več prednosti v primerjavi s klorom: je manj koroziven, deluje ne glede na vrednost pH vode in ustvarja manj stranskih proizvodov, ki bi lahko vplivali na zdravje ljudi (OSHA, 1999). Ionizacija z bakrovimi in srebrovimi ioni je uspešna metoda uničevanja bakterij (Lin in sod., 2011), vendar Rohr in sod. (1999) opozarjajo, da po daljši uporabi pride do zmanjšane občutljivosti bakterij iz rodu *Legionella*. Pri nižjih vrednosti pH vode je učinek ionizacije na bakterije manjši (Lin in sod., 2002). Ozoniranje je uspešno pri nadzoru vrste *L. pneumophila* v vodovodnih sistemih, saj je že koncentracija od 0,1 do 0,3 mg L<sup>-1</sup> odstranila 99 % bakterij (Domingue in sod., 1988). Vendar pa je za uporabo problematičen, saj hitro razpade, hkrati pa je neprimerno dražji od ostalih sredstev (Heuner in sod., 1997; EPA, 2001; Logsdan in sod., 2009; Water treatment handbook, 2009 ).

Poleg kemičnih sredstev se za razkuževanje lahko uporabljajo tudi postopki, ki so za človeka in okolje manj škodljivi. Ena od možnosti je razkuževanje vode z uporabo UV-žarkov valovne dolžine 200–280  $\mu\text{m}$ . UV-svetloba na mikroorganizme deluje tako, da presvetli nukleinsko kislino DNA v celici; tako se bistveno zmanjša njeno podvojevanje in sposobnost mikroorganizmov za razmnoževanje. Maksimalno učinkovitost dosežemo pri valovni dolžini 254  $\mu\text{m}$  (Modic, 1995), toda Lin in sod. (2011) opozarjajo, da so UV-žarki manj učinkoviti pri uničevanju mikroorganizmov v biofilmih.

### **3.1.6 Drugi postopki obdelave vode**

Pravilnik o pitni vodi (2004) navaja, da se vodi v fazi njene priprave ne sme dodajati nobenih drugih snovi, razen snovi, ki so potrebne za pripravo vode za zagotavljanje njene skladnosti in zdravstvene ustreznosti. Kljub temu določilo pravilnika v kotlovnica internih vodovodnih sistemov, predvsem v večstanovanjskih stavbah in drugih večjih ustanovah, toplo vodo velikokrat mehčajo. Mehčanje vode se izvaja z namenom, da se prepreči izločanje vodnega kamna iz vode, ki se odlaga na napravah, grelcih in ceveh. V velike vodovodne sisteme nemalokrat dodajajo mehčala, ki vsebujejo fosfate, ki predstavljajo hranila za mikroorganizme (Drev in sod., 2010). V Sloveniji se v okviru državnega monitoringa pitne vode prisotnosti mehčal v vodi ne ugotavlja, zato tudi ni podatkov o tem, koliko vode se dejansko mehča.

## **3.2 Oprijem bakterij na površine in tvorba biofilma**

Biofilm je definiran kot združba mikroorganizmov, ki so pritrjeni na površino (Costerton in sod., 1995). Tvorba biofilma je dinamičen proces, ki vključuje oprijem bakterij na površine, oblikovanje mikrokolonij, razvoj oz. zorenje biofilma in na koncu tudi razpršitev ali odcepljanje mikroorganizmov iz biofilma (Yang in sod., 2012). V biofilmu bakterije med seboj komunicirajo, se združujejo in sodelujejo pri tvorbi biofilma s pomočjo zunajceličnih signalov (Rendueles in Ghingo, 2012).

Oprijem bakterij na površine je fizikalno kemijski pojav, pri čemer igrajo pomembno vlogo lastnosti bakterijskih celic (hidrofobnost, naboj, izrastki, zunajcelične polimerne snovi), lastnosti materialov (hidrofobnost, hrapavost, površinski naboj, vrsta materiala), medij oz. okolje, v katerem se nahajajo (dostopnost hranil, temperature, hitrost toka, pH, prisotnosti soli, protimikrobnih snovi) in interakcije med omenjenimi dejavniki (Van Loosdrecht in sod., 1998; Boks in sod., 2008; Busscher in sod., 2010).

### 3.2.1 Vpliv lastnosti materialov na oprijem bakterijskih celic na površine

Ena od lastnosti materialov, ki vpliva na oprijem bakterij na površine je hidrofobnost. Hidrofobnost površin se določa s kontaktnim oz. mejnim kotom kapljice vode na površini. Mejni kot od  $0^\circ$  od  $90^\circ$  predstavlja hidrofilne površine, večji od  $90^\circ$  pa hidrofobne površine. Površine, ki imajo mejni kot večji od  $150^\circ$ , imenujemo super hidrofobne površine (Mosadegh-Sedghi in sod., 2014). Materiale v osnovi lahko razdelimo na dve skupini. V prvi so materiali z visoko površinsko energijo, ki so hidrofilni in običajno imajo negativen naboj; to so anorganski materiali, kot so steklo, kovine in minerali. V drugi skupini so materiali z nizko površinsko energijo, ki so hidrofobni, običajno pa imajo pozitiven naboj; sem spadajo organski polimeri, kot je na primer plastika (An in Friedman, 1997; Van der Mei in sod., 1991).

Pomembno vlogo pri oprijemu igra tudi topografija površin, pri čemer največkrat obravnavamo njihovo hrapavost in valovitost. Hrapavost pomeni odstopanja od idealne površine, ki jih lahko opišemo kot zelo kratke valove, valovitost pa kot periodično ponavljajoča odstopanja z večjo valovno dolžino. Najpomembnejše veličine za določanje hrapavosti so  $R_z$  srednja globina hrapavosti,  $R_{max}$  največja globina hrapavosti,  $R_a$  aritmetična srednja hrapavost,  $R_q$  kvadratična srednja hrapavost. Najpogosteje se za podajanje hrapavosti materiala uporablja vrednost  $R_a$ , ki je definirana kot aritmetična srednja vrednost absolutnih vrednosti, izmerjenih na določeni razdalji obravnavane površine (Dorobantu in Gray, 2010; Crawford in sod., 2012). Različni avtorji opozarjajo, da je oprijem bakterij na površine odvisen od njihove hrapavosti in da je intenzivnejši na bolj hrapavih površinah (Quirynen in

sod., 1994; Gallardo-Moreno in sod.; 2004; Li in Logan, 2004; Allion in sod., 2006; Bohinc in sod., 2014). Toda An in sodelavci (1995) ugotavljajo, da hrapavost titanove površine nima učinka na bakterijsko adhezijo, zato obravnavati hrapavost površin brez upoštevanja ostalih lastnosti materialov ni smiselno.

Materiali vodovodnih sistemov niso nobena izjema glede nastajanja biofilma. Biofilm na površinah vodovodnih cevi lahko daje bakterijam zaščito in vpliva na kakovost vode (Tsvetanova, 2006). Jefferson (2004) pravi, da so v biofilmu mikroorganizmi zaščiteni pred različnimi vplivi okolja, kot so pomanjkanje hranil, sprememba pH in kisika, pred razkužili in antibiotiki. Biofilmi lahko povzročijo tudi zmanjšanje pretoka vode v vodovodnih ceveh in zaradi prisotnosti potencialno patogenih bakterij lahko predstavljajo vir okužbe pri ljudeh (Davies, 2003; Tan in sod., 2014). Ni še popolnoma raziskano, kako biofilm ščiti bakterije pred razkužili (Subramani in sod., 2009), toda Yaradou in sodelavci (2007) menijo, da potrebujemo bistveno večje koncentracije razkužil in daljši čas delovanja, če želimo uničiti bakterije iz rodu *Legionella* v biofilmih. Feazel in sod. (2009) ter Kormas in sod. (2010) so dokazali prisotnost različnih mikroorganizmov v biofilmih na ceveh, glavah tušev in pipah. V preteklosti so se vodovodni sistemi gradili iz kovinskih materialov, kot so železo, pocinkano železo, medenina in baker. Danes so jih zamenjali sintetični materiali, kot so polivinilklorid, polietilen in drugi. Znano je, da imajo materiali različen potencial za rast mikrobov in tvorbo biofilma. Umetni materiali lahko izločajo organske komponente, ki so lahko vir hranil za mikroorganizme, kovinski materiali pa so bolj podvrženi koroziji, kar lahko pospešuje tvorbo biofilma (Colbourne in Ashworth, 1986). Nekateri znanstveniki so prepričani, da je material glavni faktor, ki vpliva tudi na oprijem bakterije *L. pneumophila* na površine. Tako so Rogers in sodelavci (1994a) ugotovili, da se *L. pneumophila* dobro oprime na površine plastičnih materialov kot sta PVC in polibutilen, medtem ko baker zavira njihov oprijem.

Prisotnost biofilmov v živilski in farmacevtski industriji nemalokrat predstavlja velike probleme, saj lahko kvarno vplivajo na živila oz. na zdravje ljudi, posledično pa prihaja tudi do ekonomskih izgub (Shi in Zhu, 2009). Coquet in sod. (2002) so preučevali tvorbo biofilmov na materialih, ki se uporabljajo v ribjih farmah. V raziskavi so uporabili patogeno bakterijo *Yersinia ruckeri*, ki pogosto povzroči okužbo pri postrvih in posledično veliko

škodo. Poudarjajo, da so vir te patogene bakterije v ribogojnicah lahko tudi biofilmi, ki se ustvarijo na površinah bazenov. Pri zastrupitvah s hrano se velikokrat izkaže, da je izvor patogenih mikroorganizmov biofilm na površinah opreme, ki se uporablja pri pripravi hrane (Janssens in sod., 2008). Teixeira in sod. (2007) so ugotavljali adhezijo šestih mikroorganizmov, ki lahko povzročijo zastrupitve s hrano na različnih materialih, ki jih najpogosteje uporabljamo v kuhinjah. Ugotovili so, da lastnosti materialov bistveno ne vplivajo na oprijem mikroorganizmov na površine, ampak veliko večjo vlogo igrajo lastnosti bakterijskih celic. Kontrolo tvorbe biofilmov izvajajo v številnih živilskih industrijah, saj se zavedajo problema škodljivih učinkov na živila (Harvey in sod., 2007; Hansson in sod., 2012; Jahan in Holley, 2014). Biofilmi lahko predstavljajo problem tudi v medicini, če se ustvarijo na različnih medicinskih vsadkih (Costerton in sod., 1999; Stewart in Costerton, 2001). Pri bolnikih lahko povzročijo zaplete pri bolezni, včasih so lahko celo vzrok smrti (Cook in sod., 2000). Poleg vseh naštetih težav so v biofilmih na vsadkih bakterije zaščitene pred fagocitozo, tudi antibiotiki so manj učinkoviti (Weinstein, 2001; Darouiche, 2004).

Oprijem bakterij *L. pneumophila* na površine vodovodnih, hladilnih in prezračevalnih sistemov lahko predstavlja velike težave, saj biofilmi bakterijam zagotavljajo zaščito pred neugodnimi razmerami. Različne vplive na oprijem te bakterije na površine so preučevali številni znanstveniki (Rogers in sod., 1994a; Türetgen in Cotuk, 2007; Moritz in sod., 2010). Toda biofilmi na površinah niso vedno nezaželeni. V bioloških čistilnih napravah, kjer mikroorganizmi predstavljajo nosilce čiščenja komunalne odpadne vode, si želimo materialov, ki bodo omogočali dober oprijem bakterij na površine (Clint, 2001). Drev in sod. (2006) so ugotovili, da je porozna keramika lahko zelo dober nosilec biomase v bioloških čistilnih napravah. V zadnjem času se znanstveniki osredotočajo na preučevanje antimikrobnih materialov, ki veljajo za manj ugodne za oprijem mikroorganizmov. To so hidrofилni polimerni materiali (npr. polietilenglikol), ki inhibirajo adhezijo proteinov (Liu in sod., 2012).

Ko bakterije vzpostavijo stik s površino, postanejo pomembne interakcije kratkega dosega. Interakcije dolgega dosega so opisane z medsebojnimi silami, ki so odvisne od razdalje in proste energije, interakcije kratkega dosega pa lahko ločimo glede na kemijske vezi kot so vodikove vezi, ionske, hidrofobne interakcije in interakcije med dipol (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Velikost bakterij je med 0,5 do 2  $\mu\text{m}$ , kar lahko primerjamo z velikostjo koloidnih delcev. Zato lahko interakcijo med bakterijami in površino opišemo z DLVO teorijo (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek theory), ki jo mnogi avtorji omenjajo pri opisovanju oprijema bakterij na površine (Marshall in sod., 1971; Gordesli in Abu-Lail, 2012; Zhao in sod., 2014). Teorija DLVO opisuje stabilnost koloidnih sistemov na osnovi odbojnih in privlačnih sil med delci. Koloidni delci težijo k združevanju v večje skupke, ki so lahko kompaktni ali razredčeni, zaradi vseprisotnih privlačnih sil, ki se večajo z večanjem delcev. Najbolj poznane interakcije med delci so van der Waalove interakcije. Če so med koloidnimi delci le privlačne sile, se le ti večajo in energija vezi se med dotikajočima delcema povečuje (Witten, 2004). Po tej teoriji je interakcija med površino in delci (bakterijami) vsota van der Waalsovih in Coulombovih sil, ki se med seboj dopolnjujejo. Van der Waalove sile z oddaljenostjo od površine močno upadejo, Coulombove sile pa postanejo prevladujoče na večji razdalji od površine (Hori in Matsumoto, 2010). Van der Waalove sile temeljijo na privlačnih silah med električno nasprotnimi poli molekul. Razdelimo jih glede na nastanek in sicer na orientacijske, indukcijske in disperzijske. Disperzijske sile (D - sile) so neusmerjene, delujejo na kratke razdalje in niso odvisne od temperature. Nastanejo med nepolarnimi molekulami in zaradi gibanja elektronov se nepolarna molekula lahko sama polarizira. Orientacijske sile (O - sile) so privlačne sile med stalnimi dipoli polarnih molekul. Pojavljajo se poleg D-sil v primerih, ko imajo molekule polarne atomske skupine. Delujejo na večje razdalje in so močno odvisne od temperature. Zaradi toplotnega gibanja se dipoli dezorientirajo, kar povzroči slabljenje privlačnih sil. Polarne molekule se v prostoru obrnejo (orientirajo) tako, da se približajo nasprotni poli, ker se med seboj privlačijo. Indukcijske sile (I - sile) nastanejo med polarno in nepolarno molekulo. Pojavljajo se pri deformaciji elektronskega oblaka z električnim poljem atomske skupine, posebno zaradi delovanja dipola. Njihov pojav ni odvisen od temperature (Dzyaloshinskii in sod., 1961; Abrikosov in sod., 1965; Drev, 2009; Van Houdt in Michiels, 2010). Poleg disperzijskih in dipolnih sil se pojavijo tudi vodikove vezi (H – sile), ki so močno usmerjene privlačne sile med molekulami. Vodikova vez nastane, kadar pride H atom med dva močno elektro negativna atoma. Te



privlačne sile se lahko kažejo navzven kot pozitivni ali negativni elektro – kinetični potencial (zeta potencial), ali v drugi obliki. Površinsko aktivni material ima pozitivni elektro – kinetični potencial. Molekule, ki jih adsorbiramo (npr. bakterije) imajo negativni elektro – kinetični potencial. Adsorbirana plast je praviloma eno molekularna, zato zahteva od adsorbenta izredno veliko aktivno površino (Drev, 2009).

### **3.2.2 Vpliv lastnosti bakterij na oprijem na površine**

Združbe bakterij na površini materialov so preučevali že leta 1936 (Zobell in Anderson, 1936; cit. po Vickery in sod., 2004). Eden ključnih mehanizmov pri tvorbi biofilma je oprijem mikroorganizmov na podlago. Proces oprijema in njegova intenzivnost sta odvisna od fizikalnih in kemijskih interakcij med mikroorganizmi in površino. Oprijem bakterij na površine poteka v dveh fazah. V prvi fazi gre za reverzibilno interakcijo in mikroorganizem se le šibko veže na površino. Druga faza vključuje interakcije med t. i. adhezijskimi beljakovinami bakterijske celice in površino. Mikroorganizem premaga veliko energijsko bariero in se močno oprime površine (van Loosdrecht in sod., 1989; Boks in sod., 2008). Katsikogianni in Missirlis (2004) ter Mains (2008) poudarjajo, da je bakterijski oprijem na površine zapleten proces, na katerega vpliva več dejavnikov, vključno z lastnostmi mikroorganizmov, lastnostmi površin materialov, okoljskimi dejavniki in tudi prisotnostjo hranil (Di Bonaventura in sod., 2008; Kouider in sod., 2010). Oprijem mikroorganizmov omogočajo njihova hidrofobnost, prisotnost izrastkov (bički, fimbrije, pili), gibljivost, lipopolisaharidi, druge izvencelične polimerne snovi, ki vsebujejo polisaharide, proteine in nukleinske kisline, pa tudi velikost in oblika celic (Hori in Matsumoto, 2010). Bakterijska celična stena je sestavljena iz makromolekul, ki so večinoma polielektroliti. Najpomembnejši pri oprijemu na površine je polimer peptidoglikan. Po Gramu-pozitivne celice vsebujejo v celični steni večje količine peptidoglikana, medtem ko je pri po Gramu-negativnih celicah tam prisoten le v tanki plasti (Madigan in sod., 2009). Na oprijem vpliva tudi naboj bakterijskih celic. Negativni naboj na površini celic vpliva na adhezijo zaradi elektrostatične odbojne sile. To povzroči, da se celice nekoliko oddaljijo od površine. Vendar pa je oprijem bakterijskih celic na površine kljub temu možen, predvsem če imajo bakterije fimbrije in bičke. Zlasti po

Gramu-negativne bakterije imajo zaradi prisotnosti izrastkov in zaradi lipopolisaharidov (LPS) v celični steni hidrofobne lastnosti, saj fimbrije in bički vsebujejo ostanke hidrofobne aminokisliline (Rosenberg in Kjelleberg, 1986). LPS sestavljajo zunanji del celične stene po Gramu-negativnih bakterij in zmanjšujejo celično sposobnost medsebojnega vpliva s hidrofилnimi površinami (Makin in Beveridge, 1996). Glavna naloga bakterijskih izrastkov pa je premagati začetno elektrostatično odbojno oviro, ki obstaja med celico in substratom (Corpe, 1980).

### **3.2.3 Vpliv okolja na oprijem bakterij na površine**

Bakterijske celice najdemo v idealnih in tudi ekstremnih okoljih. Od okoljskih pogojev je odvisno njihovo razmnoževanje in tudi intenzivnost oprijema celic na površine oz. tvorba biofilma (Tan in sod., 2014). Pomembno vlogo ima prisotnost hranil, pH in temperatura medija, prisotnost suspendiranih delcev, koncentracija plinov (Gjermansen in sod., 2005; Gomes in sod., 2014).

Glede na podatke raziskav lahko vidimo, da se mikroorganizmi različno odzovejo na prisotnost hranil. Bakterije kot so *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *M. luteus* in *L. monocytogenes* so tvorile močnejši oz. debelejši biofilme v bogatem hranilnem mediju, torej tam, kjer je prisotnih več hranil (Simões in sod., 2010; Zeraik in Nitschke, 2012). Nasprotno sta pa Hood in Zotolla (1997) dokazala da *Salmonella spp.* in *S. marcescens* tvorita biofilm intenzivneje v okolju kjer primanjkuje hranila. Se pa zaradi pomanjkanja hranil lahko spremenijo tudi druge lastnosti mikroorganizmov. Haznedaroglu in sodelavci (2008) so ugotovili, da se bakterijskim celicam *E. coli* ob pomanjkanju hranil spremeni stopnja hidrofobnosti, kar je posledica večje količine LPS, ki so jih celice tvorile zaradi stradanja.

Tudi pH okolja lahko vpliva na bakterijske celice. Toda mikroorganizmi imajo mehanizme, ki omogočajo bakterijski populaciji prilagoditev manjšim okoljskim spremembam pH. Tak proces je izločanje LPS, zaradi česar se bakterije hitreje prilagodijo nihanju pH medija. Toda LPS pomembno vplivajo tudi na procese oprijema bakterijskih celic na površine (Oliveira, 1992).

Temperatura medija ima prav tako vpliv na bakterijske celice. Vpliva lahko na polimere in celične izrastke, v odvisnosti od temperature pa se spreminjajo tudi aktivnosti encimov, ki nadzorujejo številne fiziološke in biokemijske procese v bakterijah in biofilmih (Herald in Zottola, 1988; Hood in Zottola, 1997). Zanimive so ugotovitve raziskave Herald in Zottola (1988), ki so pokazale, da imajo celice pri temperaturi 35 °C po en biček, medtem ko so pri 21 °C imele dva do tri in pri 10 °C celo več kot tri. Zeraik in Nitschke (2010) poročata, da se je z znižanjem temperature okolja število bičkov pri bakterijah *P. aeruginosa* povečalo in povečala se je tudi začetna interakcija med njimi in površino. Choi in sodelavci (2011) so ugotovili, da je bila tvorba biofilma bakterije *S. aureus* in *P. aeruginosa* pri temperaturi inkubacije 37 °C višja od tiste pri 25 °C, medtem ko pri bakteriji *L. monocytogenes* temperatura na oprijem ni imela vpliva.

Zaradi nekaterih postopkov obdelave vode lahko pride do povezave med različnimi reakcijami v samih sistemih. Evropska delovna skupina za nadzor nad legionelozami opozarja, da se pri kloriranju vode lahko pojavi tudi problem korozije na ceveh kovinskih materialov. Zato odsvetujejo stalno kloriranje vode, saj ima dolgotrajna prisotnost prostega klora v koncentraciji 2 mg L<sup>-1</sup> pogosto za posledico korozijo sistemov (EWGLI, 2005). S tem postanejo površine kovinskih cevi bolj hrapave, posledično je lahko v vodi povečana prisotnost železovih ali aluminijevih soli, ki se v vodovodnih sistemih pojavijo prav tako zaradi izvajanja klornih šokov. Pride lahko do sproščanja kovinskih ionov, ki sprožijo postopke flokulacije oz. zlepljanja bakterijskih celic. Flokulacija je učinkovita, če so delci površinsko nabiti. Flokulant je običajno vodo topna močno polarna snov, ki ima nasprotni naboj od delcev. Površinski naboji delcev so lahko zaradi različnih treh osnovnih mehanizmov:

- površinski naboj zaradi mrežne strukture,
- površinski naboj zaradi adsorbiranih ionov,
- površinski naboj na podlagi reakcije na površini.

Pri flokulaciji se zaradi različnih zeta potencialov združijo koloidni organski delci v flokule. Flokulant mora imeti močen pozitiven naboj, da lahko pritegne negativno nabite organske delce in tvori flukule. Zaradi adsorpcije se na nastale flokule vežejo tudi nekatere raztopljene snovi. Če je v vodi istočasno še dovolj hranil in tudi ustrezna temperatura, se bo na stenah vodovnih cevi tvorila plast mikroorganizmov v kateri bodo prisotne tudi bakterije iz rodu *Legionella* (Leterman, 1999; Drev, 2009; Water treatment handbook, 2009).

### **3.3 Vpliv strižnih sil na tvorbo biofilma in odcepljanje bakterij s površin**

Na adhezijo celic vplivajo tudi hidrodinamični pogoji, ti pa lahko vplivajo na prenos celic, kisika in hranilnih snovi, hkrati pa zaradi premikanja vode prihaja do strižnih sil, ki lahko delujejo na intenzivnost razvoja biofilma (Simões in sod., 2007b; Liu in Tay, 2002). Pretok tekočine lahko povzroči premikanje, deformacijo, grbančenje biofilma ali celo odcepitev bakterij od površine (Stoodley in sod., 2002; Wagner in sod., 2010; Vo in Heys, 2011). V samem sistemu lahko strižne sile preprečijo odlaganje in oprijem bakterij na površine, lahko pa povzročijo, da se oprijete bakterije odcepijo in potujejo naprej. Moč strižnih sil in s tem učinkovitost odcepljanja bakterij od površine je odvisna od moči in smeri toka. Če se torej v sistemu ustvarijo dovolj velike strižne sile, bodo te pospešeno odcepljale bakterije in jih prenašale naprej po sistemu (Teodosio in sod., 2011). Ko bodo te sile postale manjše, se bodo mikroorganizmi iz kontaminirane tekočine pospešeno odlagali in oprijemali površin (Chambless in Stewart, 2007).

Nasprotno od teh trditev pa sta Liu in Tay (2002) ugotovila, da je biofilm, ki je nastal pri večjih strižnih silah, gostejši in gladkejši, kot tisti pri nižjih pretokih oz. manjših strižnih silah. Tudi pri razmnoževanju bakterij iz rodu *Legionella* v vodovodnih sistemih največkrat

omenjajo slepe vode. Mirujoča voda naj bi najbolj ustrezala bakterijam *Legionella* za njeno razmnoževanje in tvorbo biofilmov (Joseph in sod., 2001). Ker pa v vodovodnih sistemih voda običajno ne miruje, so v različnih laboratorijskih raziskavah preverjali vplive strižnih sil na oprijem in/ali odcepljanje bakterij na površine. Uporabljali so različne sisteme pretočnih komor, s katerimi so simulirali pretoke (Busscher in van der Mei, 1995; Türetgen in Cotuk, 2007; Zhao in sod., 2007; Teodosio in sod., 2011; Fink in sod., 2014).

### **3.4 Metode ugotavljanja oprijema bakterij**

Študij oprijema mikrobnih združb na površine materialov lahko razdelimo na tri korake: kontakt bakterij s površino, odstranitev neoprijetih celic in ugotavljanje količine oprijetih celic (Murga in sod., 2001). Pri odstranjevanju neoprijetih celic je pomembno, da ne ustvarjamo strižnih sil, ki bi odstranile tudi oprijete celice; pomembna je smer spiranja in sestava tekočine za spiranje. Najpogosteje uporabljene tekočine so destilirana voda, fiziološka raztopina in fosfatni pufri (Pitt in sod., 1993; Bussher in van der Mei, 1995; An in Friedman, 1997). Eden najpomembnejših korakov pri ugotavljanju oprijema bakterijskih celic na površine materialov je izbira ustrezne metode, s katero dokažemo količino mikrobne populacije, ki je oprijeta na površini. Za ugotavljanje oprijema bakterijskih celic na površine materialov v znanstveni literaturi zasledimo različne metode.

Liu s sodelavci (2006), Türetgen in Cotuk (2007) ter Gagnon in Slawson (1999) so v svojih raziskavah uporabili strganje oprijetih celic s sterilnim skalpelom. Postrganim celicam so dodali fosfatni pufer in mešali z namiznim mešalom. Suspenzijo so nanесли na ustrezno gojišče in po inkubiranju šteli porasle kolonije. An in Friedman (1997) sta za odstranjevanje oprijetih celic preizkušala različne metode: homogenizacijo, sonikacijo in s pomočjo surfaktantov, kot sta Tween 80 ali Triton X-100. McDaniel in Capone (1985) menita, da je odstranjevanje celic s pomočjo sonikacije najučinkovitejše. Uporaba različnih kemičnih sredstev namreč lahko poškoduje celice. Pogosto uporabljene metode so tudi štetje bakterij z elektronskim mikroskopom (SEM), metoda štetja bakterijskih celic, ki porastejo na trdnih

gojiščih (An in Friedman, 1997; Jaryszak in sod., 2009) ter indirektna metoda barvanja oprijetih bakterijskih celic z barvilom in nato merjenje optične gostote sproščene barvila (O'Toole in sod., 1999; Kubota in sod., 2008).

## 4 MATERIALI IN METODE

Raziskavo lahko razdelimo v več sklopov. V prvem smo preučevali značilnosti bakterijskega seva *Legionella pneumophila* ter vpliv različnih pogojev (temperatura, dodana sredstva za razkuževanje in mehčanje vode, dinamični pogoji) na njegovo preživetje in razmnoževanje. Opravili smo nekatere meritve lastnosti materialov, ki so bili uporabljeni v raziskavi. Sledile so preliminarnе študije, s katerimi smo iskali najustreznejše metode za ugotavljanje oprijema bakterij na površine. Po optimizaciji metod smo poskuse najprej izvajali na borosilikatnih steklenih ploščicah definirane hrapavosti, nato na materialih, ki se najpogosteje uporabljajo v vodovodnih sistemih v zgradbah. Vpliv strižnih sil na oprijem in odstranjevanje bakterijskega seva pa smo preverjali na kovinskih ploščicah z definirano hrapavostjo in vrsto materiala.

### 4.1 Materiali

#### 4.1.1 Gojišča in reagenti

- Legionella BCYE Agar Base (Biolife, Italija, št. 4015822); gojišče z ogljem in kvasnim ekstraktom za gojenje bakterij *Legionella*;
- Yeast Extract (Fluka Analytica, Indija, št. 92144-500G); kvasni ekstrakt;
- Legionella BCYE  $\alpha$ -growth supplement (Biolife, Italija, št. 423210); dodatek s cisteinom za rast bakterij *Legionella*;
- Gram's crystal violet solution (Merck, Nemčija, št. 1.09218.0500); raztopina barvila kristal vijolično za barvanje po Gramu;
- Kalijev klorid, KCl (Sigma-Aldrich, Nemčija, št. 7447-40-7);
- Natrijev klorid, NaCl (Sigma-Aldrich, Nemčija, št. 7647-14-5);
- Natrijev fosfat, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Nemčija, št. 7558-79-4);
- Kalijev dihidrogen fosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba, Italija, št. 7778-77-0);
- Ksilen, C<sub>8</sub>H<sub>10</sub> (Sigma-Aldrich, Nemčija, št. 1330-20-7);

- Water Purification Tablets OASIS (Hydrochem, Anglija); tablete za pripravo vode z dikloroizocianurno kislino;
- Microfos SH (TKI Hrastnik, Slovenija); mehčala za vodo z natrijevim polifosfatom;

Kemikalije, ki smo jih uporabili so bile čistoče p. a. (pro analysis), kar po specifikaciji reagentov pomeni, da so primerne za analitsko uporabo.

#### **4.1.2 Materiali za študij oprijema celic bakterije *L. pneumophila***

##### **4.1.2.1 Borosilikatne steklene ploščice**

V preliminarnih študijah, ki so bile namenjene predvsem izbiri in optimizaciji metod, smo uporabili borosilikatne steklene ploščice v velikosti 2 x 2 cm, debeline 2 mm, ki so jih izdelali na Institutu Jožef Stefan (IJS). Ploščice so bile hrapavosti 0,07  $\mu\text{m}$ . Polovico ploščic so na IJS dodatno obdelali z diamantnimi abrazivnimi delci v velikosti 201  $\mu\text{m}$ , tako da smo dobili material hrapavosti 5,8  $\mu\text{m}$ .

##### **4.1.2.2 Materiali, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne sisteme**

Uporabili smo cevi iz polipropilena, polietilena, bakra, pocinkane cevi in cev iz sestavljenih materialov, kjer je med dve plasti polietilena zavarjena plast aluminija. Iz naštetih materialov smo pripravili testne cevi, dolge približno 40 mm, ki smo jih na eni strani zaprli z aluminijasto folijo in jo na zunanji strani cevi pritrdili s pomočjo lepila, ki prenese visoke temperature. Lepilo ni bilo v neposrednem stiku z bakterijsko suspenzijo. Tako pripravljene cevi smo sterilizirali in uporabili za ugotavljanje oprijema bakterijskega seva *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine.

Polipropilenske cevi (v nadaljevanju PP-R) se v objektih uporabljajo za toplo in hladno vodo. Uporabljajo se lahko tudi pri talnem ogrevanju, geotermalnem sistemu ogrevanja stavb, bazenskih sistemih, za inštalacije kompromiranega zraka. Cevi so lahko upogljive, gladkih



notranjih površin, nekorozivne. Pri spajanju cevi se uporablja posebna tehnika varjenja, zato se na ta način izognemo spojnim elementom (Totra, 2011).

Polietilenske cevi (v nadaljevanju PE) se uporabljajo za hišne vodovodne napeljave manjših dimenzij. Cevi zaradi načina izdelave zagotavljajo najvišjo možno varnost in skupaj z ustreznimi spojnimi elementi ali medsebojno zavarjene cevi zagotavljajo trajno tesne cevne sisteme. Fleksibilnost PE cevi omogoča enostavno polaganje. Pri sesedanju ali premikanju tal ne nastajajo razpoke ali lomi, kot se to lahko zgodi pri ceveh iz klasičnih materialov (Zagožen, 2011).

Pri ceveh multialpex (v nadaljevanju Pex-Al-Pex) imamo kombinacijo dveh materialov, ki sta s pomočjo laserskega varjenja združena v eno cev. Zunanja in notranja plast sta iz PE cevi, med njiju je zavarjena plast aluminijevega traku: uporablja se za vodovodne inštalacije v stavbah. Zaradi svojih lastnosti, kot sta fleksibilnost in majhna teža, se ti materiali vedno pogosteje vgrajujejo v vodovodne sisteme stavb. Aluminijasta plast blokira prehod kisika in izhlapevanje vode. Za razliko od PE in PP-R cevi ima nizko toplotno razteznost. Zaradi notranje plasti Pex je cev gladka, kar preprečuje nastanek biofilma (Dalpex, 2013).

Bakrene cevi so izdelane iz minimalno 99,9 % čistega bakra in so z notranje strani dodatno zaščitene proti luknjičasti koroziji. Proizvajajo jih v palicah ali na kolutih, mehkih, poltrdih in trdih izvedbah. Namenjene so za uporabo v različnih hišnih inštalacijah. Uporabili smo cevi, primerne za pitno vodo (Štern, 2012).

Pocinkane cevi so že desetletja množično vgrajevali v vodovodne sisteme. Ob polaganju inštalacij se jih ne sme kriviti, slaba lastnost pa je tudi korozivnost, do katere lahko pride ob sočasnem polaganju cevi različnih materialov (npr. pocinkane in bakrene). Pomembna je tudi ustrezna toplotna izolacija vodovodnih cevi, s katero preprečimo segrevanje hladne vode, ki

lahko povzroči pojav korozije tudi na zunanji strani kovinske cevi zaradi kondenzacije pare iz okoliškega zraka (Rutala in Weber, 1997).

#### **4.1.2.3 Kovinske ploščice**

Za ugotavljanje oprijema in odstranjevanja bakterijskih celic s površine materialov pri stacionarnih (v inkubatorju) in dinamičnih pogojih (v pretočni komori, s konstantnim pretokom  $20 \text{ mL min}^{-1}$ ), ki smo jih izvajali v pretočni komori (Poglavje 4.2.3, Slika 3), smo uporabili kovinske ploščice iz nerjavnega jekla AISI 304 v velikosti  $2 \times 2 \text{ cm}$ , debeline  $2 \text{ mm}$ , ki so jih izdelali v podjetju Iskra Pio, d. o. o., Šentjernej. Površina ploščic je bila hrapavosti  $9 \mu\text{m}$  (meritve izvedli na IJS, glej Poglavje 4.3).

#### **4.2 Značilnosti celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 ter vplivi fizikalnih in kemijskih dejavnikov na njeno preživetje in razmnoževanje**

V raziskavi smo uporabili standardni sev bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (Czech Collection of Microorganisms, Brno, Češka). Bakterije iz zbirke so bile dostavljene v Slovenijo v liofilizirani obliki. Za izbrani bakterijski sev smo opravili meritve elektroforetske mobilnosti, ugotavljali njegovo hidrofobnost in preverili razmnoževanje pri različnih pogojih. Pri vseh študijah rastne krivulje smo uporabili metodo štetja bakterijskih kolonij, poraslih na trdnem gojišču BCYE z dodanim cisteinom. Pri vseh poskusih smo uporabili 24 urno prekonočno kulturo, kjer je bila koncentracija bakterijskih celic  $5,7 \log \text{ CFU mL}^{-1}$ . Bakterije so bile ob začetku poskusa še v eksponencialni fazi rasti, kar pomeni, da so imele sposobnost nadaljnega razmnoževanja. Največje število bakterijskih celic pri idealnih pogojih inkubacije ( $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ) je bilo  $8,5 \log \text{ CFU mL}^{-1}$ .

#### 4.2.1 Vpliv temperature na rastno krivuljo

Rastno krivuljo bakterijskega seva *L. pneumophila* z začetno koncentracijo  $5,7 \log \text{CFU mL}^{-1}$  smo ugotavljali pri temperaturah  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  (SIST ISO 11731, 1999),  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Bakterije iz rodu *Legionella* se intenzivno razmnožujejo pri temperaturi med  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tai in sod., 2012), zato smo želeli preveriti, kako se odzove preučevana bakterija, če temperaturo znižamo oz. povišamo za  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tudi priporočila različnih institucij (Preglednica 3) kot možen ukrep za odstranjevanje teh bakterij iz vodovodnih sistemov navajajo dvig temperature tople vode med  $50\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$  ali več, hladne vode pa pod  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (IVZ, 2008).

Za študij rastne krivulje testnega seva *L. pneumophila* pri različnih pogojih smo uporabili metodo štetja bakterijskih kolonij, ki so po inkubaciji porasle na trdnih gojiščih. Za gojenje bakterij pri različnih pogojih smo uporabili tekoče gojišče YEB (Yeast Extract Broth) z dodanim cisteinom. Rezultati so izraženi v logaritmskih vrednostih  $\log \text{CFU mL}^{-1}$ . Po inkubaciji smo vsakih 24 ur iz ene epruvete odvzeli 1 mL suspenzije in jo po ustreznih decimalnih razredčitvi (ISO 8199, 2005) nanесли na trdno gojišče BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) z dodatkom cisteina in inkubirali pri temperaturi  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ , skladno s standardom SIST ISO 11731 (1999), oz. del vzorca pri  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ostale epruvete z bakterijsko kulturo smo gojili naprej in jih testirali v nadaljnjih časovnih intervalih do 120 ur. Za rastno krivuljo do 120 ur inkubacije smo se odločili, ker imajo bakterije *Legionella* počasno rast in daljši regeneracijski čas tudi do 10 dni (SIST ISO 11731, 1999). Razmnoževanje bakterijskega seva smo ugotavljali v času 0 ur ter po 24, 48, 72, 96 in 120 urah. Za vsak izbran čas smo odvzeli po dva vzorca (dve paralelki), kar pomeni 12 vzorcev. Rezultati so povprečne vrednosti treh poskusov, kar skupaj predstavlja 36 vzorcev za vsako temperaturo, oziroma za vse tri izbrane temperature ( $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) skupaj 108 vzorcev. Izračunali smo tudi standardni odklon, vendar v grafih ni povsod viden, ker so izračunane vrednosti prenizke (med 0 in  $3 \text{ CFU mL}^{-1}$ ).

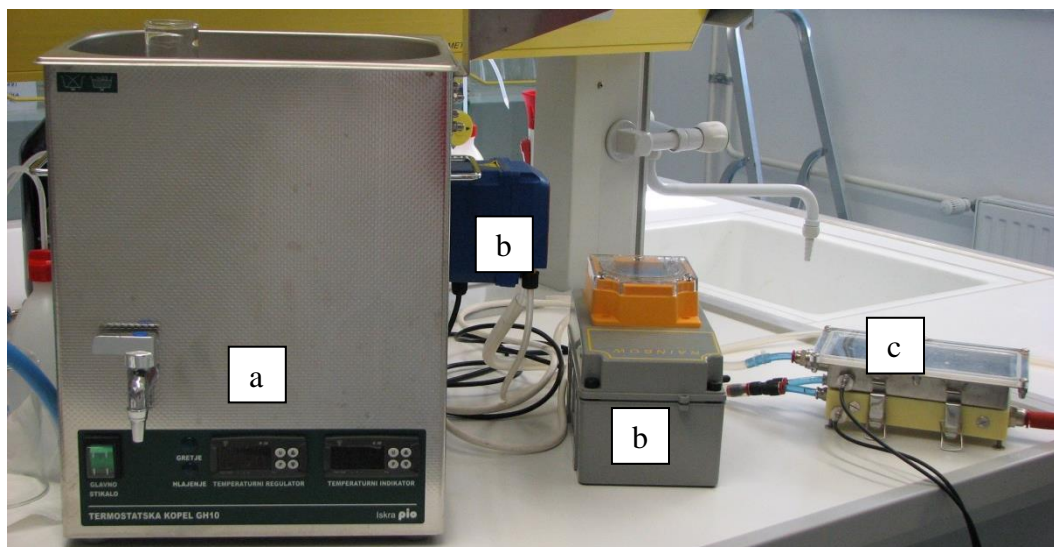
#### **4.2.2 Vpliv razkužila dikloroizocianurne kisline in mehčala natrijevega polifosfata na rastno krivuljo**

Učinkovanje razkužila na rast testne bakterije smo ugotavljali tako, da smo delu suspenzije bakterijske kulture *L. pneumophila* z začetno koncentracijo  $5,7 \log \text{ CFU mL}^{-1}$  dodali razkužilo dikloroizocianurno kislino v koncentraciji  $17 \text{ mg L}^{-1}$ . Takšno koncentracijo razkužila in čas delovanja priporoča proizvajalec sredstva (Oasis), in sicer kot učinkovito za uničevanje mikroorganizmov v pitni vodi, zato ga nismo spreminjali. Razmnoževanje bakterijskega seva smo ugotavljali v času 0 ur, po 10 minutah ter 24, 48, 72, 96 in 120 urah. Za vsak izbran čas smo odvzeli po dva vzorca (dve paralelki), kar pomeni 14 vzorcev pri poskusu z dodano dikloroizocianurno kislino in 14 vzorcev brez dodane dikloroizocianurne kisline. Poskus smo ponovili tri krat (42 vzorcev z in 42 brez razkužila), kar skupaj predstavlja 84 vzorcev. Uporabili smo metodo štetja bakterijskih kolonij, ki porastejo na trdnem gojišču ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) in rezultate izrazili kot  $\log \text{ CFU mL}^{-1}$  bakterijske kulture. Izmerili smo pH gojišča in prisotnost prostega klora v času 0 in po desetih minutah. Delovanja klora po desetih minutah nismo zaustavili (blokiralni).

V drugem primeru smo vzorcu dodali mehčalo natrijev polifosfat, ki se uporablja za mehčanje vode v večjih vodovodnih sistemih. Uporabili smo izdelek Microfos SH (TKI Hrastnik, 2006). Rastopina Microfos SH ustreza slovenskemu standardu, ki predpisuje kakovost aditivov, ki se uporabljajo za pripravo pitne vode (SIST EN 1212, 2005), kar dokazuje Poročilo o preizkušanju, ki so ga opravili v sanitarno kemičnem laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Novo mesto (ZZV NM, 2006). Pri poskusih smo uporabili koncentracijo  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , kot predpisuje proizvajalec mehčal. Razmnoževanje bakterijskega seva smo ugotavljali takoj ob začetku poskusa (čas 0 ur) ter po 24, 48, 72, 96 in 120 urah. Za vsak izbran čas smo odvzeli po dva vzorca (dve paralelki), kar pomeni 12 vzorcev pri poskusu z dodano dikloroizocianurno kislino in 12 vzorcev brez dodane dikloroizocianurne kisline. Poskus smo ponovili tri krat, kar skupaj predstavlja 36 vzorcev z razkužilom in 36 brez razkužila, skupaj 72 vzorcev.

### 4.2.3 Vpliv dinamičnih pogojev na rastno krivuljo

Pretok vode v vodovodnih sistemih ustvarja dinamične pogoje, zato smo želeli preveriti, ali na rast oz. razmnoževanje bakterijskega seva *L. pneumophila* vpliva laminarni tok. Razmnoževanje bakterijskega seva smo ugotavljali samo pri laminarnem toku, saj turbulentni tok v vodovodnih sistemih običajno ni prisoten. Pogoje smo ustvarili s pomočjo pretočne komore, ki so jo naredili v podjetju Iskra Pio, d. o. o in je bila uporabljena tudi v raziskavi Fink in sod. (2014). Pretočna komora, zunanjih dimenzij 399 x 325 x 265 mm, je sestavljena iz več delov (Slika 3). Levo na sliki je hladilno/ogrevalna komora (a), s katero lahko zagotovimo temperaturne pogoje od 0 do +50 °C. Desno je testna pretočna celica (c) s priključkom za turbulentni in laminarni tok, ki je natančneje predstavljena v nadaljevanju (Slika 5). Različne pretoke smo zagotovili s pomočjo dveh peristaltičnih črpalk (b). Črpalka za laminarni tok omogoča maksimalni pretok 20 mL min<sup>-1</sup>, črpalka za turbulentni tok pa 1.200 mL min<sup>-1</sup>. Sam sistem omogoča kontrolo temperature na dveh točkah. Prvo merilno mesto je v hladilno ogrevalni komori, drugo merilno mesto temperature pa je v pretočni celici.



Slika 3: Sistem pretočne komore s, hladilno/ogrevalno enoto (a), s pretočno celico (c) in peristaltičnima črpalkama (b), za ugotavljanje vpliva laminarnega in turbulentnega toka na oprijem in odstranjevanje mikroorganizmov s površin materialov.

Fig. 3: The system of liquid flow chamber with a cooling / heating unit (a), a polyethylene tray (c) and a peristaltic pump (b) to determine the impact of laminar and turbulent flow to the attachment and removal of microorganisms from surfaces of materials.

Pred izvajanjem poskusov smo sistem pretočne komore najprej 10 minut spirali s 5% raztopino vodikovega peroksida, nato pa še 10 minut s sterilno destilirano vodo. Pripravili smo 300 mL bakterijske kulture v koncentraciji  $5,7 \log \text{CFU mL}^{-1}$  in z njo napolnili sistem. Bakterijsko kulturo smo s pomočjo peristaltične črpalke črpali skozi sistem pri temperaturi  $36^\circ\text{C}$ , skupaj 72 ur. Vsakih 24 ur smo odvzeli 1 mL suspenzije in jo ob ustrezni decimalni razredčitvi (ISO 8199, 2005) nanesli na trdno gojišče BCYE z dodatkom cisteina in inkubirali pri pogojih skladno s standardom SIST ISO 11731 (1999). Razmnoževanje bakterijskega seva smo ugotavljali v času 0 ur ter po 24, 48 in 72 urah. Za vsak izbran čas smo odvzeli po dva vzorca (dve paralelki), kar pomeni 8 vzorcev. Rezultati so povprečne vrednosti treh poskusov, kar skupaj predstavlja 24 vzorcev v dinamičnih pogojih in 24 vzorcev v stacionarnih pogojih.

Skupaj pri poskusih ugotavljanja intenzivnosti razmnoževanja bakterijskega seva *L. pneumophila* s pretočno komoro smo odvzeli 48 vzorcev.

#### **4.2.4 Elektroforetska mobilnost in hidrofobnost celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152**

Elektroforetsko mobilnost bakterij smo izmerili z merilnikom zeta potenciala (Zeta Potential Analyzer). Na podlagi znane jakosti električnega polja in rezultatov meritev elektroforetske mobilnosti smo s pomočjo enačbe po Helmholtz–von Smoluchowskem (Helmens, 1977) izračunali zeta potencial testnih bakterij. Metodo priprave bakterijske kulture smo povzeli po Rosenbergu in sod. (1980) ter Tahmourespourju in sod. (2008) ter jo modificirali. Bakterijsko kulturo smo predhodno pripravili po naslednjem postopku: eno kolonijo bakterij, poraslih na trdnem gojišču BCYE, smo nacepili v tekoče gojišča YEB in inkubirali 24 ur pri 36 °C. Po 8 mL 24-urne bakterijske kulture smo prenesli v sterilne centrifugirke in centrifugirali pri 9500 x g in tako celice ločili od tekočega gojišča. Supernatant smo previdno odlili in celice resuspendirali v 5 mL, 1 mmol L<sup>-1</sup> sterilnega fosfatnega pufra (0,026 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,047 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v 1 L destilirane vode). Suspenzijo smo dobro premešali na vrtničniku in postopek s centrifugiranjem ponovili še dvakrat, da smo popolnoma odstranili ostanke gojišča. V zadnjem koraku smo bakterijsko usedlino suspendirali v 7 mL fosfatnega pufra (Rosenberg in sod., 1980). Na tako pripravljenem vzorcu smo na Institutu Jožef Stefan izvedli meritve elektroforetske mobilnosti. Opravili smo tri neodvisne analize, vsak vzorec je bil pomejen deset krat, kar skupaj predstavlja 30 meritev.

Za merjenje hidrofobnosti mikrobne celične površine smo uporabili modificirano metodo bakterijske adherence za ogljikovodike, povzeto po Rosenbergu in sod. (1980) ter Tahmourespourju in sod. (2008). Postopek priprave bakterijske kulture je bil enak, kot pri pripravi vzorca za izvajanje meritev elektroforetske mobilnosti bakterijskih celic. Po centrifugiranju in spiranju smo celice ponovno suspendirali v 5 mL fosfatnega pufra. Na koncu smo odvzeli 2,5 mL suspenzije celic v fosfatnem pufri, ki smo ji dodali 1 mL ksilena

in inkubirali pri sobni temperaturi 20 minut. Po inkubaciji smo izmerili absorbanco (OD 620 nm) samega pufra in spodnje vodne faze. Izračunali smo stopnjo hidrofobnosti ( $h$ ) po naslednji enačbi:

$$h = (A_i - A_f)/A_i \quad (1)$$

kjer je,  $h$  stopnja hidrofobnosti,  $A_i$  optična gostota suspenzije brez ksilena in  $A_f$  optična gostota suspenzije s ksilenom. Izvedli smo tri neodvisne analize na treh paralelkah. Vsak vzorec je bil pomerjen devet krat, kar skupaj predstavlja 81 meritev.

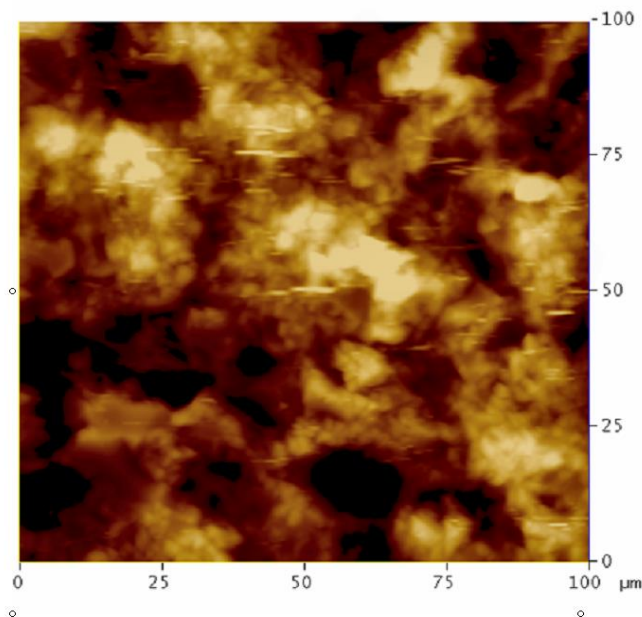
#### **4.3 Meritve hrapavosti in hidrofobnosti materialov za študij oprijema celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152**

Vse meritve lastnosti materialov so izvedli na Institutu Jožef Stefan. Hrapavost površin steklenih ploščic so merili z mikroskopom na atomsko silo (angl. Atomic Force Microscopy – AFM). Velika prednost te metode je možnost fotografiranja površin z visoko ločljivostjo (Slika 4). Uporabljen je bil mikroskop VEECO 3100 AFM. Na vsaki od dveh uporabljenih vrst steklenih ploščic so opravili tri meritve (skupaj šest rezultatov).

Za materiale večje hrapavosti (cevi izbranih materialov in kovinske jeklene ploščice) so uporabili profilometer Form Talysurf serije 2. S pomočjo igle, ki potuje po površini, aparat izmeri njeno hrapavost in valovitost. Hrapavost pomeni odstopanja od idealne površine, ki jih lahko opišemo kot zelo kratke valove, valovitost pa kot periodično ponavljajoča odstopanja z večjo valovno dolžino (Dorobantu in Gray, 2010). Na Institutu Jožef Stefan so izmerili vrednosti  $R_a$  (aritmetična srednja hrapavost),  $R_z$  (srednja globina hrapavosti) in  $R_q$



(kvadratična srednja hrapavost). Rezultati v nadaljevanju so podani za izmerjene vrednosti  $R_a$ . Vrednost  $R_a$  je definirana kot aritmetična srednja vrednost absolutnih vrednosti, izmerjenih na določeni razdalji obravnavane površine. Na vsakem materialu so bile opravljene tri neodvisne meritve, kar skupaj predstavlja 33 meritev.



Slika 4: Topografija površine steklene ploščice, narejena s pomočjo mikroskopa na atomsko silo na Institutu Jožef Stefan (foto: Dražič, 2012).

Fig. 4: Topography of the surface of the glass tiles made by atomic force microscope on Institute Jožef Stefan (foto: Dražič, 2012).

Mejni kot izbranih površin so izmerili na Institutu Jožef Stefan, s tenziometrom Theta Optical Tensiometer. S pomočjo meritev mejnega kota se določa hidrofobnost površin. Na vsakem materialu so opravili tri analize, kar skupaj predstavlja 39 rezultatov meritev hidrofobnosti. Sistem (tenziometer) je sestavljen iz kamere in vira svetlobe. Na izbrano površino se z dozatorjem tekočin doda kapljica vode, katero osvetlimo z virom svetlobe, ki je na nasprotni strani kapljice. S pomočjo kamere se naredi slika kapljice in nato se izmeri kot med kapljico vode in površino. Na podlagi meritev se izračuna mejni kot po Youngovi enačbi:

$$\gamma_{sg} - \gamma_{sl} - \gamma_{lg} \cos \theta_c = 0 \quad (2)$$

pri čemer gre za razmerje med tremi komponentami in je  $\gamma_{sl}$  površinska napetost med površino in tekočino,  $\gamma_{lg}$  površinska napetost med tekočino in plini ter  $\gamma_{sg}$  površinska napetost med površino in plini (Marmur, 2003).

#### **4.4 Ugotavljanje oprijema celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine**

Oprijem bakterijskega seva *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 smo ugotavljali na različnih materialih in pri različnih pogojih. Raziskavo lahko razdelimo v več sklopov. Prvi sklop so predstavljale preliminarnе študije, s katerimi smo preizkusili več različnih metod za kvantifikacijo oprijeta bakterijskih celic na površinah. Po primerjavi rezultatov preizkušenih metod, smo se odločili za metodo barvanja celic z barvilom kristal vijolično (ta se sprosti iz predhodno obarvanih bakterijskih celic), ki smo jo povzeli po O'Toole in sod. (1999) in Kuboti in sod. (2008) ter jo modificirali (Bohinc in sod., 2014). Za odstranjevanje neoprijeta in rahlo oprijeta bakterij smo uporabili metodo izpiranja s fosfatnim pufrom (Türetgen in Cotuk, 2007). An in Friedman (1997) opozarjata, da je treba biti pozoren na sile in smer izpiranja ter na kemijsko sestavo tekočin za izpiranje. Metoda barvanja z barvilom kristal vijolično je bila dovolj natančna, da smo jo uporabili pri vseh nadaljnjih raziskavah.

#### **4.4.1 Ugotavljanje intenzitete oprijema celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine steklenih ploščic definiranih lastnosti**

Metodo merjenja koncentracije barvila kristal vijolično, ki se sprosti iz predhodno obarvanih oprijetih celic, smo za ugotavljanje oprijema bakterij na izbrane površine povzeli po O'Toole in sod. (1999) in Kubota in sod. (2008) ter jo modificirali. Prve študije smo izvajali na steklenih ploščicah z definirano hrapavostjo, ki smo jih inkubirali v mikrotitrskih ploščicah s šestimi utori. V vsak utor smo vstavili po eno stekleno ploščico in dodali 4 mL tekočega gojišča YEB, dodatek za rast s cisteinom in 24-urno bakterijsko kulturo v razmerju 1 : 30 (133  $\mu$ L kulture v 4 mL gojišča). Za vsak poskus smo uporabili 42 ploščic hrapavosti 5,8  $\mu$ m ter 42 ploščic hrapavosti 0,07  $\mu$ m. Poskuse smo izvajali pri treh različnih temperaturah (36 °C, 15 °C in 55 °C), kar skupaj predstavlja 252 vzorcev. Oprijem bakterij smo preverjali po različnih časih inkubacije v intervalu 12 ur, in sicer do 78 ur. Iz mikrotitrskih ploščic smo najprej odstranili bujon z neoprijetimi celicami in steklene ploščice trikrat spirali s 5 mL pufru PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 1 L destilirane vode, pH = 7  $\pm$  2). S spiranjem smo odstranili bakterijske celice, ki se niso oprijele podlage. Celice, ki so se oprijele na površino materialov, smo fiksirali z vročim zrakom, obarvali s 5 mL 0,1% barvila kristal vijolično (Merck) in pustili delovati 5 minut. Steklene ploščice smo ponovno spirali s pufrom PBS in barvilo fiksirali z vročim zrakom. Barvilo kristal vijolično smo nato ekstrahirali iz celic s 96% etanolom 5 minut pri zaprtih mikrotitrskih ploščicah, da alkohol ni izhlapel. 200  $\mu$ L etanola z barvilom smo nato prenesli v mikrotitrsko ploščico (96 utorov) in merili optično gostoto barvila s čitalcem mikrotitrskih ploščic Infinite® 200 PRO, Tecan Austria GmbH, pri valovni dolžini 620 nm. Za negativno kontrolo smo po eno ploščico izpostavili sterilnemu bujonu in jo nato obravnavali po enakem postopku kot testne. Pri vsakem poskusu smo uporabili po eno ploščico vsake hrapavosti za vsak čas inkubacije, kar skupaj predstavlja 126 vzorcev negativnih kontrol.

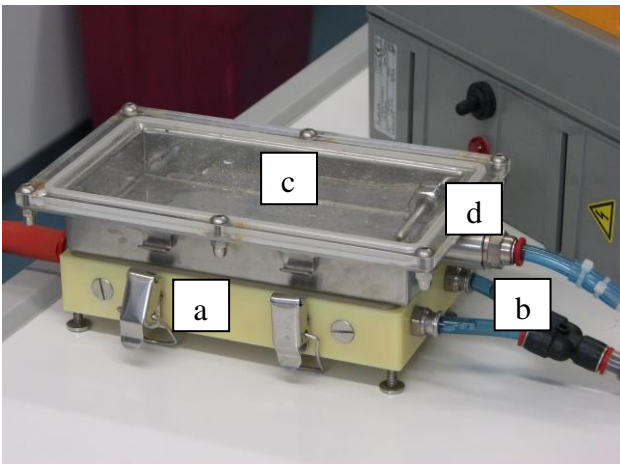
#### **4.4.2 Ugotavljanje intenzitete oprijema celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine materialov za vodovodne sisteme**

Uporabili smo cevi petih izbranih materialov premera od 13 mm do 16 mm. Cevi smo narezali na dolžino približno 40 mm, jih na eni strani zaprli in dodali 5 mL tekočega gojišča YEB, dodatek za rast s cisteinom in 24-urno bakterijsko kulturo v razmerju 1 : 30. Testne cevi smo inkubirali v različnih pogojih: treh izbranih temperaturah (36 °C, 15 °C in 55 °C), v gojišču z dodanim razkužilom dikloroizocianurno kislino in gojišču z dodanim mehčalom natrijevim polifosfatom. Čas inkubacije oz. trajanja posameznega poskusa je bil 120 ur. Ob začetku in potem vsakih 24 ur smo na vseh petih materialih preverjali oprijem bakterij na površine tako, da smo po spiranju neoprijetih bakterijskih celic, dodali barvilo kristal vijolično in nadaljevali po enakem postopku kot pri poskusih na steklenih ploščicah. Po končanem postopku barvanja in spiranja smo zamašek odstranili iz cevi, saj nas je zanimala le količina bakterij, ki se je oprijela na steno cevi. S čitalcem mikrotitrskih ploščic smo izmerili optično gostoto sproščenega barvila. Na vsakem vzorcu materiala smo opravili 9 poskusov, s tremi paralelkami za 5 časov, kar za vsak material pomeni 135 vzorcev. Pri analizi rezultatov izmerjene optične gostote sproščenega barvila smo uporabili povprečno vrednost vseh opravljenih meritev. Ker se notranji premeri posamezne vrste cevi in s tem omočena površina, med seboj nekoliko razlikujejo (od 12,2 cm<sup>2</sup> do 13,2 cm<sup>2</sup>), smo rezultate izmerjene optične gostote sproščenega barvila iz oprijetih celic podali na 10 cm<sup>2</sup>. Kot negativne kontrole smo merili optično gostoto barvila kristal vijolično na ceveh, v katerih smo inkubirali bujon brez bakterijske kulture.

#### **4.4.3 Ugotavljanje oprijema celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine kovinskih ploščic v dinamičnih pogojih in vpliva strižnih sil na njihovo odcepitev**

Na Sliki 5 je prikazan del sistema pretočne komore, v kateri smo izvedli poskuse oprijema in odstranjevanja bakterij s površin. Načrtovanje, razvoj in izdelava sistema je plod sodelovanja skupine raziskovalcev v okviru projekta ARRS ter proizvajalca Iskra Pio, d. o. o.. Sistem je

zgrajen iz dveh delov. Prvi (spodnji) del (a) je narejen iz polietilenskega pladnja s priključkom za zagotavljanje laminarnega toka (b). Zgornji del (c) je snemljiv kovinski pokrov, ki omogoči ustvarjanje turbulentnega toka tekočine, ki priteče skozi dotok (d). Tekočina nato steče skozi več manjših odprtin, pri čemer ustvarimo razmere podobne tušu in s tem ustvarimo turbulentni tok. Pretočna komora ne omogoča izvajanja poskusov na ceveh, zato so nam v Iskra Pio d.o.o. izdelali kovinske ploščice iz nerjavnega jekla v velikosti 2 x 2 cm in debeline 2 mm.



Slika 5: Pretočna komora za ugotavljanje vpliva laminarnega in turbulentnega toka na oprijem in odstranjevanje mikroorganizmov s površin materialov.

Fig. 5: The liquid flow chamber for monitoring the impact of laminar and turbulent flow on the adhesion and detaching of microorganisms from materials surfaces.

V pretočni komori smo izvajali dva poskusa. V prvem smo 18 testnih kovinskih ploščic najprej izpostavili bakterijski kulturi v mikrotitrskih ploščah s 6 utori in inkubirali 72 ur pri temperaturi 36 °C. V vsak utor smo vstavili po eno kovinsko ploščico in dodali 4 mL tekočega gojišča YEB s cisteinom in 24-urno bakterijsko kulturo v enakem razmerju kot pri ostalih poskusih. Po inkubaciji smo 6 ploščic izpostavili laminarnemu toku pufra PBS (1.000 mL) s konstantnim pretokom 20 mL min<sup>-1</sup>, 6 ploščic turbulentnemu toku pufra PBS (1.000 mL) s konstantnim pretokom 1.200 mL min<sup>-1</sup>, 6 pa mirujočemu PBS pufru.

V drugem poskusu smo 15 kovinskih ploščic vstavili v polietilenski pladenj in ugotavljali oprijem bakterijskih celic na površine kovinskih ploščic pri dinamičnih pogojih. Pripravili smo 300 mL bakterijske kulture, ki smo jo s pomočjo peristaltične črpalke črpali preko ploščic s konstantnim pretokom  $20 \text{ mL min}^{-1}$ . Oprijem smo ugotavljali po 24, 48 in 72 urah pri temperaturi inkubacije  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ , za vsak čas na 5 ploščicah. Za primerjavo smo 5 ploščic istočasno gojili v stacionarnih pogojih v inkubatorju.

Za ugotavljanje intenzitete oprijema bakterij na izbrane površine smo v obeh poskusih uporabili enako metodo kot pri poskusih na steklenih ploščicah, povzeto po O'Toole in sod. (1999) in Kubota in sod. (2008), ki smo jo modificirali v sklopu projekta ARRS (Bohinc in sod., 2014) in je opisana v poglavju 4.4.1.

#### **4.5 Analiza rezultatov**

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili programsko orodje R (R Development Core Team, 2012). Razlike med posameznimi spremenljivkami smo analizirali s parnim Studentovim t-testom z dvorepo porazdelitvijo. Glede na namen posamezne analize smo uporabili povprečne vrednosti izbranih spremenljivk bodisi po času inkubacije, po hrapavosti materialov ali glede na pogoje inkubiranja.

Pri rezultatih oprijema na cevi izbranih materialov smo uporabili programsko orodje Graph Pad Prism 6 in za statistično analizo teh rezultatov program za statistično obdelavo podatkov ANOVA. Izrisani grafi imajo obliko okvirja z ročaji. Okvir z ročaji določa 5 točk: minimum in maksimum, kvartile, standardno napako ter osamelec. Spodnji ročaj določata minimalna vrednost, ki ni osamelec in prvi kvartil (Q1), zgornji ročaj določata maksimalna vrednost, ki ni osamelec in tretji kvartil (Q3). Okvir torej določata kvartila Q1ter Q3 (razpon kvartile 25 % in 75 %). Razpon standardne napake je določen 10 : 90. Na sliki smo dodali zgornje in spodnje osamelce, ki so označeni s krožcem. Osamelec je vrednost, ki bistveno odstopa od

večine ostalih vrednosti in v našem primeru predstavlja vrednosti pod 10 oz. nad 90 percentilov. V okvirju je dodana tudi vrednosti mediane in aritmetična sredina. Mediana razdeli števila, razvrščena po velikosti, na dve enaki polovici po številu elementov. Aritmetična sredina je uporabljena srednja vrednost oz. je seštevek vseh vrednosti, razdeljen na skupno število podatkov. Na vrednost aritmetične sredine vplivajo vse vrednosti, kar za mediano ne drži.

Poleg vrednosti log CFU in OD smo analizirali tudi relativno spremembo izbranih naslednjih spremenljivk: spremembe po času, temperaturi, hrapavosti, dodanim sredstvom za razkuževanje vode in dodanim sredstvom za mehčanje vode. Mejo za statistično značilne razlike smo postavili pri  $p < 0,05$  in pri rezultatih z visoko statistično značilno razliko  $p < 0,001$ .

Pri obdelavi podatkov rasti krivulj smo za nekatere podatke izračunali tudi logaritmsko redukcijo po enačbi:

$$\log Reduction = \log_{10}(A) - \log_{10}(B) \quad (3)$$

kjer je (A) število živih bakterijskih celic pred obdelavo in (B) število živih celic po obdelavi. Logaritmsko redukcijo smo izračunali v primerih spremenjene temperature inkubacije (15 °C in 55) ter pri rezultatih, kjer smo bakterijske celice izpostavili razkužilu.

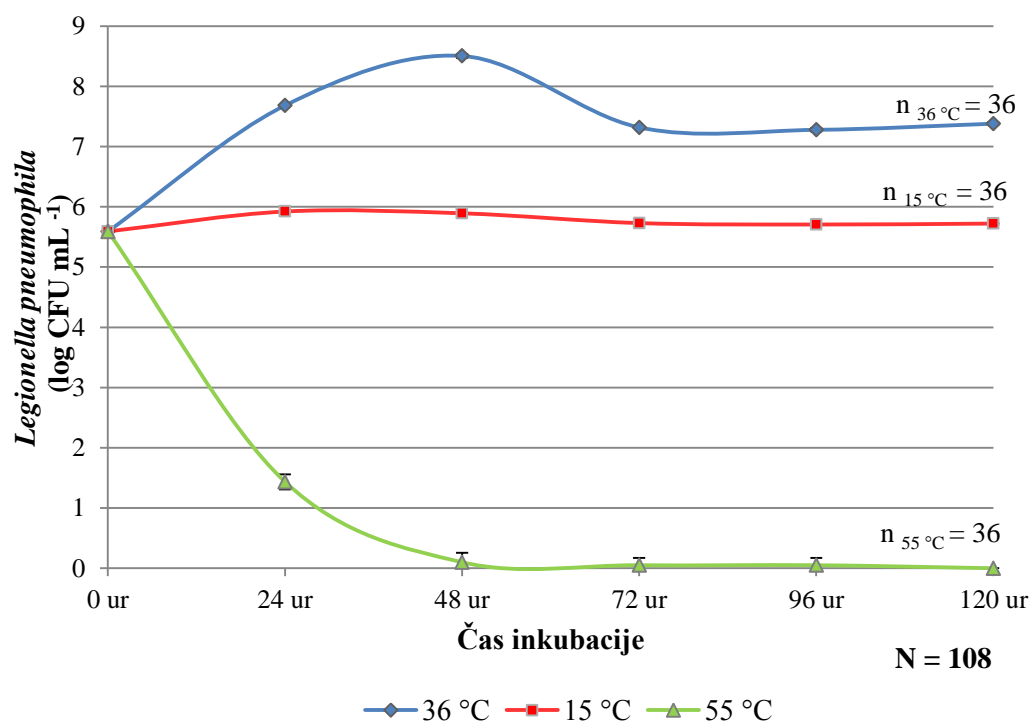
## 5 REZULTATI

### 5.1 Vpliv temperature na razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

Na Sliki 6 so prikazane rastne krivulje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 pri različnih temperaturah inkubacije. Po približno 48 urah so bakterije prešle iz faze logaritemske rasti v stacionarno fazo. Število bakterij je od začetka poskusa do prehoda v stacionarno fazo poraslo za približno 3 log CFU mL<sup>-1</sup>. V naslednjih 24 urah se je število bakterij zmanjšalo za približno 1,2 log CFU mL<sup>-1</sup> in ostalo nespremenjeno naslednjih 48 ur. Pri nižji temperaturi inkubacije (15 °C) se bakterija ni razmnoževala, število bakterij je ostalo skoraj nespremenjeno tudi po 120 urah inkubacije. Pri temperaturi inkubacije 55 °C se je število bakterij po 24 urah zmanjšalo za več kot 4 log CFU mL<sup>-1</sup>, kar predstavlja 4 logaritmsko redukcijo (99,99%). Po 48 urah je na gojišču poraslo le nekaj kolonij (od 0 do 3 CFU mL<sup>-1</sup>), kar pomeni, da je bila dosežena 5 logaritmska redukcija (99,999%).

pH vrednost gojišča se med samim poskusom ni spreminjala (pH = 6,8 ± 0,4).





Slika 6: Rastne krivulje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152, po metodi štetja bakterijskih kolonij, pri treh različnih temperaturah inkubacije.

Fig. 6: *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 growth curve, according to the count method of bacterial colonies at three different incubation temperatures.

Med rezultati števila log CFU bakterijske kulture, inkubirane pri 36 °C, 15 °C in 55 °C, so bile statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 4).

Preglednica 4: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU rasti krivulj bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 pri treh temperaturah inkubacije (36 °C, 15 °C in 55 °C).

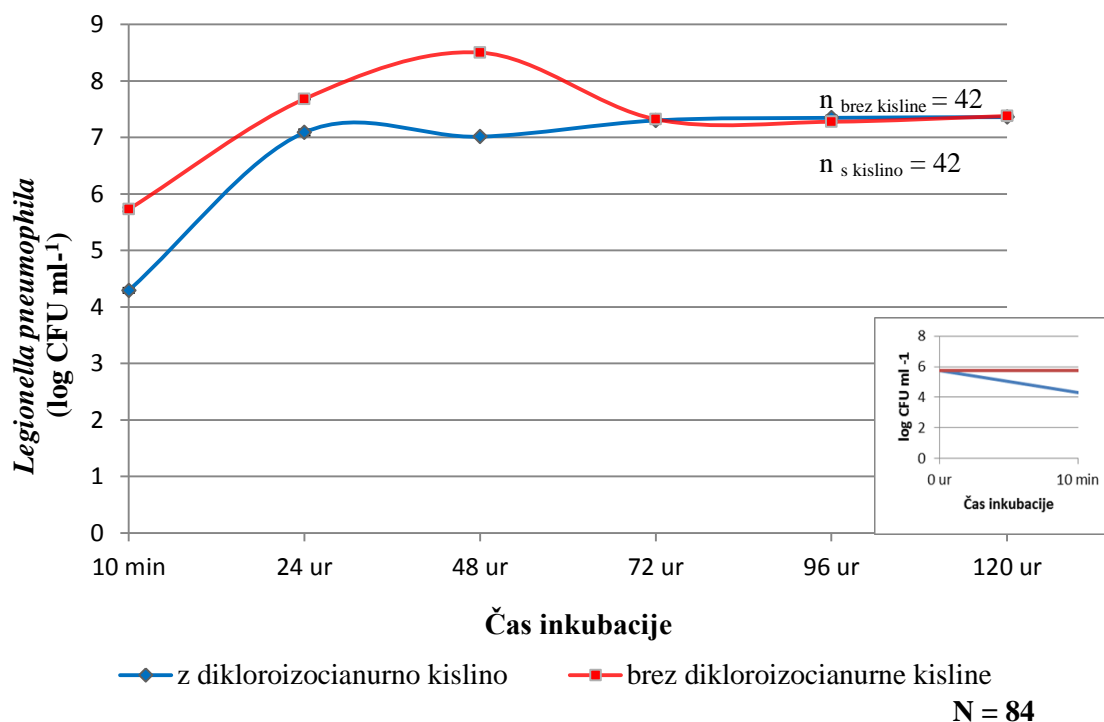
Table 4: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the growth curves *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 at three different incubation temperatures (36 °C, 15° C and 55 °C).

Povprečna vrednost log CFU pri temperaturi inkubacije	Povprečna vrednost log CFU pri temperaturi inkubacije	Razlika log CFU	t-vrednost	p-vrednost
<b>36 °C</b>	<b>15 °C</b>			
7,292591	5,761577	1,5310142	8,172191	$p < 0,05$
<b>36 °C</b>	<b>55 °C</b>			
7,292591	1,231906	6,060685	8,971164	$p < 0,05$
<b>55 °C</b>	<b>15 °C</b>			
1,231906	5,761577	4,529671	8,988930	$p < 0,05$

## 5.2 Vpliv razkužila dikloroizocijanurne kisline na razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

Na Sliki 7 sta prikazani rastni krivulji obravnavane bakterije v gojišču brez dodanega sredstva za razkuževanje in ob dodanem sredstvu dikloroizocijanurna kislina. Sprememba vrednosti pH gojišča je bila ob dodanem sredstvu minimalna, saj se je iz 6,9 znižala le na 6,8. Število bakterij se je v desetih minutah znižalo s 5,7 log CFU mL<sup>-1</sup> na 4,3 log CFU mL<sup>-1</sup>, kar lahko vidimo na manjšem grafu na Sliki 7. Logaritemska redukcija je bila 90 %. Nato je prišlo do intenzivnega razmnoževanja bakterij in v 24 urah je njihovo število že preseglo začetno

vrednost pred dodatkom sredstva za razkuževanje. Po 72 urah inkubacije je bilo število bakterij v obeh gojiščih približno  $7,3 \log \text{CFU mL}^{-1}$  in se ni spreminjalo (Slika 7).



Slika 7: Rastni krivulji bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152, po metodi štetja bakterijskih kolonij, v gojišču z dodano dikloroizocianurno kislino s koncentracijo klora  $17 \text{ mg L}^{-1}$ . Manjša slika znotraj Slike 7 prikazuje zmanjšanje števila bakterij v vzorcu z dodanim razkužilom po desetih minutah izpostavljenosti.

Fig. 7: *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 growth curves, according to the count method of bacterial colonies with the addition of dichloroisocyanuric acid at a chlorine concentration of  $17 \text{ mg L}^{-1}$ . A small picture within the Figure 7 shows the reduction in the number of bacteria in the sample after ten minutes exposure to the disinfectant.

V prvih 72 urah inkubacije smo ugotovili statistično značilno razliko med številom bakterij, ki so bile izpostavljene razkužilu in številom neizpostavljenih bakterij, saj je  $p < 0,05$  (Preglednica 5), čeprav je bilo po 72 urah inkubacije v obeh vzorcih prisotnih približno 7,3 log CFU mL<sup>-1</sup> (Slika 7). O statistično značilni razliki lahko govorimo le v prvih 48 urah inkubacije.

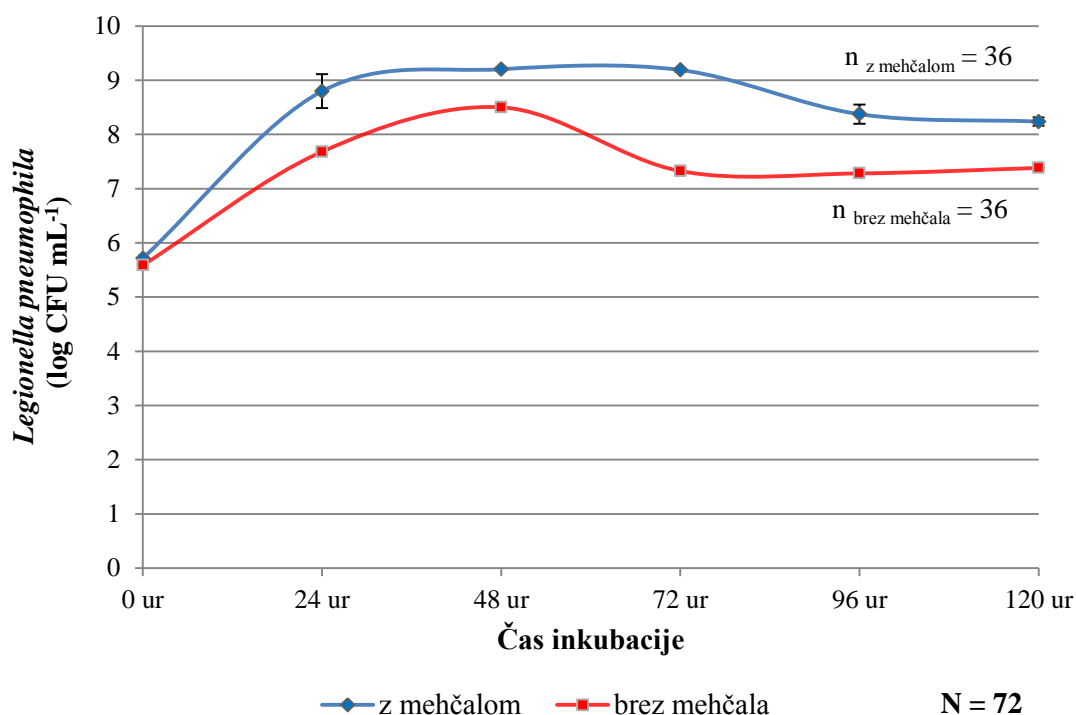
Preglednica 5: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU rastnih krivulj bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 ob dodanem razkužilu dikloroizocianurni kislini

Table 5: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the growth curves *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 with the addition of disinfectant dichloroisocyanuric acids.

Z dodanim razkužilom (log CFU)	Brez dodanega razkužila (log CFU)	Razlika z in brez razkužila (log CFU)	t-vrednost	p-vrednost
6,733816	7,315565	0,581749	-3,63133	$p < 0,05$

### 5.3 Vpliv mehčala natrijevega polifosfata na razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

Na Sliki 8 sta prikazani rastni krivulji obravnavane bakterije v gojišču z dodanim sredstvom za mehčanje vode Microfos SH in rastna krivulja brez dodanega sredstva. Bakterije so se pozitivno odzvale na prisotnost mehčal, saj je bilo njihovo število ob dodanem mehčalu po vseh časih inkubacije večje. Do največje razlike je prišlo po 72 urah inkubacije pri 36 °C, ko je število višje za približno 1,9 log CFU mL<sup>-1</sup>. Tudi po 120 urah inkubacije je bilo število bakterij pri dodanem mehčalu višje kot v gojišču brez dodanih mehčal. Razlika se je zmanjšala na približno 0,8 log CFU mL<sup>-1</sup> (Slika 8). Vrednost pH se ob dodatku mehčal ni spremenila.



Slika 8: Rastni krivulji bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152, po metodi štetja bakterijskih kolonij, v gojišču z in brez dodanega natrijevega polifosfata za mehčanje vode v koncentraciji 5 mg L<sup>-1</sup>.

Fig. 8: *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 growth curve, according to the count method of bacterial colonies with and without the addition of sodium polyphosphate for softening water in a concentration of 5 mg L<sup>-1</sup>.

Med povprečnimi vrednostmi poraslih kolonij na trdnem gojišču ob dodanem sredstvu za mehčanje vode je v primerjavi z rezultati brez dodanega sredstva prisotna statistično značilna razlika, ( $p < 0,001$ ) (Preglednica 6), kar potrjuje rezultate s Slike 8, kjer je razlika v številu bakterij v vzorcih z dodanim sredstvom večje med 0,85 log CFU mL<sup>-1</sup> in največ za 1,86 log CFU mL<sup>-1</sup>.

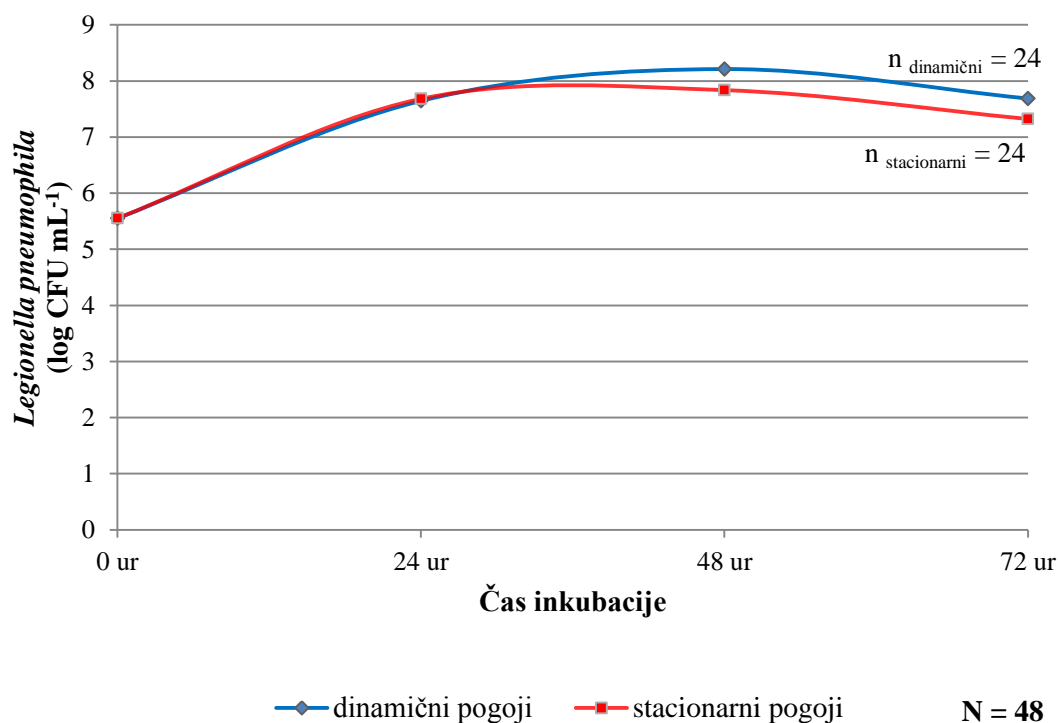
Preglednica 6: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU rastnih krivulj bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 z in brez dodanega mehčala vode natrijevega polifosfata.

Table 6: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the growth curves *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 with and without the addition of chemical agents for water softening, sodium polyphosphate.

Z dodanim mehčalom (log CFU)	Brez dodanega mehčala (log CFU)	Razlika z in brez mehčala (log CFU)	t-vrednost	p-vrednost
8,246851	7,179616	1,067235	7,723197	$p < 0,001$

#### 5.4 Vpliv strižnih sil na razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

Laminarni tok ne vpliva na razmnoževanje bakterij, kot lahko vidimo na Sliki 9. Rastni krivulji gojenja bakterij pri stacionarnih in dinamičnih pogojih sta bili do časa inkubacije 24 ur skoraj enaki, po 48 in 72 urah inkubacije pri temperaturi 36 °C pa je število bakterij pri stacionarnih pogojih manjše za približno 0,4 log CFU mL<sup>-1</sup> (Slika 9).



Slika 9: Rastni krivulji bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 po metodi štetja bakterijskih kolonij v stacionarnih in dinamičnih pogojih (laminarni tok).

Fig. 9: *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 growth curves, determined on the basis of the method of colonies counting the number in static and dynamic conditions (laminar flow).

Na podlagi statistične obdelave podatkov smo potrdili rezultate rastne krivulje na Sliki 9, da dinamični pogoji, v našem primeru laminarni tok, ne vplivajo na razmnoževanje obravnavane bakterije *L. pneumophila*. Med rezultati povprečnih vrednosti logaritemskega števila bakterijskih kolonij, ki so porasle na trdnih gojiščih v enih in drugih pogojih, namreč ne obstaja statistično značilna razlika ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 7).

Preglednica 7: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik v log CFU vpliva dinamičnih (laminarni tok) in stacionarnih pogojev na razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152.

Table 7: Statistical analysis of average values and differences in log CFU of the impact of dynamic (laminar flow) and static conditions on the growth of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152.

Povprečna vrednost log CFU pri laminarnem toku	Povprečna vrednost log CFU pri stacionarnih pogojih	Razlika log CFU med laminarnimi in stacionarnimi pogoji	t-vrednost	p-vrednost
7,847655	7,613200	0,234455	1,422581	$p > 0.05$

### 5.5 Rezultati meritev elektroforetske mobilnosti in hidrofobnosti bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

Rezultati meritev elektroforetske mobilnosti bakterij kažejo negativni površinski naboj bakterijskih celic. Povprečna vrednost zeta potenciala bakterij po desetih opravljenih meritvah je  $-39,24 \text{ mV} \pm 0,63$ .

Povprečna stopnja hidrofobnosti je bila približno 43 % (Preglednica 8). Bakterija *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 je hidrofilna, ker je stopnja hidrofilnosti manjša od 50 %.



Preglednica 8: Rezultati meritev bakterijske adherence za ogljikovodike pri določanju stopnje hidrofobnosti bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152.

Table 8: The results of the tests of bacterial adherence to hydrocarbons for *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152, to determine the degree of hydrophobicity.

Material	Rezultati meritev (OD pri 620 nm)
Absorbanca fosfatnega pufra ( $A_0$ )	0,0409
Absorbanca vodne bakterijske suspenzije pred dodatkom ksilena ( $A_i$ )	0,11135
Absorbanca vodne bakterijske suspenzije po dodatku ksilena ( $A_f$ )	0,0633
<b>REZULTAT – stopnja hidrofobnosti</b>	<b>43 %</b>

### 5.6 Rezultati meritev hrapavosti površin za oprijem bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

V Preglednici 9 so prikazani rezultati meritev hrapavosti materialov za vodovodne sisteme, ki smo jih uporabili v raziskavi. Izmerjene so bile vrednosti  $R_a$ ,  $R_z$  in  $R_q$ ; prikazane so vrednosti  $R_a$ , saj predstavljajo vsoto valovitosti in hrapavosti (globino reliefa). Pri večini materialov je bila povprečna hrapavost manjša od 1  $\mu\text{m}$ , odstopala je pocinkana litoželezna cev (Zn) s povprečno hrapavostjo 2,2  $\mu\text{m}$ .

Preglednica 9: Rezultati meritev hrapavosti materialov (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev), izmerjene s profilometrom.

Table 9: The results of materials roughness measurements (PP-R: polypropylene tube, Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube, Cu: copper tube, Zn: galvanized tube), measured using profilometer.

Material	Povprečna vrednost hrapavosti ( $\mu\text{m}$ )*
Steklene ploščice (obdelane)	5,8
Steklene ploščice (neobdelane)	0,7
Kovinske ploščice (brušene)	9,9
PP-R	0,3
Pex-Al-Pex	0,2
PE	0,5
Cu	0,1
Zn	2,2

\*Za vsako vrsto materiala so bile opravljene tri meritve hrapavosti, v tabeli so prikazane povprečne vrednosti.

### 5.7 Rezultati meritev mejnega kota površin za oprijem bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152

Z meritvami mejnega kota kapljice vode na izbrane površine smo določili hidrofobnost površin uporabljenih materialov. Ugotovili smo, da so vsi materiali hidrofilni, saj je mejni kot manjši od  $90^\circ$ . Pri materialih, ki se uporabljajo za vodovodne sisteme, so bile razlike majhne, saj je bil na ceveh najmanjši mejni kot  $68^\circ$  pri materialu PP-R, največji pa pri materialu Pex-Al-Pex,  $76^\circ$ . Najmanjši mejni kot med vsemi uporabljenimi materiali je bil pri gladkih, neobdelanih steklenih ploščicah (Preglednica 10).

Preglednica 10: Rezultati meritev mejnega kota kapljice vode na površini za določitev hidrofobnosti izbranih materialov (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multialpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev).

Table 10: The results of contact angles measurements of a water drop on the surface to determine the hydrophobicity of selected materials (PP-R: polypropylene tube, Pex-Al-Pex: multialpex tube, PE: polyethylene tube, Cu: copper tube, Zn: galvanized tube).

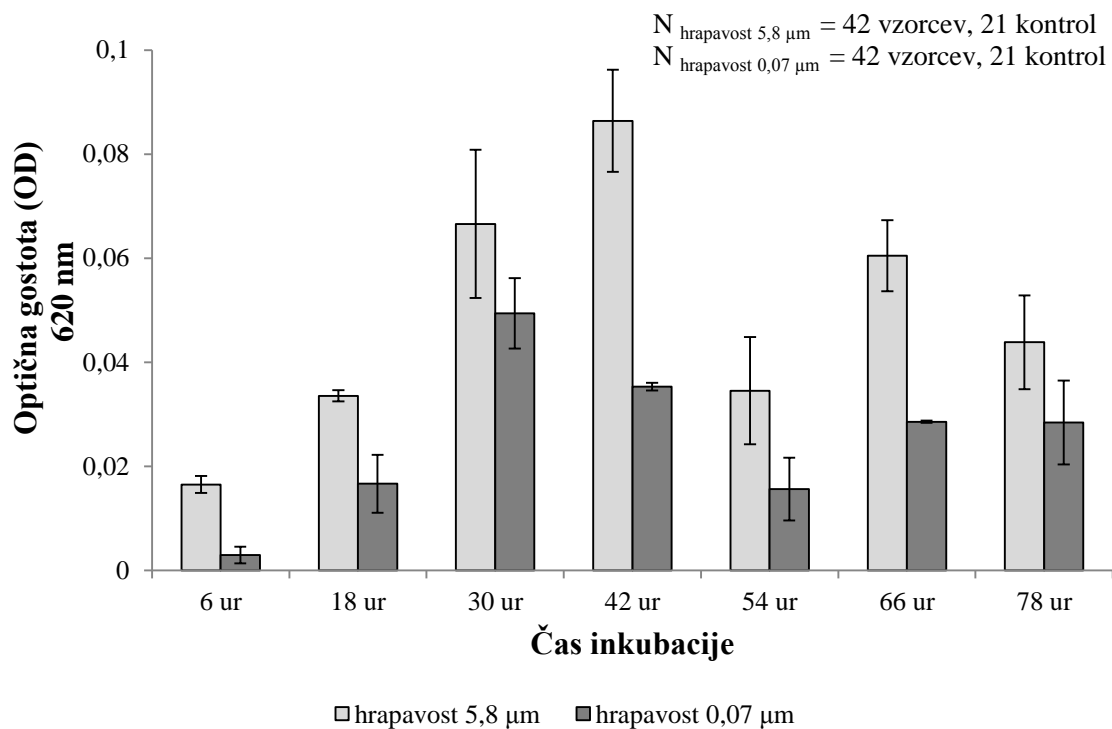
Material	Povprečna vrednost meritev mejnega kota (°)*
Steklene ploščice (obdelane)	46
Steklene ploščice (neobdelane)	28
Kovinske ploščice (brušene)	74
PP-R	68
Pex-Al-Pex	76
PE	72
Cu	72
Zn	75

\*Za vsako vrsto materiala so bile opravljene tri meritve mejnega kota, v tabeli so prikazane povprečne vrednosti.

## **5.8 Oprijem bakterijskih celic na površine**

### **5.8.1 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 36 °C**

Preučevanje oprijema bakterije *L. pneumophila* na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 36 °C je pokazalo, da je bil oprijem na neobdelanih, gladkih steklenih ploščicah (hrapavost 0,07 µm) manjši kot na steklenih ploščicah večje hrapavosti (hrapavost 5,8 µm). Razlika v OD, merjeni pri 620 nm je bila pri večini meritev med 0,013 in 0,018. Odstopala sta rezultata oprijema celic pri 42 urah inkubacije, ko je bila razlika med hrapavimi in gladkimi ploščicami 0,051, in pri času 66 ur, ko je bila razlika 0,031. Intenziteta oprijema se je s časom spreminjala in je bila največja po 42 urah izpostavljenosti ploščic bakterijski kulturi, nato je sledilo zmanjšanje števila bakterij na ploščicah pri 54 urah in nato ponovno povečanje po 66 urah inkubacije (Slika 10).



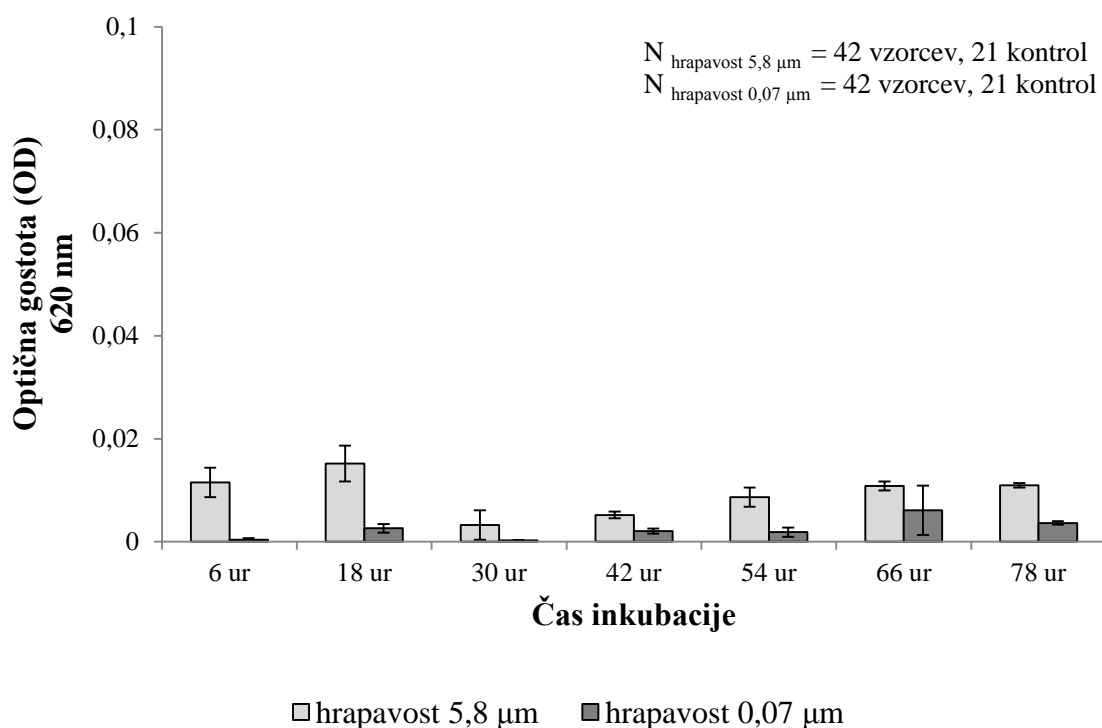
Slika 10: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na steklene ploščice dveh hrapavosti (hrapave 5,8 µm in gladke 0,07 µm) pri temperaturi inkubacije 36 °C.

Fig. 10: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) to glass plates of two different surface roughnesses (rough plates 5.8 µm and untreated plates 0.07 µm) at the incubation temperature of 36 °C.

### 5.8.2 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 15 °C

Intenzivnost oprijema bakterij na steklene ploščice smo ugotavljali tudi pri temperaturi 15 °C. Optična gostota je bila pri vseh časih inkubacije manjša od 0,02 (Slika 11). Pri temperaturi inkubacije 36 °C smo tako nizko vrednost izmerili le v štirih primerih, vse ostale vrednosti so bile večje in so dosegle vrednost nad 0,08 (Slika 10). Najmanjša razlika pri bolj hrapavih

ploščicah je bila pri času inkubacije 6 ur in je znašala 0,005, največja pa pri času 42 ur, ko je znašala 0,08. Razlike med oprijemom na ploščice dveh različnih hrapavosti so bile pri temperaturi inkubacije 15 °C majhne. Najmanjša razlika (0,003) je bila pri času 18 ur in 30 ur, največja (0,01) pa po 6 urah. Tudi pri temperaturi inkubacije 15 °C je bil oprijem bakterijskih celic večji na bolj hrapavih površinah.

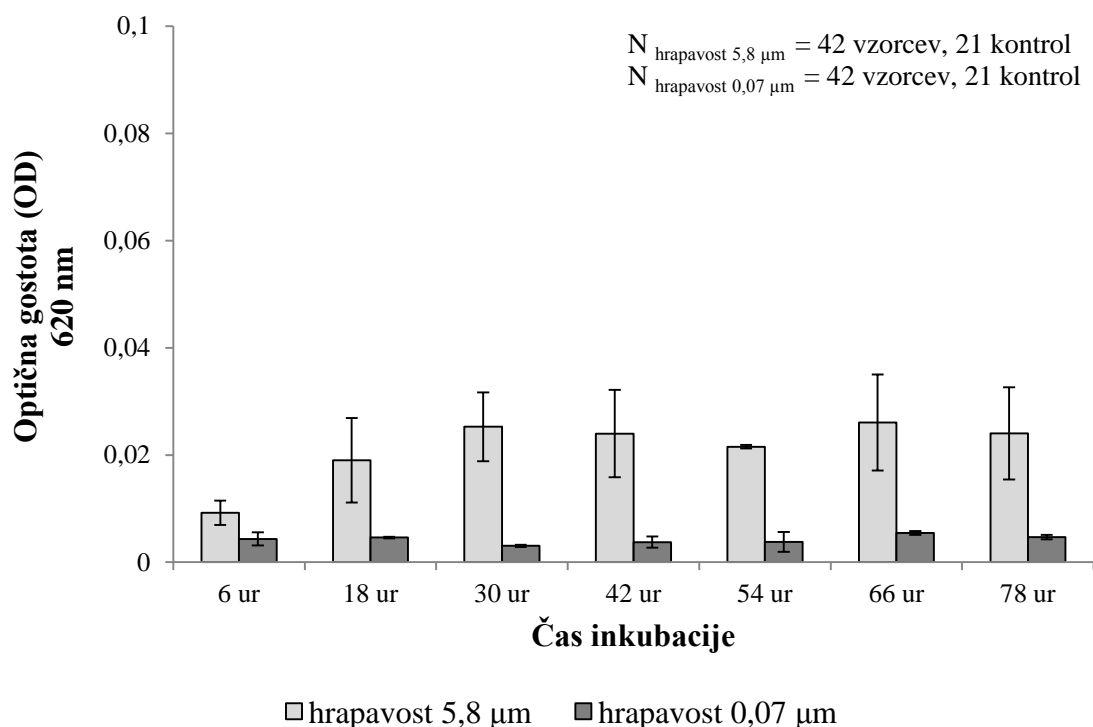


Slika 11: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na steklene ploščice dveh hrapavosti (hrapave 5,8 µm in gladke 0,07 µm), pri temperaturi inkubacije 15 °C.

Fig. 11: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) to glass plates of two different surface roughnesses (rough plates 5.8 µm and untreated plates 0.07 µm) at the incubation temperature of 15 °C

### **5.8.3 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na steklene ploščice pri temperaturi inkubacije 55 °C**

Rezultati rastne krivulje pri temperaturi inkubacije 55 °C kažejo na odmiranje bakterij, saj je bilo po 48 urah inkubacije v vzorcih le od 0 do 3 CFU mL<sup>-1</sup> bakterij (Slika 6). Nekaj mikroorganizmov se je kljub temu oprijelo površine steklenih ploščic (Slika 12). Oprijem bakterij je bil tudi v tem primeru na bolj hrapavih ploščicah večji. Največja razlika (0,022) med oprijemom na hrapave in gladke ploščice je bila pri času inkubacije 30 ur, najmanjša pa po 6 urah (0,005). Oprijem bakterij pri tej temperaturi je bil manjši, kot pri temperaturi 36 °C. Razlika med izmerjeno optično gostoto sproščenega barvila pri temperaturi 36 °C in 55 °C je bila najmanjša po 6 urah inkubacije in je znašala 0,012, največja pa je bila po 42 urah inkubacije, znašala je 0,08, in sicer na bolj hrapavih ploščicah. Ugotovili smo tudi, da je bil oprijem pri 55 °C večji, v primerjavi z rezultati oprijema pri 15 °C, razen pri času inkubacije 6 ur. Razlika je bila v povprečju 0,014. Največja je bila na hrapavih ploščicah pri času inkubacije 30 ur (0,022).



Slika 12: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na steklene ploščice dveh hrapavosti (hrapave 5,8 µm in gladke 0,07 µm) pri temperaturi inkubacije 55 °C.

Fig. 12: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) to glass coupons of two different surface roughnesses (rough coupons 5.8 µm and untreated coupons 0.07 µm) at the incubation temperature of 55 °C.

Povprečna vrednost izmerjene optične gostote pri bolj hrapavih ploščicah je bila večja kot pri neobdelanih. Intenzivnost oprijema je bila v pozitivni odvisnosti s povečanjem hrapavosti površin pri vseh treh temperaturah inkubacije, razlika je bila statistično značilna ( $p < 0,05$ ), kar je razvidno iz Preglednice 11.



Preglednica 11: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic pri treh različnih temperaturah inkubacije na steklenih ploščicah dveh različnih hrapavosti.

Table 11: Statistical analysis of average values and differences in measuring optical density (OD) of crystal violet dye at three different temperatures and two different surface roughnesses of glass coupons.

Temperatura inkubacije	Povprečne vrednosti OD pri hrapavosti 5,8 $\mu\text{m}$	Povprečne vrednosti OD pri hrapavosti 0,07 $\mu\text{m}$	Razlika povprečnih vrednosti OD med ploščicami dveh hrapavosti	t-vrednost	p-vrednost
36 °C	0,050232	0,025443	0,024789	4,564115	$p < 0,05$
15 °C	0,009779	0,002421	0,007357	5,164319	$p < 0,05$
55 °C	0,021525	0,004229	0,017296	7,489543	$p < 0,001$

Razlika med rezultati optične gostote na ploščicah hrapavosti 5,8  $\mu\text{m}$  pri različnih temperaturah inkubacije je v vseh treh primerih statistično značilna ( $p < 0,05$ ). Razlika v oprijemu celic je bila večja med temperaturama 36 in 15 °C ter 36 in 55 °C (Preglednica 12).

Preglednica 12: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) pri treh različnih temperaturah inkubacije sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic na steklenih ploščicah hrapavosti 5,8  $\mu\text{m}$ .

Table 12: Statistical analysis of average values and differences in measuring optical density (OD) of crystal violet dye at different incubation temperatures on a glass coupon with a roughness of 5.8  $\mu\text{m}$ .

Temperatura inkubacije	Povprečna vrednost OD	Povprečna vrednost OD	Razlika povprečnih vrednosti OD	t-vrednost	p-vrednost
36 in 15 °C	0,050232	0,009779	0,040454	3,99160	$p < 0,05$
36 in 55 °C	0,050232	0,021525	0,028707	3,92100	$p < 0,05$
15 in 55 °C	0,009779	0,021525	0,011746	-3,63997	$p < 0,05$

Temperatura inkubacije vpliva na oprijem tudi pri manj hrapavih materialih, saj smo v vseh treh primerih izračunali statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 13).

Preglednica 13: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) pri treh različnih temperaturah inkubacije sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic na steklenih ploščicah hrapavosti 0,07  $\mu\text{m}$ .

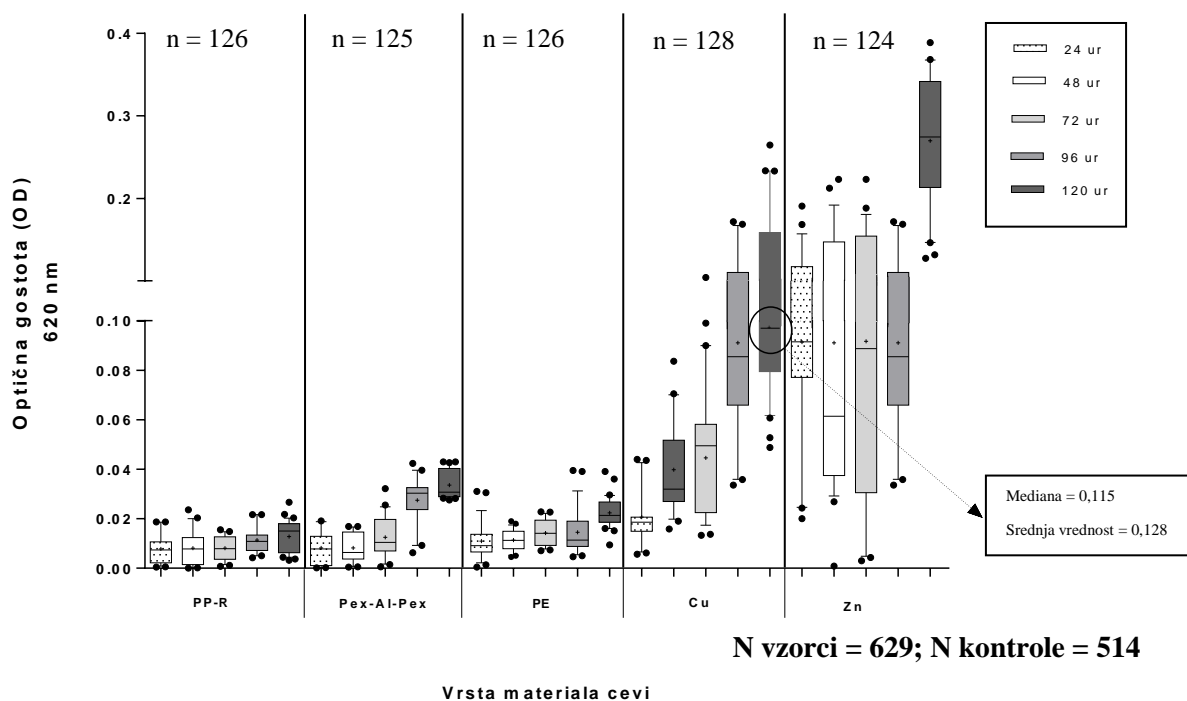
Table 13: Statistical analysis of average values and differences in measuring optical density (OD) of crystal violet dye at different incubation temperatures on glass coupons with a roughness of 0.07  $\mu\text{m}$ .

Temperatura inkubacije	Povprečna vrednost OD	Povprečna vrednost OD	Razlika povprečnih vrednosti OD	t-vrednost	p-vrednost
36 in 15 °C	0,025443	0,002421	0,023021	3,97936	$p < 0,05$
36 in 55 °C	0,025443	0,004229	0,021214	3,59675	$p < 0,05$
15 in 55 °C	0,002421	0,004229	0,001807	-3,25484	$p < 0,05$

#### **5.8.4 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine cevi pri temperaturi 36 °C pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur)**

Vsi rezultati oprijema na površine cevi petih materialov (Slike 13, 14, 15, 17, 18) imajo Y os razdeljeno na dva dela zaradi velikih razlik med rezultati oprijema na umetnih materialih in kovinskih materialih. Za tak prikaz smo se odločili zaradi nazornejšega prikaza rezultatov.

Rezultati na Sliki 13 prikazujejo oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na različne materiale pri temperaturi inkubacije 36 °C. Na ceveh iz umetnih materialov PP-R, Pex-Al-Pex in PE je prišlo do manjšega oprijema bakterij kot na ceveh iz kovinskih materialov. Največjo optično gostoto sproščenega barvila kristal vijolično in s tem največji oprijem bakterijskih celic smo izmerili na pocinkanih ceveh (Zn) že po 24 urah inkubacije (0,091), kar je več kot pri večini ostalih materialov tudi po 120 urah. Vrednost optične gostote 0,1 sproščenega barvila je bila presežena le še pri Cu ceveh, vendar šele po 120 urah inkubacije.

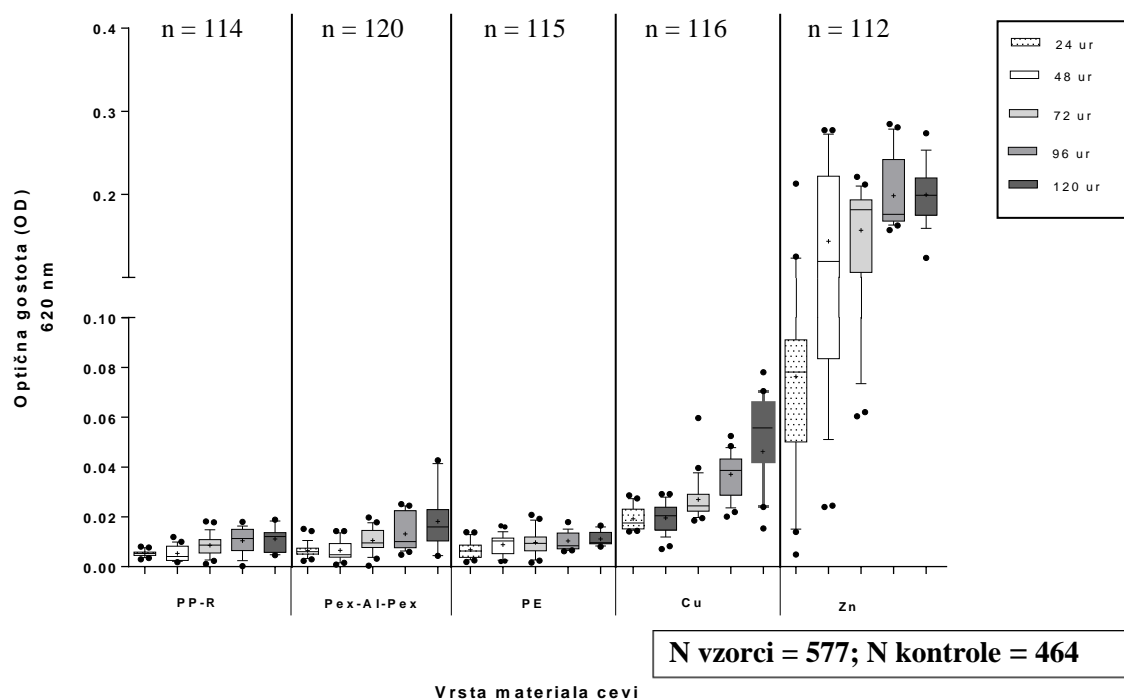


Slika 13: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) pri temperaturi inkubacije 36 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike.

Fig. 13: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) at the incubation temperature of 36 °C. The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots.

### **5.8.5 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine cevi pri temperaturi 15 °C pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur)**

Oprijem na površine pri temperaturi inkubacije 15 °C, izražen v optični gostoti sproščenega barvila kristal vijolično, se je s časom povečeval pri vseh materialih. Daleč največji je bil na Zn ceveh, kjer je bila izmerjena optična gostota že po 24 urah 0,078. Pri vseh ostalih materialih izmerjena optična gostota ni presegla te vrednosti niti po petih dneh inkubacije. Najbolj se je približala pri Cu ceveh in dosegla vrednost 0,053. Največji oprijem pri temperaturi 15 °C je bil na Zn ceveh po 120 urah inkubacije in je dosegel vrednost 0,199. Najmanjši oprijem je bil pri PE ceveh, saj je bil tudi po 120 urah le 0,011 (Slika 14). Oprijem bakterijskih celic na površine pri temperaturi inkubacije 15 °C je bil manjši (Slika 14) kot pri optimalnih pogojih (Slika 13), kar dokazuje tudi statistična analiza rezultatov (Priloga A). Najmanjše razlike, od 0,002 do 0,015, so bile pri vseh materialih ob prvi meritvi, to je po 24 urah. Največja razlika v izmerjeni optični gostoti sproščenega barvila je bila pri Cu ceveh po 120 urah inkubacije (0,11), saj je bila pri temperaturi 36 °C 0,129, pri temperaturi 15 °C pa le 0,053.



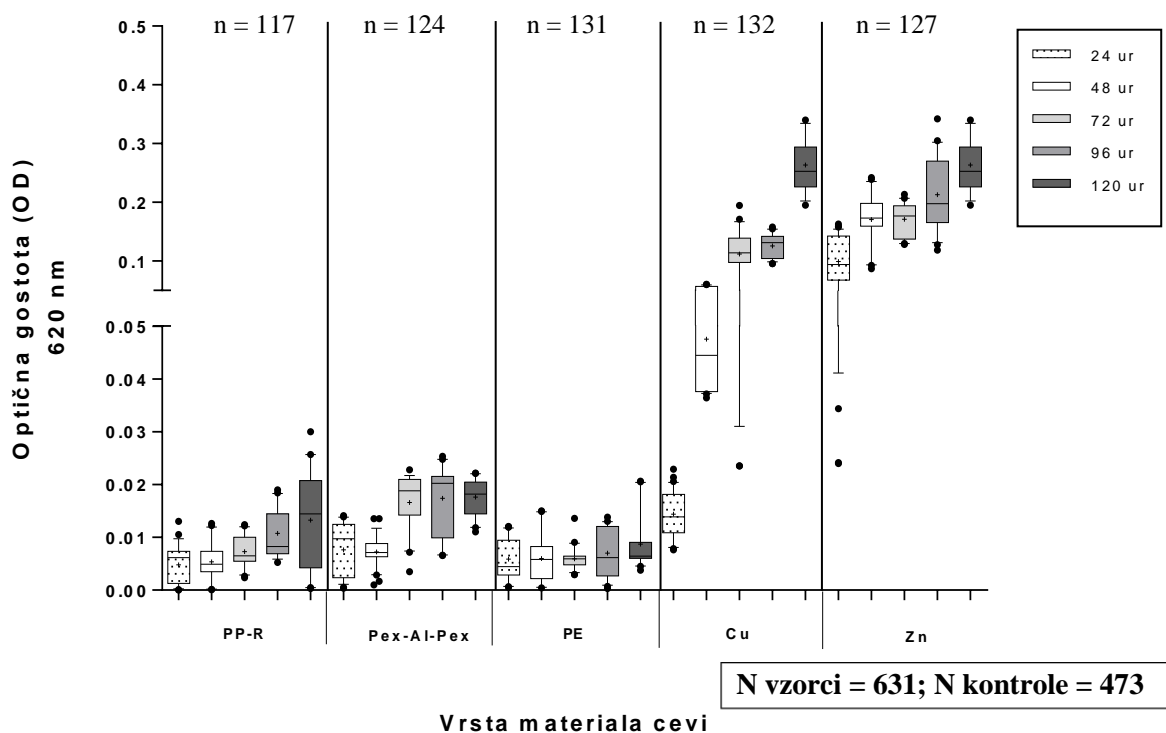
Slika 14: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) pri temperaturi inkubacije 15 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike.

Fig. 14: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) at the incubation temperature of 15 °C. The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots.

### **5.8.6 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine cevi pri temperaturi 55 °C pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur)**

Oprijem na cevi oz. izmerjena optična gostota na površinah iz umetnih materialov, je bila tudi pri temperaturi 55 °C občutno manjša kot na ceveh kovinskih materialov. Najbolj odstopajo rezultati oprijema na površino PE cevi, kjer je bil po 24 urah 0,006 in se s časom skorajda ni spreminjal, saj je bila optična gostota po 120 urah le 0,009. Največji oprijem je bil pri Zn ceveh in je bil že po 24 urah 0,099.

Primerjava rezultatov med temperaturo inkubacije 36 °C in 55 °C (Slika 13 in 15) je pokazala minimalne razlike v količini sproščenega barvila iz predhodno obarvanih celic. Pri ceveh kovinskih materialov so bile vrednosti celo večje pri temperaturi 55 °C. Največje razlike v prid višji temperaturi inkubacije so bile prisotne pri Zn ceveh po 48 in 72 urah (0,079), kljub temu da je bilo število kolonij, poraslih na trdnih gojiščih, pri temperaturi inkubacije 55 °C, med 0 in 3 CFU mL<sup>-1</sup> (Slika 6).



Slika 15: Oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) pri temperaturi inkubacije 55 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike.

Fig. 15: The adhesion *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) at the incubation temperature of 55 °C. The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots.

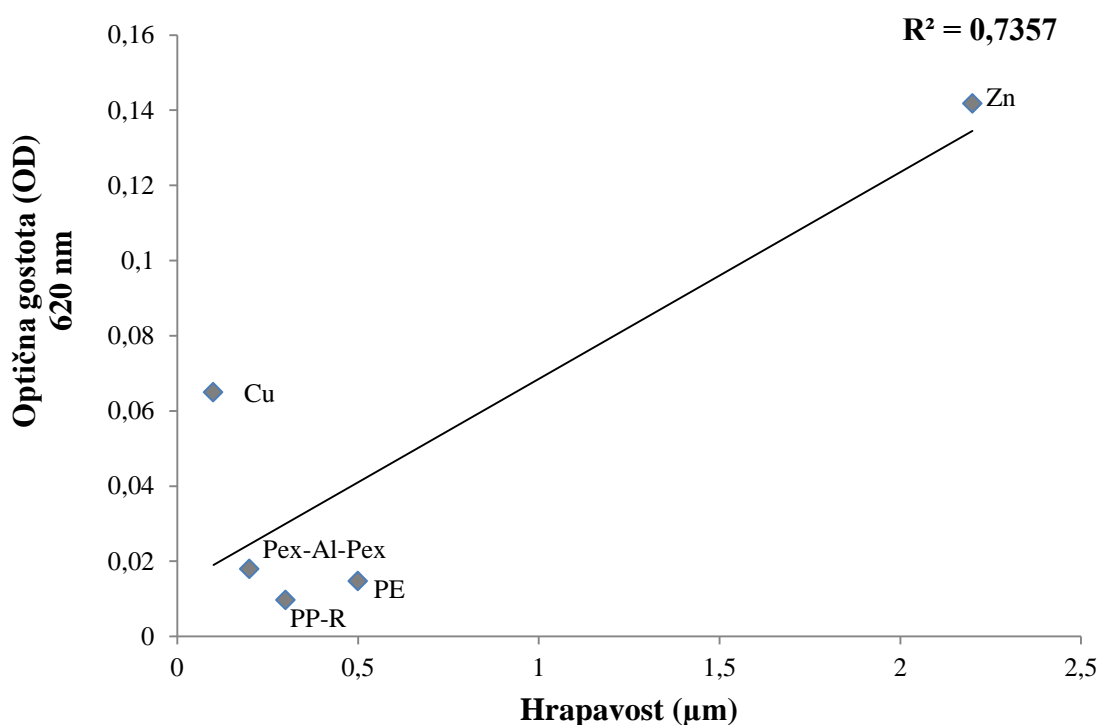


Analiza rezultatov je pokazala statistično značilno razliko pri temperaturi 15 °C in 36 °C med optično gostoto v primeru Zn cevi po treh časih inkubacije (48 ur, 72 ur, 120 ur), kar pomeni manjši oprijem pri 36 °C. Pri ostali materialih je bil oprijem pri temperaturi 15 °C manjši ( $p > 0,05$ ). Na PP-R ceveh v nobenem primeru temperatura ni vplivala na oprijem, saj je pri vseh časih inkubacije  $p > 0,05$  (Priloga A).

Pri temperaturi inkubacije 55 °C smo izračunali statistično značilno razliko  $p < 0,05$  v primeru Zn cevi pri treh časih inkubacije in pri materialu Cu pri dveh časih, kar pomeni, da je bil oprijem pri 55 °C večji kot v primeru 36 °C. Vse ostale statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so bile pozitivne in predstavljajo občutno manjši oprijem pri višji temperaturi (Priloga B).

#### **5.8.7 Primerjava rezultatov oprijema celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 pri treh temperaturah inkubacije na površine cevi v odvisnosti od hrapavosti materialov**

Na Sliki 16 so prikazani rezultati povprečnih vrednosti OD sproščenega barvila oprijetih bakterijskih celic *L. pneumophila* v odvisnosti od hrapavosti uporabljenih materialov, pri temperature inkubacije 36 °C. Rezultati kažejo, da je v večini primerov oprijem celic na material odvisen od hrapavosti površin ( $R^2 = 0,7357$ ). Močno odstopajo rezultati na Cu ceveh, ki so najbolj gladke od vseh uporabljenih materialov, hkrati je pa oprijem drugi najintenzivnejši.

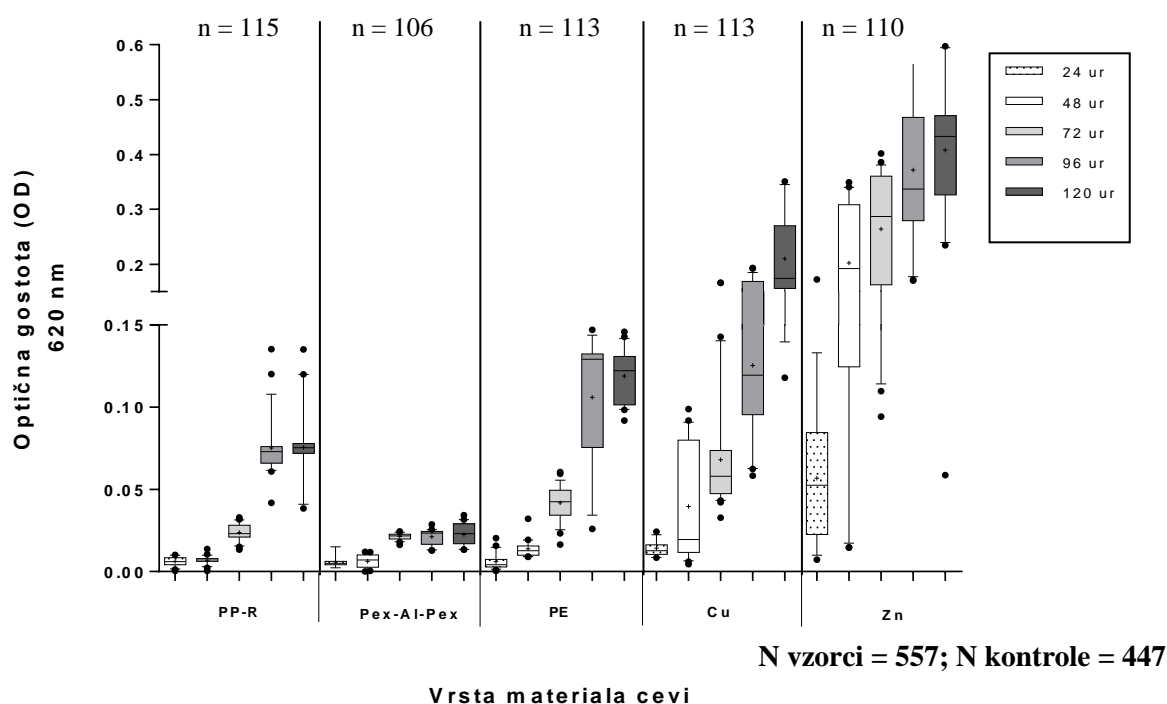


Slika 16: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) v odvisnosti od hrapavosti materialov pri temperaturi inkubacije 36 °C.

Fig. 16: The average values of the adhesion *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube, Pex-Al-Pex: multidalpex tube, PE: polyethylene tube, Cu: copper tube, Zn: galvanized tube) depending on the roughness of the material at the incubation temperature of 55 °C.

### **5.8.8 Oprijem bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine cevi z dodanim razkužilom dikloroizocianurno kislino pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur)**

Na Sliki 17 so prikazani rezultati poskusov, pri katerih smo gojišču z bakterijo, mediju dodali dikloroizocianurno kislino v koncentraciji klora 17 mg L<sup>-1</sup>. Najvišjo optično gostoto sproščenega barvila smo tudi v teh poskusih izmerili na ceveh kovinskih materialov. Na Zn ceveh je po 120 urah inkubacije dosegla vrednost 0,408, kar je za 0,138 več kot v mediju brez dodanega razkužila. Podobno je bilo zaznati pri vseh materialih pri daljšem času inkubacije, to je predvsem po 96 in 120 urah inkubacije. Rezultati so odstopali le pri materialu Pex-Al-Pex, kjer so bile izmerjene vrednosti optične gostote sproščenega barvila večje v mediju brez razkužila.



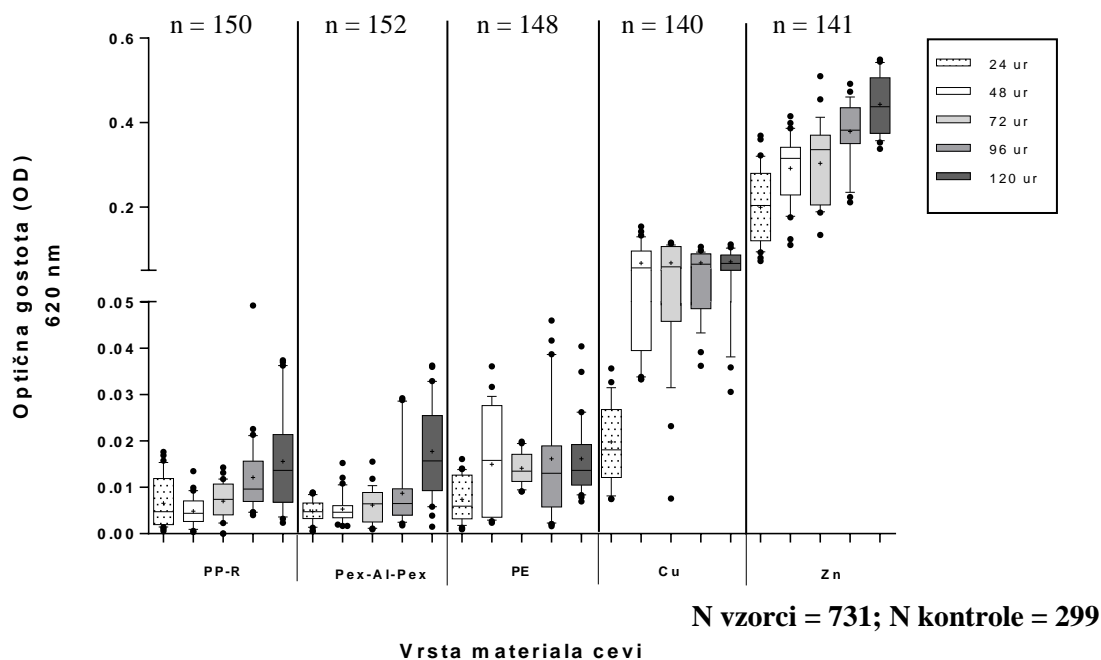
Slika 17: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) z dodano dikloroizocianurno kislino v koncentraciji klora  $17 \text{ mg L}^{-1}$  pri temperaturi inkubacije  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike.

Fig. 17: The adhesion of *pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) with the addition of dichloroisocyanuric acid at a chlorine concentration of  $17 \text{ mg L}^{-1}$  at an incubation temperature of  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ . The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots.

Dikloroizocianurna kislina je pozitivno vplivala na oprijem bakterijskih celic le v nekaterih primerih, saj smo pozitivno statistično značilno razliko v izmerjeni optični gostoti obarvanih oprijetih bakterijskih celic ( $p < 0,05$ ) izračunali v 13 primerih od skupaj 25 (Priloga C). Večji oprijem je bil pri vseh materialih prisoten le po času inkubacije 72 ur. Po 96 in 120 urah inkubacije je bil oprijem večji pri vseh materialih, razen pri ceveh Pex-Al-Pex. Po 24 urah inkubacije je bil oprijem pri dodanih mehčalih manjši kot brez mehčal, in to precej manj, zato je v tabeli pri treh materialih prisotna statistično značilna razlika  $p < 0,05$ , vendar je razlika v OD negativna.

#### **5.8.9 Oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine cevi z dodanim mehčalom natrijevim polifosfatom pri petih časih inkubacije (24, 48, 72, 96 in 120 ur)**

Najvišjo količino sproščenega barvila kristal vijolično smo tudi tukaj izmerili pri Zn ceveh že po 24 urah (0,199), kar je za kar 0,108 več kot pri enakem času brez dodanega sredstva. Po 120 urah inkubacije je dosegla vrednost 0,443, kar je za 65 % več kot pri pogojih brez dodanega sredstva. Pri umetnih materialih PE, Pex-Al-Pex in PP-R je imelo mehčalo manjši vpliv na oprijem bakterijskih celic, saj je bil oprijem večji le pri materialu PP-R po 96 urah inkubacije ter pri materialu PE po 48 in 96 urah inkubacije. Pri ceveh Cu je bila optična gostota sproščenega barvila po 24 urah 0,020, nato se je povečala v naslednjih 24 urah na 0,067 in se do konca poskusa (po 120 urah) skoraj ni več spremenila (Slika 18).



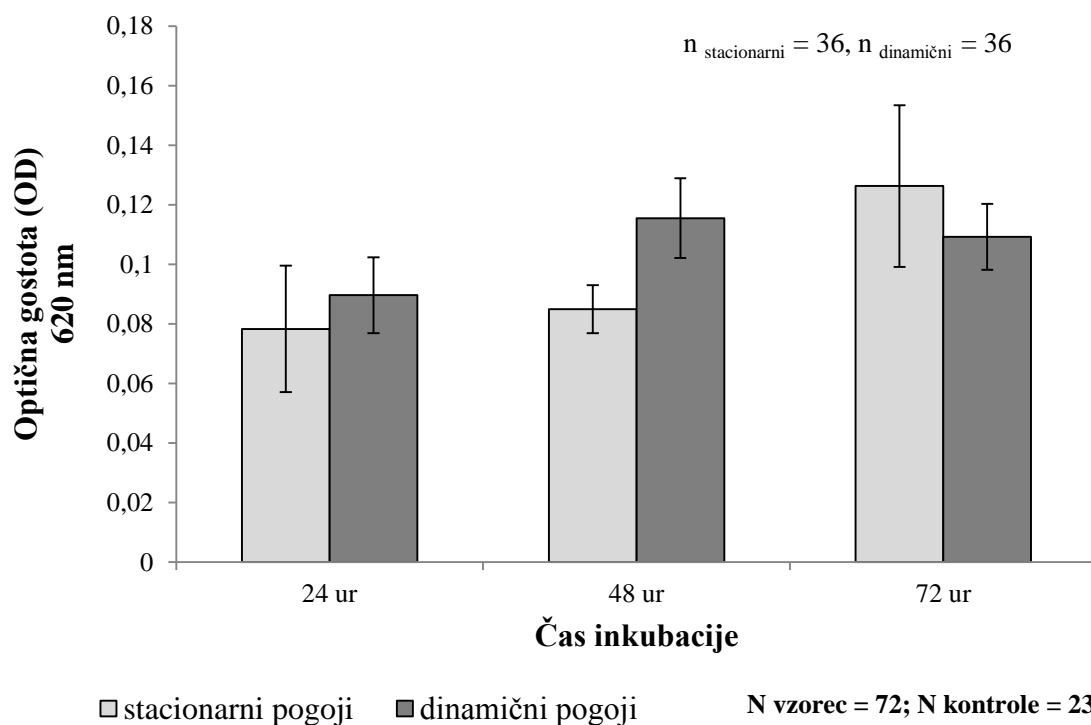
Slika 18: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na različne materiale (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev) z dodanim sredstvom za mehčanje vode natrijevim polifosfatom pri temperaturi inkubacije 36 °C. Mediana je prikazana z vodoravno črto v vsakem polju, medtem ko + označuje srednjo vrednost. Meja okvirjev je določena s 1. in 3. kvartilom (25 in 75 %), ročaji nad in pod okvirjem kažejo 90 in 10 percentilov. Osamelci so prikazani kot pike.

Fig. 18: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) to different surfaces (PP-R: polypropylene tube; Pex-Al-Pex: multidalpex tube; PE: polyethylene tube; Cu: copper tube; Zn: tinned tube) with the addition of sodium polyphosphate for softening water. The median value is shown as a horizontal line within each box, while the + marks the mean. The boundary of the box is determined by the frames with 1<sup>st</sup> and 3<sup>th</sup> quartile (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentiles. The outliers are shown as dots.

V Prilogi D so prikazani rezultati statistične obdelave podatkov vpliva mehčala na oprijem bakterijskih celic na površine. Negativno statistično značilno razliko v izmerjeni optični gostoti obarvanih oprijetih bakterijskih celic ( $p < 0,05$ ), ki predstavlja večji oprijem na površine ob dodatku mehčala, smo izračunali pri materialu Zn pri vseh petih časih inkubacije in pri materialu Cu po času inkubacije 48 in 72 ur. Pri ostalih materialih je bil oprijem ob dodanem mehčalu sicer večji še pri PE ceveh po 48 in 96 urah inkubacije ter pri PP-R ceveh po 96 urah, vendar je v primerjavi z oprijemom brez dodanega mehčala razlika tako majhna, da ni statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ).

#### **5.8.10 Vpliv laminarnega toka na oprijem celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 na površine kovinskih ploščic**

Po 24 in 48 urah inkubacije je bil oprijem celic na površine, izražen kot optična gostota sproščenega barvila kristal vijolično, večji pri dinamičnih pogojih. V stacionarnih pogojih je bila izmerjena optična gostota ob vsaki meritvi višja. Po 24 urah je bila 0,078, po 48 urah 0,085, po 72 urah inkubacije pa je narasla na 0,126. Tudi v laminarnih pogojih je optična gostota naraščala do analize po 48 urah, po 72 urah inkubacije pa je optična gostota padla pod nivo optične gostote v stacionarnih pogojih, in sicer na 0,109. Po 48 urah je bila razlika med izmerjeno optično gostoto obarvanih oprijetih celic 0,031 v prid dinamičnih pogojev. Po 72 urah inkubacije pri stacionarnih pogojih se je izmerjena optična gostota še povečala in je bila že 0,126, medtem pa se je v dinamičnih pogojih znižala za 0,006 v primerjavi z rezultatom po 48 urah.



Slika 19: Povprečne vrednosti oprijema bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) na kovinske ploščice pri stacionarnih in dinamičnih pogojih pri temperaturi inkubacije 36 °C.

Fig. 19: The adhesion of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 bacterial cells (expressed as the OD of CV dye) on metal coupons in static and dynamic conditions at an incubation temperature of 36 °C.

Statistično značilna razlika  $p < 0,05$  v oprijemu, izražena s povprečno vrednostjo izmerjene optične gostote sproščenega barvila kristal vijolično, je prisotna le po 24 in 48 urah inkubacije, kjer je oprijem večji pri dinamičnih pogojih. Po 72 urah inkubacije je oprijem sicer večji pri stacionarnih pogojih, toda razlika v izmerjeni optični gostoti je tako majhna, da statistično značilne razlike v oprijemu med stacionarnimi in dinamičnimi pogoji nismo ugotovili ( $p = 0,11$ ) (Preglednica 14).



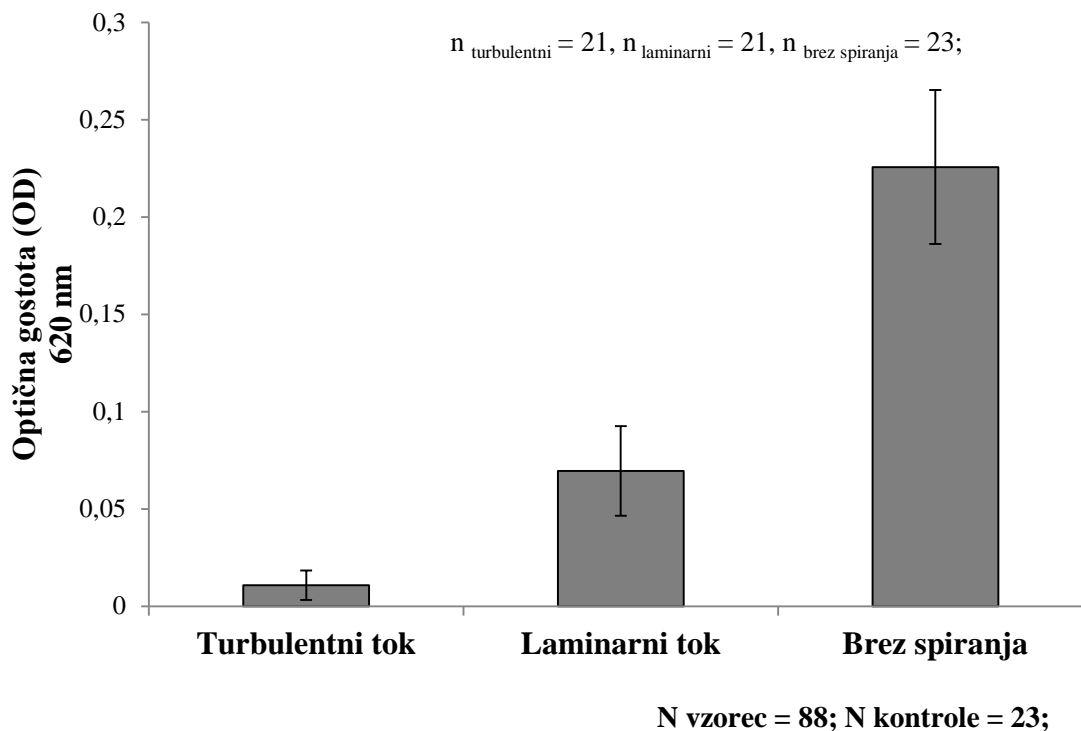
Preglednica 14: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih celic na površinah kovinskih ploščic, gojenih pri stacionarnih in dinamičnih pogojih, pri temperaturi inkubacije 36 °C.

Table 14: Statistical analysis of average values and differences measuring optical density (OD) of dye released from cells adhering to metal coupons in static and dynamic conditions at an incubation temperature of 36 °C.

Čas inkubacije	OD pri stacionarnih pogojih	OD pri dinamičnih pogojih	Razlika OD med stacionarnimi in dinamičnimi pogoji	t-vrednost	p-vrednost
24 ur	0,078345	0,08966	0,011315	-2,53547	$p < 0,05$
48 ur	0,084987	0,11552	0,030533	-12,2347	$p < 0,001$
72 ur	0,126307	0,10922	0,017089	1,73552	$p > 0,05$

#### 5.8.11 Vpliv laminarnega in turbulentnega toka na odstranjevanje oprijetih celic bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 s površin kovinskih ploščic

S pomočjo turbulentnega toka, ki ustvari zelo močne strižne sile, smo odstranili skoraj 95 % bakterijskih celic, ki so se po 72 urah inkubacije oprijele na površino kovinskih ploščic. Tudi manj intenzivno spiranje z laminarnim tokom je povzročilo odcepitev bakterijskih celic, saj je bila izmerjena optična gostota barvila kristal vijolično v primeru ploščic, ki niso bile izpostavljene toku (brez spiranja) občutno večja kot v ostalih dveh primerih (Slika 20). Z laminarnim tokom smo odstranili 68 % vseh oprijetih celic. Optična gostota sproščenega barvila iz obarvanih celic na ploščicah brez spiranja je bila kar 0,223, kar je za 0,154 več kot na ploščicah, kjer smo celice izpostavili laminarnemu toku. Poskuse smo izvajali v treh paralelkah in jih ponovili šest krat.



Slika 20: Vpliv turbulentnega in laminarnega toka na odstranjevanje oprijetih bakterijskih celic *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (izražen v OD barvila KV) s površin kovinskih ploščic po 72 urah inkubacije pri temperaturi 36 °C.

Fig. 20: Impact of turbulent and laminar flow on disposal of adhered *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (expressed as the OD of CV dye) from the surfaces of metal coupons, after 72 hours of incubation at temperature of 36 °C.

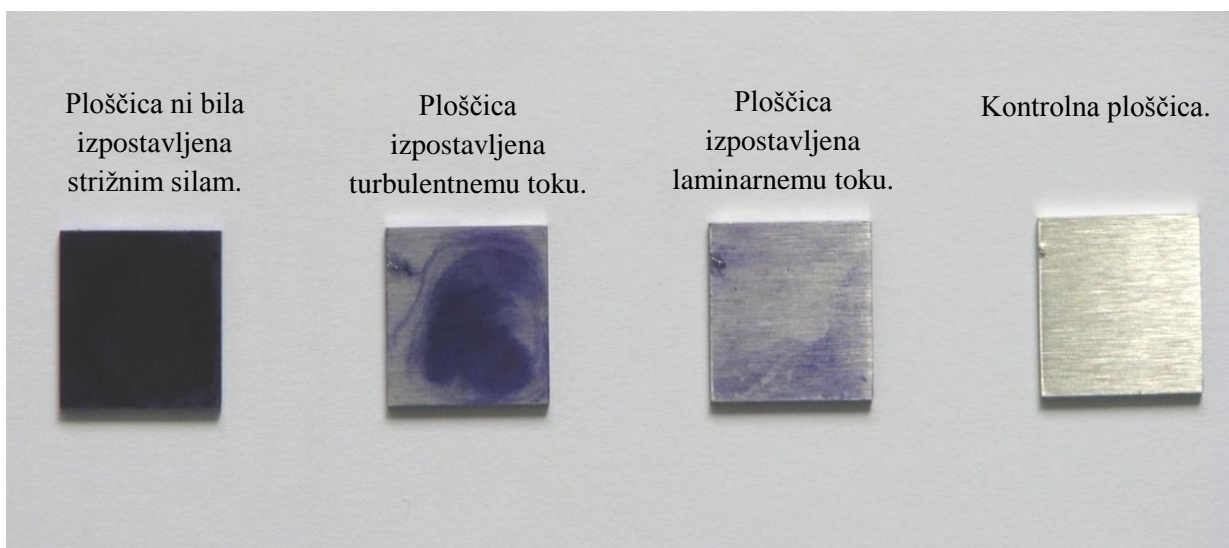
V Preglednici 15 so prikazani rezultati statistične obdelave podatkov povprečnih vrednosti izmerjene optične gostote oprijetih bakterijskih celic na kovinskih ploščicah, ki so bile izpostavljene turbulentnemu in laminarnemu toku, in ploščice, ki niso bile izpostavljene strižnim silam. Pri vseh treh primerjavah je prisotna velika statistično značilna razlika ( $p < 0,05$ ).

Preglednica 15: Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih celic na površinah kovinskih ploščic po izpostavljenosti turbulentnemu toku, laminarnemu toku in v mirujočem mediju.

Table 15: Statistical analysis of average values and differences measurements of the optical density of dye released from cells adhering to metal coupons exposed to turbulent and laminar flow and cells grown in a static medium.

Izpostavljenost strižnim silam	OD	OD	Razlika OD	t-vrednost	p-vrednost
Turbulentni in laminarni tok	0,010808	0,069522	0,058714	-10,263	$p < 0,001$
Turbulentni tok in brez spiranja	0,010808	0,223389	0,212581	-27,333	$p < 0,001$
Laminarni tok in brez spiranja	0,069522	0,223389	0,153867	-15,246	$p < 0,001$

Slika 21 prikazuje ploščice, na katerih so vidne obarvane bakterijske celice z barvilom kristal vijolično, razen na ploščici skrajno desno, ki predstavlja kontrolno ploščico. Kontrolna ploščica je bila izpostavljena enakemu postopku, vendar brez dodane bakterijske kulture. Na fotografiji so vidne razlike v obarvanosti ploščic, ki je manj intenzivna v odvisnosti od delovanja strižnih sil.



Slika 21: Kovinske ploščice iz nerjavnega jekla v velikosti 20 x 20 mm z oprijetimi bakterijskimi celicami, obarvanimi z barvilom kristal vijolično.

Fig. 21: Metal stainless steel coupons, size 20 × 20 mm, with tight bacterial cells with crystal violet dye.

## 6 RAZPRAVA

Oprijem bakterijskih celic in tvorba biofilma na površinah je zapleten proces, ki ga preučujejo mnogi znanstveniki, toda kljub temu ti mehanizmi še niso popolnoma raziskani. Tudi vodovodne cevi predstavljajo površine, na katerih se zaradi oprijema mikroorganizmov lahko ustvari biofilm. Ta mikroorganizmom predstavlja zaščito pred zunanji vplivi, kot so prisotnost razkužil v pitni vodi ali povišana temperatura vode v primeru izvajanja toplotnega šoka. Zato je pomembno, da poskusimo preprečiti nastanek biofilmov v ceveh vodovodnih sistemov. Glavni cilj naše raziskave je bil ugotoviti, kateri pogoji in vrste materialov zmanjšajo ali preprečujejo oprijem bakterije *Legionella pneumophila* na površine, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne sisteme. Bakterijski sev *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33153 smo gojili pri različnih pogojih, izdelali rastne krivulje ter preverjali oprijem bakterijskih celic na površine prav tako pri različnih pogojih. Za uporabljeni sev *L. pneumophila* smo določili zeta potencial in stopnjo hidrofobnosti, saj so to lastnosti, ki prav tako lahko vplivajo na intenzivnost oprijema bakterij na površine.

Na podlagi rezultatov meritev Zeta potenciala bakterije smo ugotovili, da ima uporabljena bakterija velik potencial za oprijem na pozitivno nabite površine. Bolj ko ima bakterija negativni zeta potencial, bolj močna je interakcija s pozitivno nabitimi površinami. Stopnja hidrofobnosti za bakterijo *Legionella* izmerjeno z metodo bakterijske adherence za ogljikovodike je bila 43 %, kar jo uvršča med hidrofilne bakterije. Vendar se hidrofobnost bakterijskih celic lahko tudi spreminja, npr. ob pomanjkanju hranil (Janjaroen, 2013). Znano je namreč, da se hidrofobne celice močneje oprimejo površine kot hidrofilne (Van Loosdrecht, 1989), vendar na oprijem vplivajo tudi fimbriji in bički (Rosenberg in Kjelleberg, 1986). Glavni namen fimbrijev in bičkov je, da premagajo elektrostatsko bariero med celico in površino (Corpe, 1980); ta mehanizem verjetno pomaga pri oprijemu na površine tudi bakteriji *L. pneumophila*.

Analize rasti oz. razmnoževanja bakterije *Legionella* smo izvajali v časovnem obdobju od 0 do 120 ur. Prvih 48 ur inkubacije pri temperaturi 36 °C so bile bakterije v fazi logaritimske

rasti, po 120 urah inkubacije je število poraslo za približno  $1,8 \log \text{CFU mL}^{-1}$ . Pri temperaturi inkubacije  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  je bilo razmnoževanje bakterij počasnejše oz. ga sploh ni bilo, saj se njihovo število iz začetne vrednosti  $5,7 \log \text{CFU mL}^{-1}$  kulture ni bistveno spreminjalo (Slika 6). Ugotovili smo, da je razmnoževanje preučevane bakterije pri  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  minimalno, kar potrjujejo tudi druge raziskave (Fletcher, 1977; Surman-Lee in sod., 2007; Garrett in sod., 2008). Pri inkubaciji na  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  se je število bakterij znižalo že po prvih 24 urah in po 48 urah padlo na  $0,1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ . Cooke (2004) je ugotovil, da 90 % bakterij iz rodu *Legionella* pri temperaturi  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  že v roku dveh ur odmre, kar pa naše analize niso potrdile, saj smo ugotovili, da je v prvih 6 urah odmrla le približno polovica bakterijskih celic (Oder in sod., 2015). Po 24 urah pri temperaturi inkubacije  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  je bila dosežena 4 logaritemska redukcija (99,99 %). Serano-Suarez in sod. (2013) ugotavljajo, da temperaturo nad  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  preživi 12 % populacije, kar potrjujejo tudi raziskave Carvalha in sod. (2008).

Med možnimi ukrepi za uničevanje bakterij iz rodu *Legionella* iz vodovodnih sistemov najdemo tudi uporabo različnih razkužil, zlasti klorovih pripravkov (Lin in sod., 2000; IVZ, 2008). Ko smo del vzorca izpostavili dikloroizocianurni kislini, se je število bakterij znižalo iz začetne vrednosti  $5,7 \log \text{CFU mL}^{-1}$ , za približno 36 %, potem pa so se preživele bakterije začele razmnoževati. Glede na zelo visoko koncentracijo klora ( $17 \text{ mg L}^{-1}$ ), ki smo jo uporabili pri naših poskusih, smo pričakovali manjše število bakterij po izpostavljenosti razkužilu. Kljub visoki koncentraciji dodanega klora je bilo število preživelih bakterij visoko, predvsem zaradi visoke koncentracije bakterij ob začetku poskusa. Po desetih minutah izpostavljenosti razkužilu, je bila dosežena le 1 logaritemska redukcija (log redukcija 90 %), koncentracija prostega klora pa je bila  $0 \text{ mg L}^{-1}$ . Število bakterij v vzorcih z dodanim razkužilom je nato v 24 urah inkubacije poraslo in je bilo le za 8 % manjše, kot pri vzorcih, ki niso bili izpostavljeni dikloroizocianurni kislini. Po 72 urah je število bakterij doseglo skoraj takšno vrednost, kot v vzorcih brez dodane dikloroizocianurne kisline (Slika 7). Prišli smo do zanimive ugotovitve, da so se bakterije, ki so preživele razkuževanje vode, razmnoževale intenzivneje kot v gojišču brez dodanega razkužila. Številni avtorji navajajo veliko odpornost bakterij iz rodu *Legionella* na različna razkužila (Bonadona in sod., 2009; Farhat in sod., 2012) nismo pa zasledili podatka, da bi kdo raziskoval razmnoževanje baterij, ki so preživele

razkuževanje. To je pomembna ugotovitev, saj pomeni, da v primeru neuspešnega razkuževanja, preživele bakterije spodbudimo k intenzivnejšemu razmnoževanju.

Analizirali smo tudi vpliv mehčala na razmnoževanje obravnavane bakterije. Mehčala se velikokrat uporabljajo v večstanovanjskih stavbah in večjih ustanovah za preprečitev nastajanja oz. nabiranja vodnega kamna v sistemu (Drev in sod., 2010). Število bakterij je že v fazi logaritemske rasti v vzorcu z dodanimi mehčali v 48 urah preseglo vrednosti v vzorcu brez dodanih mehčal (za  $1,4 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ). Sama oblika rastne krivulje (Slika 8) je podobna v obeh primerih, a s to razliko, da je tudi po daljšem času inkubacije število bakterij v vzorcih z dodanim natrijevim polifosfatom občutno večje. Največja razlika je bila izmerjena pri času inkubacije 72 ur, ko je znašala  $1,9 \log \text{CFU mL}^{-1}$ , kar predstavlja za 20 % večjo populacijo glede na kulturo brez mehčala. Razlog za tako intenzivno rast bakterij ob dodanih mehčalih je verjetno fosfat, ki se nahaja v polifosfatni raztopini.

Prve študije oprijema smo opravili na borosilikatnih steklenih ploščicah dveh različnih hrapavosti. Meritve so pokazale, da je intenziteta oprijema bakterij statistično značilno odvisna od hrapavosti površine ( $p < 0,05$ ). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi nekateri drugi raziskovalci (Quirynein in sod., 1994; Gallardo-Moreno in sod.; 2004, Bohinc in sod., 2014), medtem ko An in sod. (1995) ugotavljajo, da hrapavost titanove površine nima učinka na bakterijsko adhezijo. Če primerjamo rezultate rastne krivulje in intenzivnosti oprijema na steklene ploščice lahko vidimo, da je bil oprijem največje v fazi intenzivne rasti; ko pa je prešla bakterija v stacionarno fazo, je bil oprijem manj intenziven. Povprečna vrednost izmerjene optične gostote sproščenega barvila kristal vijolično je bila na bolj hrapavih ploščicah večja, kot pri neobdelanih, gladkih površinah. Na gladkih površinah se je pri temperaturi inkubacije  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  oprijelo povprečno 50 % manj celic v primerjavi s hrapavimi. Na podlagi naših rezultatov analiz na steklenih ploščicah lahko trdimo, da je površinska hrapavost odločilno vplivala na izmerjeno optično gostoto oprijetih bakterij, saj se intenzivnost oprijema povečuje z naraščajočo hrapavosti površine. Intenzivnost oprijema je bila v pozitivni odvisnosti s povečanjem hrapavosti površin, razlika je bila statistično značilna ( $p < 0,05$ ). Poleg hrapavosti površine je na oprijem bakterij vplivala tudi temperatura

inkubacije. Pri neugodnih pogojih pri temperaturi 15 °C (Slika 11) je bil oprijem bakterij bistveno manjši kot pri optimalnih pogojih pri 36 °C (Slika 10). Pri temperaturi 55 °C (Slika 12) je bila optična gostota sproščenega barvila kristal vijolično oz. število oprijetih bakterijskih celic na površinah višje kot pri 15 °C. Na hrapavih ploščicah je bilo pri temperaturi 55 °C v povprečju za 57 % manj oprijetih celic, kot pri temperaturi inkubacije 36 °C. Pri gladkih ploščicah je razlika še večja, saj je pri temperaturi 55 °C za 83 % manj oprijetih celic. Kljub manjšemu oprijemu v neugodnih razmerah inkubacije, smo tudi tukaj dokazali, da hrapavost površine vpliva na intenzivnost oprijema, saj je v obeh primerih bilo na bolj hrapavih ploščicah oprijetih več bakterijskih celic. Poskuse oprijema bakterijskih celic na steklenih površinah smo izvajali zaradi možnosti kasnejše primerjave z rezultati poskusov na materialih, ki se uporabljajo za vodovodne sisteme. Pri steklenih površinah je bila edina spremenljivka hrapavost materiala, pri ceveh pa je bilo spremenljivk več (vrsta materiala, hrapavost, hidrofobnost).

Glavni namen raziskave je bil ugotoviti oprijem bakterij *L. pneumophila* na površine cevi, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovne sisteme. V nasprotju z rezultati oprijema na steklenih ploščicah, hrapavost na materialih izbranih cevi, statistično značilno ni vplivala na oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila*. Razlike v hrapavosti cevi so bile z izjemo Zn cevi majhne (med 0,1 in 0,5 µm), toda prisotnih je bilo več spremenljivk, kot pri steklenih ploščicah. Pri materialu PP-R, ki je najbolj hidrofilen, hkrati pa hrapavost ni najmanjša, je bil oprijem na površine najmanj intenziven. Na materialu Cu, ki je najmanj hrapav (hrapavost 0,1 µm), glede na meritve mejnega kota pa nekje na sredini med vsemi vrednostmi, je bila izmerjena optična gostota sproščenega barvila iz obarvanih celic in s tem oprijem bakterij večja kot pri ceveh iz umetnih materialov. Tudi pri ceveh PP-R, Pex-Al-Pex in PE hrapavost ni vplivala na oprijem, saj se s povečevanjem hrapavosti oprijem ni povečeval, kar je v nasprotju s trditvami avtorjev Quirynen in sod. (1994), Taylor in sod. (1996) ter Gallardo-Moreno in sod. (2004). Da povečevanje hrapavosti površin nima učinka na bakterijski oprijem, navajajo nekateri drugi avtorji (An in sod., 1995; Flint in sod., 2000; Li in Logan 2004; Hahnel in sod., 2009). Na oprijem vpliva tudi vrsta materiala, saj je bila količina bakterij na materialih PVC tudi do štiridesetkrat manjša, kot na železnih ceveh (Niquette in sod., 2000; Simões in sod., 2007a), kar smo ugotovili tudi z našo raziskavo. Pri naših rezultatih je oprijem sicer res največji pri



najbolj hrapavi površini (Zn ceveh), toda druga največja izmerjena optična gostota barvila iz bakterijskih celic je bila pri najbolj gladkem materialu (Cu cevi). Čeprav veliko znanstvenikov zagovarja teorijo, da se na bolj hrapave površine oprime več bakterij kot na gladke, lahko trdimo, da na oprijem vplivajo tudi drugi faktorji. Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da je intenzivnost oprijema bakterij vrste *Legionella pneumophila* na površine materialov za vodovodne napeljave najmanj intenzivna na ceveh iz umetnih materialov. Torej je vrsta materiala in ne hrapavost tisti faktor, ki vpliva na intenzivnost oprijema na površine. Türetgen in Cotuk (2007) sta v svoji raziskavi prišla do podobnih zaključkov: število oprijetih bakterij *L. pneumophila* je največje na kovinskih materialih, najmanjše pa na materialih iz polietilena in polivinil-klorida. Toda nekateri drugi znanstveni trdijo, da se *L. pneumophila* dobro oprime na površine plastičnih materialov, ki se uporabljajo za vodovodne sisteme, medtem ko baker zavira njihov oprijem (Rogers in sod., 1994a; Rogers in sod., 1994b; Moritz in sod., 2010), kar je popolnoma nasprotno od naših ugotovitev.

Poskuse oprijema smo izvajali tudi pri različnih pogojih, ki se lahko pojavijo v vodovodnih sistemih. V enem sklopu smo izbrane površine izpostavili bakterijski kulturi pri treh različnih temperaturah inkubacije. Temperatura 36 °C je predstavljala optimalne pogoje za rast oz. razmnoževanje obravnavane bakterije. Oprijem smo preverjali tudi pri temperaturi 15 °C in 55 °C, ki za bakterije iz rodu *Legionella* predstavljata neugodne razmere, vendar se lahko pojavijo v sistemih znotraj zgradb. Oprijem bakterij je bil pri temperaturi inkubacije 15 °C slabši kot pri 36 °C (Slika 13), kar je v nasprotju z rezultati raziskave, ki so jo opravili Hindre in sod. (2008). Ugotovili so namreč, da je oprijem bakterij *L. pneumophila* na površine pri 20 °C veliko večji, kot pri 37 °C. Bakterije se v naši raziskavi pri 15 °C tako rekoč niso razmnoževale, vendar je do oprijema kljub temu prišlo. Sam trend oprijema je bil podoben pri obeh temperaturah, saj je na vseh materialih naraščal s časom inkubacije. Oprijem je bil intenzivnejši pri temperaturi 55 °C kot pri 15 °C, zlasti na kovinskih materialih (Cu in Zn ceveh). Zanimivo pa je, da je bil oprijem po daljšem času inkubacije v primerjavi s 36°C podoben, čeprav je po 48 urah odmrlo skoraj celotna populacija bakterij. Kljub odmiranju bakterij so se le-te usedale na podlago in se z njo očitno tudi sprijele. Naše ugotovitve potrjuje tudi raziskava Marion-Ferey s sodelavci (2002), ki ugotavljajo, da povišana temperatura povzroči »učinek zapečenosti« bakterijske populacije na površine, s čimer se poveča količina

biofilma na površinah. Na podlagi teh ugotovitev lahko sklepamo, da so se pri barvanju z barvilom kristal vijolično obarvale tudi mrtve celice, ki so se sprijele s podlago. Da se mrtve celice lahko oprimejo površin so potrdili tudi Alvarez in sodelavci (2013) ter Komaromy in sodelavci (2007).

Tudi stopnja hidrofobnosti materialov ni vplivala na oprijem bakterijskih celic iz rodu *Legionella*. Razlike v rezultatih meritev mejnega kota uporabljenih materialov so bile minimalne, tako da bi težko z gotovostjo trdili, da ta lastnost materialov ne vpliva na oprijem. Vsi naši materiali so namreč hidrofilni in razlika med največjim (76 ° – Pex-Al-Pex cev) in najmanjšim (68 ° – PP-R cev) je le 7 °. Zaradi majhne razlike v stopnji hidrofobnosti bi težko trdili, da ta lastnost materialov kakorkoli vpliva na oprijem bakterij na površine. Znano je tudi, da imajo hidrofilni materiali običajno negativen površinski naboj (An in Friedman, 1997).

V vodovodnih sistemih, kjer prihaja do mikrobiološke kontaminacije pitne vode, se vodi dodajajo različna kemična sredstva, s katerimi zagotovimo mikrobiološko ustreznost pitne vode, ki je v Sloveniji predpisana s Pravilnikom o pitni vodi (Pravilnik, 2004). Tudi v naši raziskavi smo želeli preveriti odziv bakterije *L. pneumophila* na oprijem pri dodanem razkužilu. Zaključimo lahko, da so se bakterije *L. pneumophila*, ki so preživele kloriranje vode in se nato hitreje razmnoževale, tudi intenzivneje oprijele površin izbranih materialov. Kljub temu da je bilo število bakterij v obeh vzorcih po 72, 96 in 120 urah inkubacije skoraj enako, je bila razlika v oprijemu med vsemi materiali očitna. Do velikih razlik je prihajalo pri materialih PE, Cu in Zn, kar je pokazala tudi statistično značilna razlika (Priloga C). Velika razlika je prisotna pri Zn ceveh, saj je na površinah cevi z dodanim razkužilom bilo za 54 % več celic, kot na tistih brez sredstva za razkuževanje.

Kot zadnjo analizo oprijema bakterije *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33153 na površine cevi, ki se najpogosteje uporabljajo za vodovodne instalacije, smo gojišču dodali mehčalo natrijev polifosfat. Dobljene rezultate smo primerjali z rezultati oprijema pri 36 °C in

ugotovili, da je bil oprijem ob dodatku mehčala večji v vseh časih inkubacije le pri Zn ceveh. Predvidevamo, da je bil oprijem večji predvsem zaradi prisotnega večjega števila bakterij, ki so se intenzivneje razmnoževale zaradi fosfata, ki predstavlja hranilo (Drev in sod., 2010). Do podobnih zaključkov so prišli tudi Giao in sod. (2009), ki pravijo, da ob prisotnosti ogljika bakterije *L. pneumophila* intenzivneje tvorijo biofilme, ker se hitreje razmnožujejo, saj tudi ogljik predstavlja hranilo. Intenzivnejše razmnoževanje smo potrdili z rastno krivuljo (Slika 8), oprijem pa je bil večji le v primeru najbolj hrapavega materiala, Zn ceveh.

Vpliv strižnih sil na odcepitev in oprijem bakterijskega seva smo ugotavljali v dveh ločenih poskusih s pomočjo pretočne komore, ki omogoča simulacijo laminarnega in turbulentnega toka. V prvem poskusu smo ugotavljali vpliv laminarnega toka na oprijem bakterij *L. pneumophila* na kovinske ploščice. V stacionarnih pogojih se je oprijem na površine s časom povečeval. Tudi laminarni tok je prvih 48 ur pozitivno vplival na oprijem bakterij na površine, saj je bilo na površinah več celic, kot pri površinah, ki niso bile izpostavljene laminarnemu toku. Po 24 urah je bilo v dinamičnih pogojih za 13 % več bakterijskih celic na ploščicah, po 48 urah pa 36 %. Po 72 urah izpostavljenosti so bili rezultati drugačni, saj je bilo v stacionarnih pogojih za 16 % več oprijetih bakterijskih celic, kot na ploščicah, ki smo jih izpostavili laminarnemu toku. Po 72 urah gojenja je verjetno prišlo do odcepitve bakterijskih celic s površin. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je ob dovolj velikem številu oprijetih bakterijskih celic prišlo do njihovega odcepljanja zaradi delovanja strižnih sil, kar potrjuje tudi raziskava z bakterijo *E. coli*, kjer sta Liu in Li (2008) ugotovila, da je tok tekočin lahko eden glavnih razlogov za odcepitev biofilma ter tudi raziskava Teodosio in sod. (2011), kjer ugotavljajo odcepljanje bakterij iz površin po daljšem času gojenja v dinamičnih pogojih. Tudi rezultati rastle krivulje so pokazali, da je laminarni tok pozitivno vplival na razmnoževanje bakterij *L. pneumophila*, saj so se v dinamičnih pogojih intenzivneje razmnoževale. Naša ugotovitev lahko pomembno vpliva na nadaljnje raziskave, saj sedaj velja, da se bakterije iz rodu *Legionella* intenzivno razmnožujejo v slepih vodih, ki velikokrat ostanejo po obnovi vodovodnih sistemov v zgradbah (Joseph in sod., 2001; Hojs in sod., 2002).

V drugem delu poskusov s pretočno komoro smo ugotavljali vpliv strižnih sil na odcepitev bakterij *L. pneumophila* s površin, ki so predhodno oprijete na površine v stacionarnih pogojih. Strižne sile so zelo vplivale na odstranjevanje bakterij s površin, kar so preučevali tudi Choi in Morgenroth (2003) ter Fink in sod. (2014). Ugotovili so, da povečanje strižne napetosti povzroči znatno odcepitev bakterij iz biofilma, kar v našem primeru predstavlja turbulentni tok. Böhl in sod. (2009) so izračunali, da se s povečanjem strižnih sil povečuje verjetnost odcepitev od površin materialov. Naši rezultati kažejo, da je turbulentni tok povzročil odcepitev kar 95 % oprijetih celic s površine kovinski ploščic (OD = 0,0108), medtem ko je na ploščicah, ki so bile izpostavljene laminarnemu toku, ostalo oprijetih več celic (OD = 0,0695). Laminarni tok je odstranil 68 % predhodno oprijetih celic. V vodovodnih sistemih turbulentni tok sicer ni prisoten, toda kot lahko vidimo, tudi laminarni tok povzroči odcepljanje bakterijskih celic od površin.

Poudariti moramo, da je raziskava v celoti potekala kot laboratorijski poskus, zato je možno, da bi bili rezultati podobnih analiz z vzorci vode iz vodovodnega sistema drugačni. V našem primeru smo uporabili standardni sev *L. pneumophila*, brez prisotnih drugih mikroorganizmov, ki se lahko pojavijo v sistemih. Tudi koncentracije mikroorganizmov v vzorcih so bile višje, kot se pojavljajo v vodovodnih sistemih. Kljub temu da smo se želeli približati dejanskim pogojem (temperatura, razkužila, mehčala), smo pri vseh poskusih uporabljali hranljiva gojišča, ki spodbujajo rast bakterije *L. pneumophila*.

Po opravljeni raziskavi in obdelavi podatkov, so se nam odprla nova vprašanja in ideje za nadaljevanje raziskovanja. Treba bi bilo natančneje raziskati vpliv razkužil na razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* in tudi drugih mikroorganizmov, ki se lahko pojavijo v pitni vodi. V prihodnje nameravamo raziskati predvsem vpliv različnih koncentracij in vrst kemičnih sredstev, ki se najpogosteje uporabljajo za dezinfekcijo pitne vode. Drugo pomembno vprašanje se odpira na področju uporabe sredstev za mehčanje vode, ki se uporabljajo za preprečevanje nabiranja vodnega kamna v vodovodnih sistemih. Raziskave, s katero bi preverjali vpliv mehčal narejenih na osnovi fosfatov na razmnoževanje mikroorganizmov, v literaturi ni zaslediti, zato bomo z raziskovanjem v tej smeri zagotovo nadaljevali. Če bomo

dokazali, da uporaba mehčal, ki niso narejena na osnovi fosfatov ne spodbujajo razmnoževanja mikroorganizmov, je to lahko pomembna informacija. Za enkrat smo dokazali, da rast pospešujejo mehčala, ki vsebujejo polifosfate. Med prebiranjem različne znanstvene literature se nam je večkrat zastavilo tudi vprašanje, povezano z razmnoževanjem bakterij iz rodu *Legionella*. Večina avtorjev pravi, da se bakterije iz rodu *Legionella* razmnožujejo intracelularno, torej da za svoje razmnoževanje potrebujejo živo celico. Pojavi se vprašanje, kako je torej mogoče, da se ti mikroorganizmi razmnožujejo v vodovodnih sistemih tako uspešno, če nimajo na razpolago gostitelja. Po pogovoru s strokovnjakom za nadzor kakovosti pitne vode (NIJZ) smo dobili informacijo, da se v pitni vodi ne ugotavlja prisotnost ameb in drugih praživali, v katerih te bakterije parazitirajo, saj teh preiskav Pravilnik o pitni vodi ne predpisuje.

## 7 ZAKLJUČKI

Na podlagi rezultatov opravljene raziskave lahko izpostavimo naslednje pomembnejše ugotovitve in zaključke doktorske disertacije:

- a) Ugotovili smo, da hrapavost materiala ne vpliva na oprijem bakterijskih celic *L. pneumophila*, kar je v nasprotju s trditvami avtorjev Quiryneen in sod. (1994), Taylor in sod. (1996) ter Gallardo-Moreno in sod. (2004).
- b) Ugotovili smo, da je oprijem na ceveh kovinskih materialov intenzivnejši kot na ceveh iz umetnih materialov, kar pa se ne ujema z ugotovitvami nekaterih znanstvenikov ki trdijo, da se *L. pneumophila* dobro oprime na površine plastičnih materialov, ki se uporabljajo za vodovodne sisteme, medtem ko baker zavira njihov oprijem (Rogers in sod., 1994a; Rogers in sod., 1994b; Moritz in sod., 2010).
- c) Bakterije *L. pneumophila* so se intenzivneje razmnoževale v dinamičnih pogojih (laminarnem toku), kot v statičnih pogojih, kar je v nasprotju s trditvami Joseph in sod., (2001) ter Hojs in sod., (2002), da so v vodovodnih sistemih idealna mesta za razvoj mikroorganizmov slepi oz. mrtvi vodi.
- d) V znanstvenih člankih smo zasledili, da so bakterije iz rodu *Legionella*, odporne na razkužila, ki se najpogosteje uporabljajo za razkuževanje vodovodnih sistemov. Nismo pa zasledili raziskave, ki bi potrdila naše ugotovitve, da se bakterije, ki so preživele razkuževanje vode, začnejo intenzivneje razmnoževati.
- e) Dokazali smo, da prisotnost mehčal za mehčanje pitne vode, ki so narejeni na osnovi natrijevega polifosfata pospešujejo razmnoževanje bakterije *L. pneumophila*. Znano je, da fosfati predstavljajo hranila za mikroorganizme, toda raziskave o vplivu mehčal na pospešeno razmnoževanje bakterije *L. pneumophila* nismo zasledili.

Na podlagi dobljenih rezultatov prve (»Intenzivnost oprijema bo odvisna od hidrofobnosti oz. hidrofilnosti izbranih materialov.«) in tretje hipoteze (»Intenzivnost oprijema bakterij iz rodu *Legionella* bo odvisna od električnega naboja površin.«) ne moremo niti potrditi niti ovreči, saj so bile razlike v stopnji hidrofobnosti med posameznimi materiali tako majhne, da bi težko trdili, da ta lastnost materialov kakorkoli vpliva na oprijem bakterij na površine.

Drugo postavljeno hipotezo (»Bakterije iz rodu *Legionella* bodo intenzivneje tvorile biofilme na površinah z večjo hrapavostjo.«) lahko ovržemo, saj hrapavost materialov (cevi) ni vplivala na oprijem bakterijskih celic na površine cevi. Sicer je bil oprijem največji pri najbolj hrapavi površini (Zn ceveh), toda druga največja izmerjena optična gostota barvila iz bakterijskih celic in s tem oprijem je bila izmerjena pri najbolj gladkem materialu (Cu cevi). Vendar pa naših rezultatov na materialih petih cevi ne moremo posploševati za vse materiale, kar potrjujejo rezultati na steklenih ploščicah, kjer se je oprijem povečeval s povečanjem hrapavosti materiala.

## 8 POVZETEK

Prisotnost bakterij iz rodu *Legionella* v vodovodnih sistemih je pereč problem povsod po svetu, kar so potrdile številne opravljene raziskave na tem področju. Mnenja o tem, kaj vse vpliva na njihovo razmnoževanje v notranjem okolju so si precej deljena. Znano je, da so ostenja cevi in vodovodnih naprav primerna mesta za razvoj mikrobnih združb. Za boljše razumevanje mikrobne kontaminacije površin so najnovejše raziskave usmerjene na določanje adhezijskega potenciala mikrobov ter njihovo sposobnost tvorjenja biofilma, odpornost proti izsušitvi, kislinskemu ali toplotnemu stresu in razkužilom. Na oprijem bakterij poleg lastnosti bakterij vplivajo tudi lastnosti materiala. Glavni cilj doktorske disertacije je bil ugotoviti, kateri so tisti materiali za vodovodne inštalacije, na katere se bodo bakterije iz rodu *Legionella* najmanj oprijele ter, kako različni pogoji okolja, kot so temperatura, prisotnost razkužil in mehčal, vplivajo na njihovo razmnoževanje.

Med pomembnejšimi ugotovitvami izpostavljamo naslednje:

- a) Nismo mogli potrditi, da lastnosti izbranih materialov kot so hrapavost, hidrofobnost in naboj statistično značilno vplivajo na oprijem bakterij *L. pneumophila* na izbrane površine. V preliminarnih študijah na steklenih ploščicah se je sicer hipoteza, da bodo bakterije iz rodu *Legionella* intenzivneje tvorile biofilme na površinah z večjo hrapavostjo, potrdila. Toda v nadaljevanju raziskav smo dokazali, da na oprijem bakterij na površine materialov, ki se uporabljajo v vodovodnih sistemih, hrapavost ni vedno vplivala pozitivno, saj oprijem bakterij na najbolj gladkem materialu ni bil najmanjši. V primeru uporabe cevi petih materialov, zaradi več spremenljivk ne moremo z gotovostjo trditi, kateri od dejavnikov je najbolj vplival na rezultate.
- b) Temperatura 55 °C bakterije *L. pneumophila* ne uniči popolnoma, saj smo tudi po daljšem času inkubacije v vzorcih še vedno potrdili njihovo prisotnost. Res pa je, da je bila začetna koncentracija populacije večja, kot se pojavlja v vodovodnih sistemih.
- c) Bakterije *L. pneumophila* se pri temperaturi 15 °C niso razmnoževale. Njihovo število je ostajalo približno enako, tudi po 120 urah inkubacije.
- d) Ob dodani dikloroizocianurni kislini se je število bakterij po desetih minutah izpostavljenosti razkužilu zmanjšalo za 36 %, nato pa se intenzivneje razmnoževale, je bil tudi njihov oprijem na izbranih površinah po daljšem času izpostavljenosti.



- e) Natrijev polifosfat v sredstvu za mehčanje vode je povzročil intenzivno razmnoževanje preučevane bakterije, ki je bilo intenzivnejše kot v vzorcih brez dodanih mehčal. Tudi oprijem bakterij na površine je bil na nekaterih materialih občutno večji ob prisotnosti mehčal.
- f) Delovanje turbulentnega in laminarnega toka je povzročilo odcepljanje oprijetih bakterij s površin. Večje ko so bile strižne sile, več celic se je odcepilo, kar potrjuje velika statistično značilna razlika ( $p < 0,001$ ).
- g) Bakterije, ki so bile izpostavljene laminarnemu toku so se v prvih 48 urah inkubacije intenzivneje oprijele na površine, po daljšem času izpostavljenosti pa je prišlo do njihovega odcepljanja. Na razmnoževanje bakterij laminarni tok ni imel vpliva.

## 9 SUMMARY

As shown by numerous studies, the presence of bacteria of the genus *Legionella* in plumbing and ventilation systems is a pressing problem throughout the world. Opinions on what factors affect their reproduction in indoor environments are considerably divided. It is known that the walls of pipes and plumbing devices provide suitable conditions for the development of microbial communities. With an aim of improving our understanding of the microbial contamination of surfaces, recent research has been focused on determining the adhesion potential of microbes, their biofilm formation capacity and their resistance to desiccation, acid and thermal stress, and disinfectants. In addition to the characteristics of the bacteria themselves, their adhesion is also affected by the properties of materials. The main aim of this doctoral dissertation was to determine which plumbing materials bacteria of the genus *Legionella* would adhere the least readily to and how their reproduction is affected by different environmental conditions, such as the temperature and the presence of disinfectants and softeners.

The most significant results of the study are as follows:

- a) We can not to confirm that the properties of selected materials such as roughness, hydrophobicity and charge, influence the surface adhesion of *L. pneumophila*. In our preliminary studies using glass coupons, the hypothesis that bacteria of the genus *Legionella* would form biofilms more readily on surfaces with a higher roughness was confirmed. However, we demonstrated in our further studies that the adhesion of bacteria to the surfaces of materials used in plumbing systems was not positively affected by roughness, as bacterial adhesion was not the lowest on the smoothest material. As there were a number of variables associated with the five materials, it cannot be determined with certainty which factor had the greatest impact on the results.
- b) We have established that a temperature of 55 °C does not completely destroy *L. pneumophila* cells even after prolonged exposure, as the presence of bacterial cells was detected in samples even after a prolonged period of incubation. It must be noted, however,

that the initial population density was higher than that normally occurring in plumbing systems.

c) *L. pneumophila* bacteria at a temperature of 15 ° C are not reproduced. Their number more or less the same, even after 120 hours of incubation.

d) The number of bacteria after ten minutes exposure to disinfectant dichloroisocyanuric acid reduced to 36% of those, that had survived the disinfection of water reproduced more intensively than bacteria that had not been exposed to chlorine. As a result, due to the greater number of *L. pneumophila* cells, the adhesion of bacterial cells to the selected surfaces was also greater after prolonged exposure.

e) Exposure to turbulent and laminar flow resulted in the detachment of adherent bacteria from surfaces. The greater the shear forces, the more cells detached.

f) The sodium polyphosphate in the water softening agent resulted in an increased rate of reproduction of the bacteria under study that was greater than in samples with no added softener. The adhesion of bacteria to the surfaces of certain materials was also significantly higher in the presence of softeners.

g) Bacterial cells exposed to laminar flow adhered more firmly to surfaces in the first 48 hours of incubation, while the cells began to detach after a prolonged period of incubation. Laminar flow had no effect on the reproduction of the bacteria.

## VIRI

Abrikosov, A. A., Gorkov, L.P., Dzyaloshinsky, I. E. 1965. Electromagnetic Radiation in an Absorbing Medium. V: Ilaar, D. Methods of Quantum Field Theory Statistical in Physics. International series of monographs in natural in philosophie. Pergamon press Ltd., Headington Hill Hall Oxford: str. 250-275.

Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Harb, O. S., Stone, B. J. 1997. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Molecular Microbiology* 24, 3: 629-642.

Abu Kwaik, Y., Pederson, L. L., 1996. The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Molecular Microbiology* 21, 3: 543-556.

ACHD, 1997. Allegheny county health department approaches to prevention and control of *Legionella* infection in allegheny county health care facilities: str. 1-15.

Addiss, D. G., Davis, J. P., Laventure, M., Wand, P. J., Hutchmson, M. A., McKinney, R. M. 1989. Community-acquired legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *American Journal of Epidemiology* 130, 3: 557-568.

Akbas, E., Yu, V. 2001. Legionnaires' disease and pneumonia: beware the temptation to underestimate this "exotic" cause of infection. *Postgraduate Medicine* 109, 5: 135-147.

Allion, A., Baron, J. P., Boulange-Petermann, L. 2006. Impact of surface energy and roughness on cell distribution and viability. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 22, 5: 269-278.

Al-Matawah, Q. A., Al-Zenki, S. F., Qasem, J. A., Al-Waalan, T. E., Heji, A. H. B. 2012. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* from water systems in Kuwait residential facilities. *Journal of Pathogenesis* 2012: 1-5.

Àlvarez, G., González, M., Isabal, S., Blanc, V., León, R. 2013. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express* 3,1: 1-8.

An, Y. H., Friedman, R. J., Draughn, R. A., Smith, E. A., Nicholson, J. H., John, J. F. 1995. Rapid quantification of Staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 24: 29-40.

An, Y. H., Friedman, R. J. 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 30: 141-152.

Anand, C. M., Skinner, A. R., Malic, A., Kurtz, J. B. 1983. Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *Journal of Hygiene* 91: 167-178.

Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B., Cianciotto, N. P. 2000. Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 68, 4: 1855-1863.

ASHRAE, 2000. American society of heating, refrigerating and air-conditioning engineers. Guideline minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems: 12-2000.

Atlas, R. M., Williams, J. F., Huntington M. K. 1995. *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Applied and Environmental Microbiology* 61,4: 1208-1213.

Atlas, R. M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology* 1: 283-293.

Baker, J., Farrell, I. D., Hutchinson, J. G. 1981. Factors affecting growth of *Legionella pneumophila* in liquid media. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 44: 1054-1056.

Bandyopadhyay, P., Byrne, B., Chan, Y., Swanson, M. S., Steinman, H. M. 2003. *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. *Infection and Immunity* 71, 8: 4526-4535.

Bartram, J., Bentham, R., Briand, E., Callan, P., Crespi, S., Lee, J. V., Surman-Lee, S. 2007. Approaches to risk management. V: Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., Surman-Lee, S. (ur.). *Legionella* and the prevention of legionellosis. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO Press: str. 39-56.

Beauté, J., Zucs, P., de Jong, B. 2013. Legionnaires' disease in Europe, 2009-2010. *Surveillance and Outbreak reports* 18, 1: 1-7.

Bentham, R. H. 1993. Environmental factors affecting the colonization of cooling towers by *Legionella* spp. in South Australia. *International Biodeterioration & Biodegradation* 31: 55-63.

Bohinc, K., Dražič, G., Fink, R., Oder, M., Jevšnik, M., Nipič, D., Godič-Torkar, K., Raspor, P. 2014. Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 50: 265-272.

Boks, N. P., Norde, W., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. 2008. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology* 154: 3122-3133.

Bonadonna, L., Briancesco, R., Della Libera, S., Lacchetti, I., Paradiso, R., Semproni, M., 2009. Microbial characterization of water and biofilms in drinking water distribution systems at sport facilities. *European Journal of Public Health* 17, 2: 99-102.

Böl, M., Möhle, R. B., Haesner, M., Neu, T. R., Horn, H., Krull, R. 2009. 3D Finite element model of biofilm detachment using real biofilm structure from CLSM data. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 1: 177-186.

Brenner, D. J., Feeley, J. C., Weaver, R. E. 1984. Family VIII Legionellaceae. V: Krieg, N. R., Holt, J. G. (ur). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD: str. 210-236.

Brooks, T., Osicki, R., Springthorpe, V., Sattar, S., Filion, L., Abrial, D., Riffard, S. 2004. Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 67: 1845-1859.

Busscher, H. J., van der Mei, H. C. 1995. Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion. *Methods Enzymology Journal* 253: 455-477.

Busscher, H. J., Rinastiti, M., Siswomihardjo, W., van der Mei, H. C. 2010. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research* 89: 657-665.

Campodonico, E. M., Roy, C. R. 2008. The Genus *Legionella*. V: Goldman, E., Green, H. L. (ur.). *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, New York: str. 505-518.

Caroff, M., Karibian, D. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 338: 2431-2447.

Carvalho, F. R., Nastasi, F. R., Gamba, R. C., Foronda, A. S., Pellizari, V. H. 2008. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Current Microbiology*, 57, 4: 294-300.

Casati, S., Gioria-Martinoni, A., Gaia, V. 2009. Commercial potting soils as an alternative infection source of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in Switzerland. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 571-575.

CDC, 2007. Surveillance for travel-associated Legionnaires disease --- United States, 2005—2006. *56*, 48: 1261-1263.

Chambless, J. D., Stewart, P. S. 2007. A three-dimensional computer model analysis of three hypothetical biofilm detachment mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 6: 1573-1584.

Choi, Y. C., Morgenroth, E. 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Science and Technology* 47,5: 69-76.

Choi, N. C., Park, S. J., Lee, C. G., Park, J. A., Kim, S. B. 2011. Influence of surfactants on bacterial adhesion to metal oxide-coated surfaces. *Environmental Engineering Research* 16: 219-225.

Cirillo, S. L., Bermudez, L. E., El-Etr, S. H., Duhamel, G. E., Cirillo, J. D. 2001. *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infection and Immunity* 69, 1: 508-517.

Cirillo, S. L., Lum, J., Cirillo, J. D. 2000. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 146: 1345-1359.

Clint, J. H. 2001. Adhesion and components of solid surface energies. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6: 28-33.

Colbourne, J. S., Ashworth, J. 1986. Rubbers, water, and *Legionella*. *Lancet* 2: 583.

Cook, R. P. D. 2004. Hazards of water. *Journal of Hospital Infections*. 57, 4: 290-293.

Cook, G., Costerton, J. W., Darouiche, R. O. 2000. Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of a silver-coated heart valve sewing cuff. *The International Journal of Antimicrobial Agents* 13: 169-73.



Corpe, W. 1980. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. V: Bitton, G., Marshall, K. C. (ur). Adsorption of microorganisms to surfaces, Springer, str. 105-144.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. 1995. Microbial biofilms. The Annual Review of Microbiology 49: 711–745.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322.

Coquet, L., Cosette, P., Junter G. A., Beucher E., Saiter, J. M., Jouenne, T. 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 26: 373-378.

Crawford, R. J., Webb, H. K., Truong, V. K., Hasan, J., Ivanova, E. P. 2012. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. Advances in Colloid and Interface Science 2012: 179-182.

Dalpex, 2013. Laser Multi Dalpex. [www.dalpex.com](http://www.dalpex.com) (15.5.2013).

Darouiche, R. O. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants, The New England Journal of Medicine 350: 1422-1429.

Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nature Reviews Drug Discovery 2: 114-122.

D'Auria, G., Jiménez, N., Peris-Bondia, F., Pelaz, C., Latorre, A., Moya, A. 2008. Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. BioMed Central Genomics 9, 14. doi:10.1186/1471-2164-9-14.

Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., Ollivier, F. 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from antropogenic and natural aquatic environments. *Water Research* 41: 3159-3167.

Dennis, P. J., Lee, J. V. 1988. Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 2: 135-141.

den Boer, J. W., Yzerman, E. P., Jansen, R., Bruin, J. P., Verhoef, L. P., Neve, G., van der Zwaluw, K. 2007. Legionnaires' disease and gardening. *Clinical Microbiology and Infection* 13: 88-91.

Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V. J. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology* 104: 1552-1561.

Diederens, B. M. W. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* 56: 1-12.

Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B. C., Hacker, J., Steinert, M. 2001. Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infection and Immunity* 69, 4: 2116-2122.

Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S. 2004. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1: 458-460.

Domingue, E. L., Tyndall, R. L., Mayberry, W. R., Pancorbo, O. C. 1988. Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3: 741-747.

Dorobantu, L. S., Gray, M. R. 2010. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning* 32: 74-96.

Drev, D. 2009. Vodovod. [www.scribd.com/doc/23335105/Vodovod-2009#scribd](http://www.scribd.com/doc/23335105/Vodovod-2009#scribd) (28.9.2015).

Drev, D., Pražnikar, Š., Škarja, J., Panjan, J., Kompare, B. 2010. Dezinfekcija in odstranjevanje biofilma v notranjih inštalacijah za hladno in ogreto vodo v objektih s povečanim tveganjem za nastanek okužb z legionelo. V: Roš, M. (ur.). Zbornik referatov Vodni dnevi, Portorož, 20. in 21. oktober 2010, Slovensko društvo za zaščito voda: str. 1-12.

Drev, D., Vrhovšek, D., Panjan, J. 2006. Raziskave možnosti uporabe porozne keramike kot podstave ali filtrne snovi pri čiščenju odpadnih voda. *Journal of Mechanical Engineering* 52, 4: 250-263.

Dzyaloshinskii, I. E., Lifshitz, E. M., Pitaevskii, L. P. 1961. The general theory of van der Waals forces. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk* 73, 165-209.

ECDC, 2012. Surveillance report. Legionella disease in Europe 2010. European centre for Disease Prevention and Control.

ECDC, 2014. Surveillance report. Legionella disease in Europe 2012. European centre for Disease Prevention and Control.

EPA, 2001. United States Environmental Protection Agency. *Legionella*: Drinking Water Health Advisory.

Ehrlich, R. L., Steele, M. S., Sabatini, N. L. 2000. Report of the Maryland scientific working group to study *Legionella* in water systems in healthcare institutions. Baltimore: State of Maryland Department of Health & Mental Hygiene: str. 1-27 .

EWGLI, 2004a. Legionnaires' disease in Europe 2000–2002. *Epidemiology and Infection*,

<http://www.eurosurveillance.org/Public/Articles/Archives.aspx?PublicationId=111>  
(2.7.2013).

EWGLI, 2004b. Travel associated Legionnaires' disease in Europe: 2002. *Eurosurveillance Monthly Archives*.

<http://www.eurosurveillance.org/Public/Articles/Archives.aspx?PublicationId=111>  
(2.7.2013).

EWGLI, 2005. European guidelines for control and prevention of travel associated Legionnaires' disease. The European surveillance scheme for travel associated Legionnaires' disease and the European working group for *Legionella* infections. <http://www.eurosurveillance.org/Public/Articles/Archives.aspx?PublicationId=111>  
(20.9.2015).

Farhat, M., Moletta-Denata, M., Frere, J., Onillon, S., Trouilhr, M. C., Robine, E. 2012. Effects of disinfection on *Legionella* spp., eukarya, and biofilms in a hot water system. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 19: 6850-6858.

Feazel, L. M., Baumgartner, L. K., Peterson, K. L., Frank, D. N., Harris, J. K., Pace, R. N. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 16393-16398.

Ferreira, A. P., da Cunha, C. L. N. 2007. Research on *Legionella pneumophila* in hospital supply networks. *Electronic Journal of Communicator Information & Innovation in Health* 1, 2: 206-212.

Fettes, P. S., Susa, M., Hacker, J., Marre, R. 2000. Characterization of the *Legionella pneumophila* gene *ligA*. *International Journal of Medical Microbiology* 290, 3: 239-250.

Fields, B. S., Barbaree, J. M., Shotts, E. B. jr., Feeley, J. C., Morrill, W. E., Sanden, G. N., Dykstra, M. J. 1986. Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infection and Immunity* 53: 553-559.

Fields, B. S. 1996. The molecular ecology of *Legionellae*. Trends in Microbiology 4, 7: 286-290.

Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clinical Microbiology Reviews 15: 506-526.

Fink, R., Oder, M., Rangus, D., Raspor, P., Bohinc, K., 2014. Microbial adhesion capacity. Influence of Shear and Temperature Stress. International Journal of Environmental Health Research, <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2015.1007840>.

Fletcher, M. 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. Canadian Journal of Microbiology, 23: 1-6.

Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Stevanovic, S., Cianciotto, N. P., Neumeister, B. 2001. Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. Journal of Bacteriology 183, 6: 2121-2124.

Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L., Pope, S. H. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology 41, 1: 9-16.

Flint, S. H., Brooks, J. D., Bremer, P. J. 2000. Properties of stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. Journal of Microbiological Methods 43: 235-242.

Gagnon, G. A., Slawson, R. M. 1999. An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water. Journal of Microbiological Method 34: 203-214.

Gallardo-Moreno, A. M., Gonzalez-Martin, M. L., Bruque, J. M., Perez-Giraldo, C. 2004. The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. Colloids Surface A 249: 99-103.

Gao, L. Y., Stone, B. J., Brieland, J. K., Abu Kwaik, Y. 1998. Different fates of *Legionella pneumophila pmi* and *mil* mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 25, 6: 291-306.

Garrett, T. R., Bhakoo, M., Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18: 1049-1056.

Giao, M. S., Wilks, S. A., Azevedo, N. F., Vieira, M. J., Keevil, C. W. 2009. Comparison between standard culture and peptide nucleic acid 16S rRNA hybridization quantification to study the influence of physico-chemical parameter on *Legionella pneumophila* survival in drinking water biofilms. *Biofouling* 25: 343-351.

Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C. S. Molin, Tolker-Nielsen, T. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology* 7: 894-906.

Gomes, I. B., Simoes, M., Simoes, L. C. 2014. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. *Water Research* 62, 63–87.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Buchrieser, C. 2009. *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 5: 727-739.

Gorbet, M. B., Sefton, M. V., 2005. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*, 26 34: 6811–6817.

Gordesli, F. P., Abu-Lail, N. I. 2012. Combined Poisson and soft-particle DLVO analysis of the specific and nonspecific adhesion forces measured between *L. monocytogenes* grown at various temperatures and silicon nitride. *Environmental Science and Technology* 46:10089-10098.

Graph Pad Prism 6. 2015. <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>

Grmšek-Košnik, I., Pohar, M. 2008. Nadzor nad kakovostjo pitne vode iz vodovodnega omrežja. Bolnišnice in druge zdravstvene ustanove. NAKOBO: 1-8.

Guyard, C., Low, D. E. 2011. *Legionella* infections and travel associated legionellosis. *Travel Medicine and Infectious Disease* 9, 4: 176-186.

Hahnel, S., Rosentritt, M., Handel, G., Bürgers, R. 2009. Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. *Dental Materials* 25: 969-975.

Hales, L. M., Shuman, H. A. 1999. *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infection and Immunity* 67, 7: 3662-3666.

Haney Carr, J. 2013. <http://soundml.com/legionella>. (20.10.2014).

Hansson. K., Andersson., T., Skepö, M. 2012. Adhesion of fermented diary products to packaging materials. Effect of material functionality, storage time, and fat content of the product. *An empirical study* 111, 2: 318-325.

Harb, O. S., Abu Kwaik, Y. 2000. Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (milA) of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 68, 1: 368-376.

Harrison, T. G., Afshar, B., Doshi, N., Fry, N. K., Lee, J. V. 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody serogroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28, 7: 781-791.

Harvey, J., Keenan, K. P., Gilmour, A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology* 24: 380-392.

Haznedaroglu, B. Z., Bolster, C. H., Walker, S. L. 2008. The role of starvation on *Escherichia coli* adhesion and transport in saturated porous media. *Water Research* 42: 1547-1554.

Helbig, J. H., König, B., Knospe, H., Bubert, B., Yu, C., Lück, C. P., Riboldi-Tunncliffe, A., Hilgenfeld, R., Jacobs, E., Hacker, J., Fischer, G. 2003. The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells. *Journal of Biological Chemistry* 384: 125-137.

Helmenz, P. C. 1977. Electrophoresis and other electrokinetic phenomena. V: Lagowski J. J. (ur.). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. New York: Marcel Dekker: str. 452-487.

Herald, P. J., Zottola, E. A. 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science and Technology* 53: 1549-1552.

Heuner, K., Steinert, M. 2003. The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *International Journal of Medical Microbiology* 293: 133-143.

Heuner, K., Hacker, J., Brand, B. C. 1997. The alternative sigma factor sigma28 of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli* fliA mutant. *Journal of Bacteriology* 179, 1: 17-23.

Hickey, E. K., Cianciotto, N. P. 1997. An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infection and Immunity* 65, 1: 133-143.

Hindre, T., Bruggemann, H., Buchrieser, C., Héchard, Y. 2008. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* 154: 30-41.

Hojs, A., Petrovič, A., Furlan, N. 2002. Preprečevanje legioneloz v javnih objektih. *Zdravstveno Varstvo* 41: 299-304.



Hood, S.K., Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology* 37: 145-153.

Hori, K., Matsumoto, S. 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 424-434.

Hornei, B., Ewig, S., Exner, M., Tartakovsky, I., Lajoie, L., Dangendorf, F., Surman-Lee, S., Fields, B. 2007. Legionellosis. V: Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., Surman-Lee, S. (ur.). *Legionella* and the prevention of legionellosis. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO Press: str. 1-13.

Hughes, M. S., Steele, T. W. 1994. Occurrence and distribution of *Legionella* species in composted plant materials. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2003-2005.

ISO 8199:2005. Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.

IVZ, 2000-2012. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije - Letna poročila.

[http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=29&pi=5&\\_5\\_id=788&\\_5\\_PageIndex=0&\\_5\\_groupId=201&\\_5\\_newsCategory=&\\_5\\_action=ShowNewsFull&pl=29-5.0](http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=29&pi=5&_5_id=788&_5_PageIndex=0&_5_groupId=201&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=29-5.0). (5.9.2011).

IVZ, 2007. Legionela. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. [http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=165&pi=5&\\_5\\_id=972&\\_5\\_PageIndex=5&\\_5\\_groupId=298&\\_5\\_newsCategory=&\\_5\\_action=ShowNewsFull&pl=165-5.0](http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=165&pi=5&_5_id=972&_5_PageIndex=5&_5_groupId=298&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=165-5.0). (8.8.2011).

IVZ, 2008. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. Priporočila za preprečevanje razmnoževanja legionel v internem vodovodnem omrežju.

[http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=115&pi=5&\\_5\\_id=396&\\_5\\_PageIndex=0&\\_5\\_groupId=245&\\_5\\_newsCategory=&\\_5\\_action=ShowNewsFull&pl=115-5.0](http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=115&pi=5&_5_id=396&_5_PageIndex=0&_5_groupId=245&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=115-5.0). (8.8.2011).

IVZ, 2010. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. Priprava pitne vode.  
[http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=115&\\_5\\_id=410&\\_5\\_action=ShowNewsFull](http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=115&_5_id=410&_5_action=ShowNewsFull) (20.1.2013).

Jahan, M., Holley, R. A. 2014. Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. *International Journal of Food Microbiology* 17: 65-69.

Janssens, J. C. A., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J. 2008. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6639-6648.

Janjaroen, D. S. 2013. Role of disinfectants and pipe materials on bacterial adhesion onto biofilms. Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign; 113-115.

Jaryszak, E. M., Sampson, E. M., Antonelli, P. J. 2009. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on ossicular reconstruction prostheses. *American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery* 30: 367-370.

Jefferson, K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236: 163-173.

Joseph, C. 2004. Legionnaires disease in Europe 2000-2002. *Epidemiology and Infections* 132: 417-424.

Joseph, C. 2013. Investigation of Outbreaks: Epidemiology. V: Buchrieser, C., Hilbi, H. (ur.). *Legionella. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Springer Science, Humana Press: str. 73-75.

Joseph, C., Lee, J., van Wijngaarden, J., Drasar, V., Castellani-Pastoris, M. 2001. European Guidelines for the control and prevention of travel associated legionnaires' disease. EWGLI – EC DG Health and Consumer Protection: str. 1-66.

Joshi, A. D., Swanson M. S. 1999. Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infection and Immunity* 67,8: 4134-4142.

Katsikogianni M., Missirlis Y. F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials* 8: 37-57.

Kilvington, S., Price, J. 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *The Journal of Applied Bacteriology* 68: 519-525.

Kohler, R., Fanghänel, J., König, B., Lüneberg, E., Frosch, M., Rahfeld, J. U., Hilgenfeld, R., Fischer, G., Hacker, J., Steinert, M. 2003. Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 71, 8: 4389-4397.

Koide, M., Saito, A., Okazaki, M., Umeda, B., Benson, R. F. 1999. Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting soils in Japan. *Clinical Infectious Diseases* 29: 943-944.

Komaromy, A., Boysen, R. I., Zhang, H., Hearn, M. T. W., Nicolau, D. V. 2007. Effect of various artificial surfaces on the colonization and viability of *E. coli* and *S. aureus*. *BioMEMS and Nanotechnology III* 6799: 1-10.

Kompare, B., Zagajšek, A., Planinšek, A., Drev, D. 2010. Problematika kakovosti vode iz vodomatov. V: Zbornik referatov, Vodni dnevi 2010. Ljubljana: 35- 64.

Kormas, K. A., Neofitou, C., Pachiadaki, M., Koufostathi, E. 2010. Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system. *Environmental Monitoring and Assessment* 165: 27-38.

Kouider, N., Hamadi, F., Mallouki, B., Bengourram, J., Mabrouki, M., Zekraoui, M., Ellouali, M., Latrache, H. 2010. Effect of stainless steel surface roughness on *Staphylococcus aureus* adhesion. *International Journal of Pure and Applied Science* 4, 1: 1-7.

Kozak, N. A., Lucas, C. E., Winchell, J. M. 2013. Identification of *Legionella* in the Environment. V: Buchrieser, C., Hilbi, H. (ur.). *Legionella, Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media, New York: str. 3-25.

Kramer, M. H., Ford, T. E. 1994. Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease. *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine* 195, 5-6: 470-482.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H. 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 4: 381-386.

Kuiper, M. W. 2006. Occurrence of *Legionella pneumophila* and *Hartmannella vermiformis* in fresh water environments and their interactions in biofilms. Wageningen, The Netherlands: str. 10.

Lee, G. F., Jones-Lee, A. 1993. Public health significance of waterborne pathogens in domestic water supplies and reclaimed water, report to state of California environmental protection agency comparative risk project, Berkeley, CA, str. 27.

Lee, S., Lee, J. 2013. Outbreak Investigations and Identification of *Legionella* in Contaminated Water. V: Buchrieser, C., Hilbi, H. (ur.). *Legionella. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Springer Science, Humana Press: str. 87-88.

Lenassi, M., Podboršek, A. 2012. Predstavitev znanih tehničnih možnosti zmanjšanja širjenja legionele v prezračevalno - klimatskih in vodovodnih sistemih. [http://www.izs.si/fileadmin/dokumenti/publikacijeIZS/Prirocniki\\_IZS/Priroc\\_\\_nik\\_Legionela\\_final\\_web.pdf](http://www.izs.si/fileadmin/dokumenti/publikacijeIZS/Prirocniki_IZS/Priroc__nik_Legionela_final_web.pdf). IZS. 16. 05. 2013.

Leoni, E., Legnani, P. P., Bucci Sabattini, M. A., Righi, F. 2001. Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. *Water Research* 35: 3749-3753.

Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P. P., Sacchetti, R., Stampi, S., Zanetti, F. 2005. *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *Journal of Applied Microbiology* 98, 2: 373-379.

Letterman R. D. (ed). 1999. *Water quality and treatment handbook. A handbook of community water supplies.* American Water Works Association. McGraw-Hill, Donnelley & Sons Co., New York: str. 1073-1163.

Li, B., Logan, B. E. 2004. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 36: 81-90.

Likar, M. 2002. Legionarska bolezen. *Ujma* 16: 191-194.

Liles, M. R., Viswanathan, V. K., Cianciotto, N. P. 1998. Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infection and Immunity* 66, 4: 1776-1782.

Lin, Y. E., Vidic, R. D., Stout, J. E., Yu, V. L. 1998a. *Legionella* in water distribution systems. *Journal American Water Works Association* 90: 112-21.

Lin, Y. E., Stout J. E., Yu, V. L., Vidic, R. D. 1998b. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Seminars in Respiratory Infections* 13, 2: 147-159.

Lin, Y. E., Yu V. L., Vidic, R. D., States, S. J. 2000. Discussion of Monochloramine and Legionnaires' disease. *Journal American Water Works Association* 92, 10: 88-90.

Lin, Y. E., Vidic, R. D., Stout, J. E., Yu, V. L. 2002. Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*. *Applied & Environmental Microbiology* 6, 86: 2711-2715.

Lin, Y. E., Stout, J. E., Yu, V. L. 2011. Controlling *Legionella* in Hospital Drinking Water: An Evidence-Based Review of Disinfection Methods. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 32, 2: 166-173.

Linee guida, 2005. Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. *Gazzetta ufficiale della repubblica Italiana, Serie generale* 103: 4-8.

Liu, Y., Tay, J. H. 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36: 1653-1665.

Liu Z, Lin YE, Stout JE, et al. 2006. Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. *Journal of Applied Microbiology* 101: 437-442.

Liu Y., Li J. 2008. Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media. *Environmental Science and Technology* 42, 2: 443-449.

Liu, S. Q., Yang, C., Huang, Y., Ding, X., Li, Y., Fan, W. M., Hedrick, J. L., Yang, Y.Y. 2012. Antimicrobial and antifouling hydrogels formed in situ from polycarbonate and poly(ethylene glycol) via Michael addition. *Advanced Materials* 24: 6484-6489.

Logsdan, G., Hess, A., Harsley, M. 2009. Guide to selection of water treatment processes. V: Letterman, R. D. (ur.) Guide to selection of water treatment processes. *Handbook of water treatment*. McGraw-Hill, ch. 3.

Lüneberg, E., Mayer, B., Daryab, N., Kooistra, O., Zähringer, U., Rohde, M., Swanson, J., Frosch, M. 2001. Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 39, 5: 1259-1271.

Lüneberg, E., Zähringer, U., Knirel, Y. A., Steinmann, D., Hartmann, M., Steinmetz, I., Rohde, M., Köhl, J., Frosch, M. 1998. Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1: 49-60.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. (ur) 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson International Edition, San Francisco, USA, p.68.

Mains, C. 2008. Biofilm Control in Distribution Sistem. *National Environmental Services Center* 8, 2: 1-4.

Makin, S. A., Beveridge, T. J. 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 142: 299-307.

Marie, T. J., Haldane, D., MacDonald, S. in sod. 1991. Control of endemic nosocomial legionnaires' disease by using potable water for high risk patients. *Epidemiology & Infection* 107: 591-605.

Marion-Ferey, K., Pasmore, M., Stoodley, P., Wilson, S. Husson, G. P., Costerton, J. W. 2002. Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection* 53: 64-71.

Marmur, A. 2003. Wetting on hydrophobic rough surfaces: to be heterogeneous or not to be? *Langmuir* 19: 8343-8348.

Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of genetic microbiology* 68: 337-348.

McDaniel, J. A., Capone, G. 1985. A comparison of procedures for the separation of aquatic bacteria from sediments for subn-sequent direct enumeration. *Journal of Microbiological Methods* 3: 291-302.

Merriam, J. J., Mathur, R., Maxfield-Boumil, R., Isberg, R. R. 1997. Analysis of the *Legionella pneumophila* *fliI* gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infection and Immunity* 65, 6: 2497-2501.

MMWR 1997. Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46, 1: 1-79.

Modic, J. 1995. Odpadne toplote in hladilni procesi. Slovensko društvo hladilne tehnike. str. 156-163.

Moos, C. W., Weaver, R. E., Dees, S. B., Cherry, W. B. 1977. Cellular Fatty Acid Composition of Isolates from Legionnaires Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 6, 2: 140-143.

Moritz, M.M., Flemming, H., Wingender, J. 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal Hygiene Environmental Health* 213: 190-197.

Morton, S. 1986. Outbreak of Legionnaires' disease from a cooling water sistem in a power station. *Brish Journal of Industrial Medicine* 43: 630-635.

Mosadegh-Sedghi, S., Rodrigue, D., Brisson, J. Iliuta, M. C. 2014. Wetting phenomenon in membrane contactors - Causes and prevention. *Journal of Membrane Science* 452: 332-353.

Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S., Donlan, R. M. 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147: 3121-3126.

Musič, D. 2009. Preprečevanje legioneloz v bolnišničnem okolju. Ljubljana: Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije: str. 40-47.



Mülazimoglu, L., Yu, V. L. 2001. Can Legionnaires' disease be diagnosed by clinical criteria? *Chest Journal* 120, 4 :1049-1053.

Neumeister, B., Faigle, M., Sommer, M., Zähringer, U., Stelter, F., Menzel, R., in sod.1998. Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infection and Immunity* 66: 4151-4157.

Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R., Hartland, E. L. 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 2: 274-298.

Nguyen, T. M. N., Ilef, D., Jarraud, S. in sod. 2006. A community - wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers - how far can contaminated aerosols spread? *Journal of Infectious Diseases*, 193, 1: 102-111.

Niquette, P., Servais, P., Savoie, R., 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Research*, 34: 1952-1958.

Nostro, A., Canatelli, M. A. 2004. Modification of hydrophobicity in vitro adherence and cellular aggregation. *Letters in Applied Microbiology* 38: 423- 427.

Oasis. Navodilo za uporabo. Water Purification Tablets, Hydrochem, Anglija. Tablete za pripravo vode z dikloroizocianurno kislino;

Oder, M., Kompare, B., Bohinc, K., Godič, Torkar, K. 2015. The impact of material surface roughness and temperature on the adhesion of *Legionella pneumophila* to contact surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 25, 5: 469-479.

Oliveira, D. R. 1992. Physico-chemical aspects of adhesion. *Biofilms Science and Technology* 223: 45-58.

Ortiz-Roque, C. M., Hazen, T. C. 1987. Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2231-2236.

OSHA, 1999. Technical Manual. <http://www.osha-slc.gov>. (20.5.2012)

O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., Kolter, R. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymology* 310: 91-109.

Pitt, W. G., McBride, M. O., Barton, A. J., Sagers, R. D. 1993. Airwater interface displaces adsorbed bacteria, *Biomaterials* 14: 605-608.

Poberžnik, M., Bauman, M., Lobnik, A. 2010. Membrane technology. *Ekolist* 7: 23-26.

Pravilnik o minimalnih higienskih in drugih zahtevah za kopalne vode, 2003. Ur. L. RS št. 73/2003.

Pravilnik o pitni vodi, 2004. Ur. L. RS št. 19/2004 in spremembe: 35/2004, 26/2006, 92/2006, 25/2009.

Pravilnik o prezračevanju in klimatizaciji stavb, 2002. Ur. L. RS št. 42/2002.

Pravinkumar, S. J., Edwards, G., Lindsay, D. in sod. 2010. A cluster of Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* linked to potting compost in Scotland, 2008-2009. *Eurosurveillance* 15: 194-196.

Quiryneen, M., Vandermei, H. C., Bollen, C. M. L., Schotte, A., Marechal, M., Doornbusch, G. I., Naert, I., Busscher, H. J., Vansteenberghe, D. 1994. The influence of surface-free energy on supragingival and subgingival plaque microbiology—An in-vivo study on implants. *Journal of Periodontology* 65: 162-167.

R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.  
<http://www.R-project.org/>. (15.3.2014).

Rendueles, O., Ghigo, J. M. 2012. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 972-989.

Riboldi-Tunncliffe, A., König, B., Jessen, S., Weiss, M. S., Rahfeld, J., Hacker, J., Fischer, G., Hilgenfeld, R. 2001. Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*. *Nature Structural & Molecular Biology* 8, 9: 779-783.

Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Filion, L. G., Sattar, S. A. 2001. Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science and Technology* 43: 99-102.

Robey, M., Cianciotto, N. P. 2002. *Legionella pneumophila feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infection and Immunity* 70, 10: 5659-5669.

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., Keevil, C. W. 1994a. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1842-1851.

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., Keevil, C. W. 1994b. Influence of temperature and plumbing materials selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1585-1592.

Rohr, U., Senger, M., Fidelis S., Turley, R., Wilhelm, M. 1999. Four Years of Experience with Silver-Copper Ionization for Control of *Legionella* in a German University Hospital Hot Water Plumbing System. *Clinical Infectious Diseases* 29: 1507-1511.

Rosenberg, M., Gutnik, D., Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9: 29-33.

Rosenberg, M., Kjelleberg, S. 1986. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. V: Marshal, K. C. (ur). *Advances in Microbial Ecology*. Springer Science Business Media, New York: str. 353-393.

Rossier, O., Cianciotto, N. P. 2001. Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 69, 4: 2092-2098.

Rossier, O., Starkenburg, S. R., Cianciotto, N. P. 2004. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infection and Immunity* 72, 1: 310-321.

Ruef, C., Francioli, P. 1997. Pravention der nosokomialen *Legionellen* infektion. *Swiss NOSO Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene: Aktuelle Aspekte* 4, 2: 9-12.

Rutala, W.A., Weber D. J. 1997. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 4: 597-610.

Sabria. M., Mòdol, J. M., Garcia-Nuñez, M., Reynaga, E., Pedro-Botet, M. L., Sopena, N., Rey-Joly, C. 2004. Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease: a 5-year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 25: 1072-1076.

Sadosky, A. B., Wilson, J. W., Steinman, H. M., Shuman, H. A. 1994. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *Journal of Bacteriology* 176, 12: 3790-3799.

Sauer, J. D., Bachman, M. A., Swanson, M. S. 2005. The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 28: 9924-9929.

SCBPS, 2005. Canadian Standing Committee on Building and Plumbing Services. Report of the SCBPS: Hot Water Delivery in Building: str. 1-28.

Serrano-Suárez, A., Dellundé, J., Salvadó, H., Cervero-Aragó, S., Méndez, J., Canals, O., Blanco, S., Arcas, A., Araujo, R. 2013. Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. Environmental Science and Pollution Research 20: 5534-5544.

Sheehan, K. B., Henson, J. M., Ferris, M. J. 2005. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. Applied and Environmental Microbiology 71: 507-511.

Shi, X., Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science & Technology 4, 9: 407-413.

Simões, L.C., Simões, M., Oliveira, R., Vieira, M.J., 2007a. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. Journal of Basic Microbiology 47: 174-83.

Simões, M., Pereira, M. O., Sillankorva, S., Azeredo, J., Vieira, M. J. 2007b. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm 23: 249-258.

Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. Food Science and Technology 43: 573-583.

SIST EN 1212: 2005. Kemikalije, ki se uporabljajo za pripravo pitne vode – Natrijev polifosfat.

SIST ISO 11731:1999. Kakovost vode – Ugotavljanje prisotnosti in števila legionel.

Soderberg, M. A., Rossier, O., Cianciotto, N. P. 2004. The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology* 186, 12: 3712-3720.

Stewart, P. S., Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.

St John, G., Steinman, H. M. 1996. Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *Journal of Bacteriology* 178, 6: 1578-1584.

Stone, B. J., Abu Kwaik, Y. 1998. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 66, 4: 1768-1775.

Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 26, 2: 149-162.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews of Microbiology* 56: 187-209.

Stout, J. E., Yu, V. L., Best, M. G. 1985. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 49: 221-228.

Stout, J. E., Yu, V. L., Yee, Y. C., Vaccarello, S., Diven, W., Lee, T. C. 1992. Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired legionnaires' disease. *The New England Journal of Medicine* 326: 151-155.

Stout, J.E., Yu, V.L. 1997. Legionellosis. *New England Journal of Medicine* 337: 682-687.

Stout, J. E., Yu, V. L. 2003. Experiences of the First 16 Hospitals Using Copper-Silver Ionization for *Legionella* Control: Implications for the Evaluation of Other Disinfection Modalities. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24, 8: 563-568.

Subramani, A., Huang, X., Hoek, E.M. 2009. Direct observation of bacterial deposition onto clean and organic-fouled polyamide membranes. *Journal of Colloid Interface Science* 336: 13-20.

Surman-Lee, S., Fields, B., Hornei, B. 2007. Ecology and environmental sources of *Legionella*. V: Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., Surman-Lee, S. (ur.). *Legionella and the prevention of legionellosis*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO Press: str. 29-38.

Swanson, M. S., Hammer, B. K. 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology* 54: 567-613.

Štern, 2012. Bakrene cevi. <http://www.stern.si/Ponudba/Bakrene-cevi> . (15.1.2012).

Tahmourespour, A., Kermanshahi, R. K., Salehi, R., Nabinejad, A. 2008. The Relationship between Cell Surface Hydrophobicity and Antibiotic Resistance of *Streptococcus* Strains Isolated from Dental Plaque and Caries. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 10, 4: 251-255.

Tai, J., Bencherkroun, M. N., Ennaji, M. M., Mekour, M., Cohen, N. 2012. Nosocomial Legionnaires' Disease: Risk and Prevention. *Frontiers in Science* 2: 62-75.

Tan, S. Y. E., Chew, S. C., Tan, S. Y. Y., Givskov, M., Yang, L. 2014. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 1-6.

Taylor, J. H., Holah, J. T. 1996. A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 262-266.

Teodósio, J. S., Simões, M., Melo, L. F., Mergulhão, 2011. Flow cell hydrodynamics and their effects on *E.coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 27: 1-11.

Teixeira, P., Silva, S., Araújo, F., Azeredo, J., Oliveira, R. 2007. V: Mendez-Vilas, A. (ur.). *Bacterial Adhesion to Food Contacting Surfaces. Topics and Trends in Applied Microbiology.* Formatex, Portugal: str. 13-20.

TKI Hrastnik 2006. Tehnični list, Microfos SH: str. 1.

Tobin, O'H. J., Swann, R. A., Bartlett, C. L. R. 1981. Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems: method and preliminary results. *British Medical Journal* 282: 515-517.

Totra, 2011. Polipropilenske cevi za vodo.

<http://www.totraplastika.si/default.cfm?Jezik=Sl&Kat=02&ID=2> (10.12.2011).

Travis, T.C., Brown, E.W., Peruski, L.F. in sod. 2012. Survey of *Legionella* species found in Thai soil, *International Journal of Microbiology* 2012: 218-791.

Tsvetanova, Z. 2006. Study of Biofilm Formation on Different Tube Materials in a Model of Drinking Water Distribution System and its Impact on Microbiological Water Quality V: Simeonov, L., Chirila, E. (ur.). *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats.* Springer, Netherlands: str. 463-469.

Türetgen, I., Cotuk, A. 2007. Monitoring of biofilm-associated *Legionella pneumophila* on different substrata in model cooling tower system. *Environmental Monitoring and Assessment* 125: 271-279.

Van Der Mei, H. C., Rosenberg, M, Busscher, H. J. 1991. Assessment of microbial cell surface hydrophobicity. *Microbial Cell Surface Analysis* 6: 263-287.



Van Houdt, R., Michiels, C. W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1117-1131.

Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A. J. B. 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecology* 17: 1-15.

Vella, C. E. E. 1978. Legionnaires' disease: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 71: 361-368.

Velonakis, E. N., Kiouisi, I. M., Koutis, C., Papadogiannakis, E., Babatsikou, F., Vatopoulos, A. 2009. First isolation of *Legionella* species, including *L. pneumophila* serogroup 1, in Greek potting soils: possible importance for public health. *Clinical Microbiology and Infection* 16: 761-766.

Vickery, K., Pajkos, A., Cossart, Y. 2004. Removal of biofilm from endoscopes: Evaluation of detergent efficiency. *American Journal of Infection Control* 32, 3: 170-176.

Viswanathan, V. K., Edelstein, P. H., Pope, C. D., Cianciotto, N. P. 2000. The *Legionella pneumophila iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infection and Immunity* 68, 3: 1069-1079.

Viswanathan, V. K., Kurtz, S., Pedersen, L. L., Abu-Kwaik, Y., Krcmarik, K., Mody, S., Cianciotto, N. P. 2002. The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assimilation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequence element. *Infection and Immunity* 70, 4: 1842-1852.

Vo, G. D., Heys, J. 2011. Biofilm deformation in response to fluid flow in capillaries. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 1893-1899.

Wagner, M., Manz, B., Volke, F., Neu, T. R., Horn, H. 2010. Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 107: 172-181.

Water treatment handbook – Onedo Degremont II. 2009.

<http://www.scribd.com/doc/18177606/Water-Treatment-Handbook-Onedo-Degremont-II#scribd> (5. 8. 2015)

WHO, 2002. Collaborating Centre for Health Promoting Water Management and Risk Communication, Bonn, Germany. 2: 1-16.

WHO, 2004. Guidelines for Drinking Water Quality, Recommendations, 3rd ed. Vol. 1. Geneva. str. 37-45, 48-82, 121-182, 233-235, 324-364.

Winn, W.C. Jr. 1988. Legionnaires disease: Historical Perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 1, 1: 60-81.

Wingender, J. 2011. Hygienically Relevant Microorganisms in Biofilms of Man-Made Water Systems. V: Flemming H.C. Wingender J., Szewzyk U. (ur.). *Biofilm Highlights*. Springer: str. 189-238.

Witten, T. A. 2004. *Structured fluids*. Oxford University Press, Oxford, str 199.

Weinstein, R. A. 2001. Device-related infections. *Clinical Infectious Diseases* 33, 8: 1386-1398.

Woodhead, M. A., Macfarlane, J. T. 1987. Comparative clinical and laboratory features of *Legionella* with pneumococcal and *Mycoplasma pneumoniae*. *British Journal of Diseases of the Chest* 81: 133-139.

Yamamoto, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. 1996. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. FEMS Microbiology Ecology 20: 149-154.

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Song, Z., Hoiby, N., Molin, S., Givskov, M. 2012. Combating biofilms. FEMS Immunology and Medical Microbiology 65: 146-157.

Yaradou, D.F., Hallier-Soulier, S., Moreau, S. in sod.2007. Integrated Real-Time PCR for Detection and Monitoring of *Legionella pneumophila* in Water Systems. Applied and Environmental Microbiology 73: 1452-1456.

Yu, V. L. 2000. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). V: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. (ur.). Principles and practice of infectious diseases, Philadelphia, Churchill Livingstone: str. 2424-2435.

Zagožen, M. 2011. PE cevi. [http://www.zagozen.si/filelib/zagozen/vodovod/cevi\\_pe.pdf](http://www.zagozen.si/filelib/zagozen/vodovod/cevi_pe.pdf) (10.12.2011).

Zeraik, A. E., Nitschke, M. 2010. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity. Current Microbiology 61: 554-559.

Zeraik, A. E., Nitschke, M. 2012. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. Brazilian Archives of Biology and Technology 55: 569-576.

Zhang, B. Z., Mocciani, C., Hanrahan, J., Jencson, A., Joyce, D., Fyffe, S., Pieszynski, S., Hawks, R., Stouth, J. E., Yu, V. L., Vidic, R. D. 2009. *Legionella* control by chlorine dioxide in hospital water systems. Journal American Water Works Association 101, 5: 117-127.

Zhao, Q., Liu, Y., Wang, C., Wang, S. 2007. Bacterial adhesion on silicon-doped diamond-like carbon films. Diamond & Related Materials 16: 1682-1687.

Zhao, W., Walker, L., Huang, Q., Peng, C. 2014. Adhesion of bacteria pathogens to soil colloidal particles: Influences of cell type, natural organic matter, and solution chemistry. *Water Research* 53: 35-46.

ZZV NM, 2006. Poročilo o preizkušanju, Sanitarno kemični laboratorij Zavoda za zdravstveno varstvo Novo mesto.



## PRILOGA A:

Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila pri temperaturi 15 °C in 36 °C za pet časov inkubacije na različnih materialih (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multialpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev).

Material	Čas inkubacije	OD 36	OD 15	Razlika OD	t-vrednost	p-vrednost
PP-R	24 ur	0,00780	0,00532	0,002484	1,864914	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,00801	0,00645	0,001569	1,014785	$p > 0,05$
PE		0,01099	0,00678	0,004212	2,839963	$p < 0,05$
Cu		0,02064	0,01913	0,001517	0,616991	$p > 0,05$
Zn		0,09252	0,07629	0,016233	1,099038	$p > 0,05$
PP-R	48 ur	0,00812	0,00545	0,002665	1,693476	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,00821	0,00668	0,001534	1,108871	$p > 0,05$
PE		0,01137	0,00885	0,002518	2,075047	$p < 0,05$
Cu		0,03981	0,01972	0,020093	5,366836	$p < 0,001$
Zn		0,09109	0,14637	-0,055280	-2,350370	$p < 0,05$
PP-R	72 ur	0,00813	0,00851	0,000375	-0,321460	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,01253	0,00974	0,002799	1,130186	$p > 0,05$
PE		0,01418	0,00973	0,004446	4,380336	$p < 0,001$
Cu		0,04961	0,02699	0,022619	3,510427	$p < 0,05$
Zn		0,08644	0,15676	-0,070310	-4,574500	$p < 0,001$
PP-R	96 ur	0,01182	0,01038	0,00143	1,325035	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,02751	0,01344	0,01407	4,554654	$p < 0,001$
PE		0,01454	0,01050	0,00404	1,849207	$p > 0,05$
Cu		0,09109	0,03912	0,05197	5,177689	$p < 0,001$
Zn		0,16495	0,19919	-0,03424	-2,629370	$p < 0,05$
PP-R	120 ur	0,01181	0,01116	0,00065	-0,289200	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,03357	0,01813	0,01544	-5,056630	$p < 0,001$
PE		0,02240	0,01110	0,01130	-6,579690	$p < 0,001$
Cu		0,14200	0,05388	0,08812	-6,157270	$p < 0,001$
Zn		0,28105	0,19941	0,08163	-3,661410	$p < 0,05$

Legenda: OD 36: optična gostota pri temperaturi inkubacije 36 °C ; OD 15: optična gostota pri temperaturi inkubacije 15 °C.

## PRILOGA B

Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih bakterijskih celic na površinah pri temperaturi 36 °C in 55 °C za pet časov inkubacije na različnih materialih (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev).

Material	Čas inkubacije	OD36	OD55	Razlika OD	t-vrednost	p-vrednost
PP-R	24 ur	0,007782	0,004789	0,00299378	1,906122	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,007439	0,007886	-0,00044717	-0,237650	$p > 0,05$
PE		0,010997	0,006371	0,00462573	3,427713	$p < 0,05$
Cu		0,020696	0,014533	0,00616318	2,072831	$p > 0,05$
Zn		0,091384	0,108512	-0,01712780	-1,402930	$p > 0,05$
PP-R	48 ur	0,008746	0,005374	0,00337255	1,925350	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,008301	0,00792	0,00038043	0,293272	$p > 0,05$
PE		0,01142	0,005146	0,00627465	4,964275	$p < 0,001$
Cu		0,039402	0,047303	-0,00790051	-1,925790	$p > 0,05$
Zn		0,091093	0,181003	-0,08991066	-7,324400	$p < 0,001$
PP-R	72 ur	0,008513	0,007294	0,00121873	0,915433	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,012536	0,01627	-0,00373333	-1,691560	$p > 0,05$
PE		0,01418	0,006404	0,00777607	6,365632	$p < 0,001$
Cu		0,045052	0,111959	-0,06690762	-7,736660	$p < 0,001$
Zn		0,098617	0,171088	-0,07247173	-5,037580	$p < 0,001$
PP-R	96 ur	0,011404	0,011345	$5,8792 \cdot 10^{-5}$	0,066673	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,027283	0,017422	0,00986174	3,156577	$p > 0,05$
PE		0,01454	0,007315	0,00722518	3,497609	$p < 0,05$
Cu		0,091095	0,12937	-0,03827562	-3,679720	$p < 0,05$
Zn		0,164955	0,218674	-0,05371932	-3,062170	$p < 0,05$
PP-R	120 ur	0,011737	0,013273	-0,00153599	-0,431120	$p < 0,05$
Pex-Al-Pex		0,033104	0,017601	0,01550353	12,513980	$p < 0,001$
PE		0,022851	0,008702	0,01414929	6,683840	$p < 0,001$
Cu		0,142	0,130661	0,01133957	0,811221	$p > 0,05$
Zn		0,281047	0,263385	0,01766132	0,789612	$p > 0,05$

Legenda: OD36: optična gostota pri temperaturi inkubacije 36 °C ; OD55: optična gostota pri temperaturi inkubacije 55 °C.

PRILOGA C

Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih celic na površinah z dodanim razkužilom dikloroizocianurno kislino in brez njega, za pet časa inkubacije na različnih materialih (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multidalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev)..

Material	Čas inkubacije	OD brez sredstva	OD s sredstvom	Razlika OD	t-vrednost	p-vrednost
PP-R	24 ur	0,007688	0,006195	0,001494	1,02907	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,006466	0,005902	0,000564	0,46837	$p > 0,05$
PE		0,010642	0,005992	0,00465	2,45926	$p < 0,05$
Cu		0,021632	0,014140	0,007492	3,07850	$p < 0,05$
Zn		0,091877	0,056771	0,035107	2,16433	$p < 0,05$
PP-R	48 ur	0,009051	0,006891	0,00216	1,38986	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,008797	0,006188	0,002609	1,53239	$p > 0,05$
PE		0,011698	0,013941	-0,00224	-1,31942	$p > 0,05$
Cu		0,040427	0,039528	0,0009	0,08888	$p > 0,05$
Zn		0,088116	0,202203	-0,11409	-4,55739	$p < 0,001$
PP-R	72 ur	0,008131	0,024023	-0,01589	-13,42850	$p < 0,001$
Pex-Al-Pex		0,012536	0,021416	-0,00888	-5,05217	$p < 0,001$
PE		0,014180	0,043690	-0,02951	-12,27940	$p < 0,001$
Cu		0,044608	0,068339	-0,02373	-2,58010	$p < 0,05$
Zn		0,091698	0,271962	-0,18026	-8,96263	$p < 0,001$
PP-R	96 ur	0,011404	0,076778	$5,8792 \cdot 10^{-5}$	-15,8531	$p < 0,001$
Pex-Al-Pex		0,027283	0,021139	0,00986174	2,707779	$p < 0,05$
PE		0,014540	0,105933	0,00722518	-11,4121	$p < 0,001$
Cu		0,091095	0,123619	-0,03827562	-2,05963	$p > 0,05$
Zn		0,164955	0,371530	-0,05371932	-7,01027	$p < 0,001$
PP-R	120 ur	0,011737	0,075552	-0,00153599	-12,1777	$p < 0,001$
Pex-Al-Pex		0,033104	0,022608	0,01550353	5,945200	$p < 0,001$
PE		0,022851	0,118857	0,01414929	-27,1879	$p < 0,001$
Cu		0,142000	0,210076	0,01133957	-2,75725	$p < 0,05$
Zn		0,281047	0,407659	0,01766132	-3,79387	$p < 0,05$

Legenda: OD brez sredstva: optična gostota brez dodane dikloroizocianurno kislino; OD s sredstvom: optična gostota z dodano dikloroizocianurno kislino.



## PRILOGA D

Statistična analiza rezultatov povprečnih vrednosti in razlik izmerjene optične gostote (OD) sproščenega barvila iz oprijetih celic na površinah z dodanim z dodanim sredstvom za mehčanje vode natrijev polifosfat in brez njega, za pet časov inkubacije na različnih materialih (PP-R: polipropilenska cev; Pex-Al-Pex: multitalpex cevi; PE: polietilenska cev; Cu: bakrena cev; Zn: pocinkana cev).

Material	Čas inkubacije	OD brez mehčal	OD mehčala	Razlika OD	t-vrednost	p-vrednost
PP-R	24 ur	0,007803	0,004472	0,003331	2,19401	$p < 0,05$
Pex-Al-Pex		0,008174	0,004346	0,003828	2,79494	$p < 0,05$
PE		0,010997	0,007291	0,003706	1,94041	$p > 0,05$
Cu		0,020644	0,019223	0,001421	0,45113	$p > 0,05$
Zn		0,091384	0,185265	-0,093880	-4,35560	$p < 0,001$
PP-R	48 ur	0,008120	0,005436	0,002684	1,66689	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,008214	0,005223	0,002991	2,19218	$p < 0,05$
PE		0,011370	0,012868	-0,001500	-0,77929	$p > 0,05$
Cu		0,039811	0,068399	-0,028590	-3,03999	$p < 0,05$
Zn		0,091093	0,311725	-0,220630	-12,1604	$p < 0,001$
PP-R	72 ur	0,008131	0,007578	0,000553	0,57771	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,012536	0,005420	0,007116	4,28329	$p < 0,001$
PE		0,014180	0,013974	0,000206	0,22744	$p > 0,05$
Cu		0,045968	0,067524	-0,021560	-3,55676	$p < 0,05$
Zn		0,091698	0,303360	-0,211660	-8,07968	$p < 0,001$
PP-R	96 ur	0,011404	0,011928	-0,000520	-0,23902	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,027505	0,005915	0,021590	9,72845	$p < 0,001$
PE		0,014540	0,019974	-0,005430	-1,43002	$p > 0,05$
Cu		0,091095	0,069360	0,021735	1,91652	$p > 0,05$
Zn		0,164955	0,380667	-0,215710	-11,4740	$p < 0,001$
PP-R	120 ur	0,012664	0,015590	-0,002930	-1,49014	$p > 0,05$
Pex-Al-Pex		0,033544	0,017763	0,015781	8,29506	$p > 0,05$
PE		0,022400	0,016146	0,006254	3,59246	$p < 0,05$
Cu		0,134592	0,070137	0,064455	4,75221	$p < 0,001$
Zn		0,273730	0,443004	-0,169270	-7,85916	$p < 0,001$

Legenda: OD brez mehčal: optična gostota brez dodanega mehčala; OD mehčala: optična gostota z dodanim mehčalom.