

RENATA MATUSZEWSKA, BOŻENA KROGULSKA

WYKRYWANIE I IZOLACJA BAKTERII Z RODZAJU *LEGIONELLA*
ZE ŚRODOWISKA WODNEGODETECTION AND ISOLATION OF BACTERIA OF GENUS *LEGIONELLA*
FROM WATER ENVIRONMENTZakład Higieny Komunalnej
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. S. Maziarka

Przedstawiono wyniki badań dotyczących wyboru optymalnej procedury wykrywania i izolacji bakterii z rodzaju Legionella ze środowiska wodnego. Zastosowano metodę filtracji membranowej. Porównano wzrost bakterii na filtrach celulozowych, poliwęglanowych i z fluorku poliwinylidenu. Określono optymalny czas obróbki wstępnej próbek wody (zakwaszenie, wysoka temperatura), pozwalających na znaczną redukcję mikroflory towarzyszącej przy zachowaniu wzrostu bakterii z rodzaju Legionella.

WSTĘP

Bakterie z rodzaju *Legionella* to tlenowe Gram ujemne pałeczki, które występują powszechnie w naturalnym środowisku wodnym i w glebie, mogą namnażać się również wewnątrz komórek glonów i pierwotniaków [1, 11, 19]. Kolonizują sieć wodociągową wody zimnej i ciepłej, zbiorniki i wodne urządzenia chłodzące oraz klimatyzacyjne, zwłaszcza jeżeli zawierają złogi osadów i rdzy. W systemach dystrybucji wody bakterie te wchodzi w skład biofilmu powstającego na wewnętrznych powierzchniach rur i elementów urządzeń kontaktujących się z wodą [16]. Mogą również występować w kropelkach wodnego mikroaerosolu.

Do rodziny *Legionellaceae* należą 34 gatunki *Legionella* przy czym największym zagrożeniem dla zdrowia człowieka jest *Legionella pneumophila* grupa serologiczna 1. Jest ona czynnikiem etiologicznym tzw. choroby legionistów (legionellozy) charakteryzującej się zapaleniem płuc o bardzo ciężkim przebiegu (10-20% śmiertelności) [12] lub tzw. gorączki Pontiac dającej objawy grypopodobne z samoistnym wyleczeniem.

Bakterie z rodzaju *Legionella* wykazują dużą zdolność adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Wzrost *Legionella* obserwuje się przy pH od 5,5 do 9,2 przy czym optymalny odczyn środowiska powinien wynosić 6,8÷7,0 [1]. Bakterie te rosną w zakresie temperatur 25÷45°C, powyżej 50°C przeważnie giną [1, 20]. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 37°C. Wewnątrz komórek glonów lub pierwotniaków nie tracą zdolności namnażania w temperaturze 45°C, a żywe bakterie izolowane były z komórek glonów nawet przy temperaturze wody 68°C [1].

Bakterie z rodzaju *Legionella* wymagają do wzrostu obecności cysteiny oraz nieorganicznego żelaza (III) [1]. Większość stosowanych do hodowli *Legionella* podłoży zawiera buforowany agar z dodatkiem ekstraktu drożdżowego, węgla aktywowanego i α -ketoglutaranu [5, 6, 7]. Ponadto do podłoży, w celu zwiększenia ich wybiórczości przy izolacji *Legionella* ze środowiska wodnego zaleca się stosowanie różnych antybiotyków [1, 5].

Ze względu na stosunkowo niską koncentrację tych bakterii w wodzie oraz na liczną mikroflorę towarzyszącą wykrywanie i izolacja bakterii z rodzaju *Legionella* ze środowiska wodnego stwarza duże trudności. Aby zwiększyć prawdopodobieństwo izolacji tych bakterii z wody, badane próbki przeważnie zagęszcza się stosując filtrację membranową lub wirowanie [3, 8, 9, 13]. W celu wyeliminowania mikroflory towarzyszącej niektórzy autorzy zalecają obróbkę wstępną badanej próbki wody polegającą na podniesieniu temperatury do 50°C lub zakwaszeniu do pH = 2,2 [2-4].

Ze względu na dużą różnorodność proponowanych metod izolacji i hodowli *Legionella* przeprowadzono badania modelowe, których celem było wybranie optymalnych warunków hodowli oraz opracowanie jednolitej metody izolacji tych bakterii ze środowiska wodnego, którą można byłoby zalecić do rutynowego stosowania przez krajowe służby sanitarne.

MATERIAŁY I METODY

W badaniach stosowano szczepy wzorcowe: *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 oraz *Pseudomonas aeruginosa* – szczep z kolekcji własnej wyizolowany ze środowiska wodnego. Do każdego badania przygotowywano zawiesinę wyjściową z 72 godzinnej hodowli *L. pneumophila* i 24 godzinnej hodowli każdego z pozostałych szczepów o gęstości 5 wg skali McFarlanda, tzn. około $1,5 \times 10^9$ komórek/ml.

Do przygotowania zawiesiny wyjściowej i jej kolejnych rozcieńczeń stosowano czterokrotnie rozcieńczony płyn Ringera. W badaniach stosowano buforowane podłoże agarowe z ekstraktem drożdżowym, cysteiną i węglem aktywowanym (BCYE) o składzie (w g/l): ekstrakt drożdżowy 9,0; węgiel aktywny 3,0; agar 13,0; ACES – bufor (kwas N-2-acetamido-2-amino etanosulfonowy) dwufosforan żelaza (III) 0,25; chlorowodorek L-cysteiny 0,4; sól potasowa α -ketoglutaranu 1,0. Podłoże uzupełniano dodatkiem selektywnym GVPC o składzie: wankomycyna – HCl 1,0 mg/l, polimyksyna B 79200 I.U., cykloheksymid 80 mg/l, glicyna 3,0 g/l. Końcowe pH podłoża kompletnego wynosiło $6,9 \pm 0,1$. W badaniach stosowano również kwaśny bufor HCl-KCl pH $2,2 \pm 0,2$, podłoże Endo i Endo FM dla bakterii coli typu fekalnego [14,15] oraz agar zwykły.

W dalszych badaniach zastosowano niezależnie dwie procedury obróbki wstępnej próbek zawierających szczepy wzorcowe bakterii (procedura A i B).

Procedura A: 10 ml z odpowiedniego rozcieńczenia hodowli każdego ze szczepów mieszano w stosunku 1:1 z kwaśnym buforem HCl-KCl pH $2,2 \pm 0,2$. Zastosowany w doświadczeniach czas kontaktu wynosił 10, 20 i 30 minut. Próbki zawierające szczep *Legionella pneumophila* posiewano powierzchniowo na podłoże GVPC (podłoże BCYE + dodatek selektywny GVPC), próbki z innymi stosowanymi w badaniach szczepami posiewano na agar zwykły. Do próbek kontrolnych zamiast kwaśnego buforu dodawano taką samą objętość płynu Ringera.

Procedura B: 10 ml z odpowiedniego rozcieńczenia hodowli każdego ze szczepów wzorcowych umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 50°C. Po upływie założonego w doświadczeniach czasu ogrzewania (30 i 45 minut) próbki zawierające szczep *Legionella pneumophila* posiewano powierzchniowo na podłoże GVPC (podłoże BCYE + dodatek selektywny

GVPC), próbki z pozostałymi stosowanymi w badaniach szczepami posiewano na agar zwykły. Kontrolę stanowiły takie same rozcieńczenia hodowli każdego ze szczepów nie poddane działaniu podwyższonej temperatury.

Inkubację płytek z posiewami próbek po obróbce wstępnej zgodnie z procedurami A i B prowadzono w temperaturze 37°C, w przypadku szczepu *L. pneumophila* wyniki odczytywano po 72 godzinach, w pozostałych przypadkach po 24 godzinach. Wszystkie posiewy wykonywano w dwóch powtórzeniach.

W serii doświadczeń mających na celu wybór najbardziej odpowiednich filtrów membranowych, zastosowano filtry z mieszanych estrów celulozy, poliwęglanów (typ Isopore), fluorku poliwinylidenu (typ Durapore). Stosowano filtry firmy Millipore o średnicy 47 mm i średnicy porów 0,45 µm. Po przesączeniu odpowiednich rozcieńczeń hodowli szczepu wzorcowego *L. pneumophila* filtry membranowe umieszczano na podłożu GVPC. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C, obserwacje wzrostu kolonii prowadzono codziennie przez 7 dni. Kontrolę stanowiły płytki z posiewem powierzchniowym tych samych hodowli szczepu wzorcowego. Wszystkie posiewy wykonywano w pięciu równoległych powtórzeniach

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

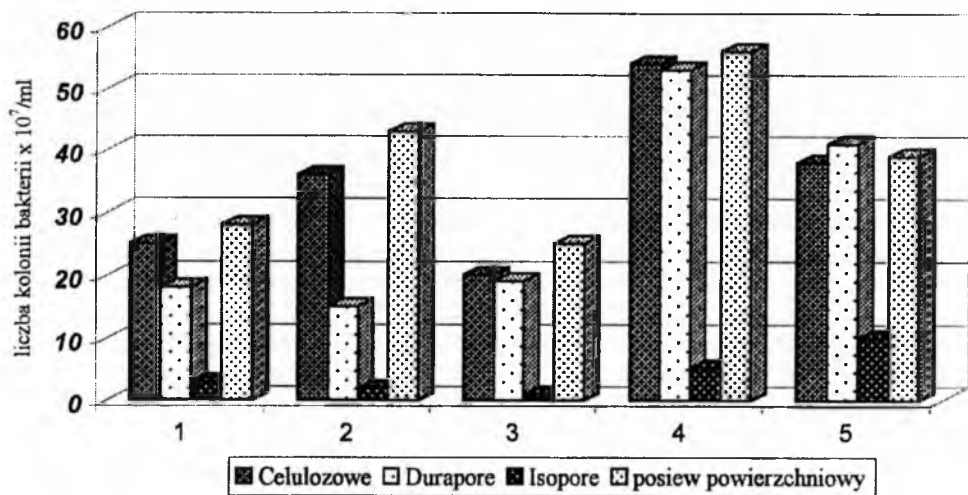
W pierwszym etapie badań sprawdzono skuteczność uwalniania bakterii z filtrów membranowych na drodze sonifikacji i wytrząsania. Połączenie metody zagęszczania próbek wody przez filtrację membranową z posiewem powierzchniowym, po uwolnieniu bakterii z filtrów do płynu *Ringera* stosowali też inni autorzy [3,13,17]. Badania wstępne przeprowadzono na szczepie wzorcowym *E. coli* stosując używane powszechnie w badaniach rutynowych wody filtry celulozowe i podłoże Endo.

W przeprowadzonej serii doświadczeń wytrząsanie w czasie od 1 minut do 10 minut nie przyniosło oczekiwanego efektu. Bakterie pozostawały związane z filtrami, w posiewie powierzchniowym na płytkach rosły jedynie pojedyncze kolonie.

Zastosowanie ultradźwięków w czasie 1 – 4,5 minuty prowadziło tylko do częściowego uwalniania bakterii z filtrów (średni odzysk 46,6%), przy czym kolonie w posiewie powierzchniowym były zniekształcone o rozmytych brzegach, częstokroć dawały wzrost zlewny utrudniający ich policzenie. Trudności z uwalnianiem mikroorganizmów z celulozowych filtrów membranowych opisują też inni autorzy. *Boulanger* i *Edelstein* stopień odzysku bakterii podczas sonifikacji oceniają na 13%, *Smith* i wsp. na 43% [3,17]. Przyczyną, jest prawdopodobnie kręta struktura porów filtrów celulozowych, z tego też względu niektórzy autorzy proponują stosowanie filtrów poliwęglanowych, poliwinylidenowych lub nylonowych charakteryzujących się prostą i gładką budową porów [17].

W dalszej części badań obok filtrów z estrów celulozy zastosowano filtry poliwęglanowe (typu Isopore) oraz filtry z fluorku poliwinylidenu (typu Durapore) przy czym zrezygnowano z etapu uwalniania bakterii z filtrów. Celem doświadczeń była obserwacja wzrostu kolonii szczepu *Legionella pneumophila* ATCC 33152 bezpośrednio na filtrach membranowych umieszczanych na podłożu GVPC i porównanie liczby kolonii bakterii rosnących na filtrach z liczbą kolonii na płytkach kontrolnych z posiewem powierzchniowym. Wyniki z 5-ciu niezależnie przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono na rycinie 1.

Różnice między liczbą kolonii rosnących na filtrach celulozowych, na filtrach typu Durapore i w posiewie powierzchniowym były stosunkowo niewielkie. Wszystkie wyniki mieściły się w tym samym rzędzie wielkości ($1,3 - 5,6 \times 10^8$ /ml). Najmniej kolonii rosło na filtrach typu Isopore ($1,0 \times 10^7 - 1,0 \times 10^8$ /ml). Kolonie *Legionella* w posiewie



Ryc. 1. Porównanie odzysku bakterii *L. pneumophila* na różnych typach filtrów membranowych i w posiewie powierzchniowym

powierzchniowym na podłożu GVPC jak i na filtrach membranowych były błyszczące o gładkich brzegach. Kolonie rosnące bezpośrednio na podłożu GVPC były białe z charakterystyczną przezroczystą strefą. Strefa wokół kolonii była wyraźnie widoczna również na filtrach z fluorku poliwinylidenu (Durapore), przy czym kolonie na tych filtrach były barwy kremowej. Na filtrach celulozowych i poliwęglanowych (Isopore) nie zaobserwowano wokół kolonii *Legionella* stref przejaśnienia, kolonie miały odpowiednio barwę kremową i białą.

Kolonie *Legionella* na filtrach membranowych, niezależnie od typu filtrów, rosły wolniej niż w posiewie powierzchniowym. W posiewie powierzchniowym są wyraźnie widoczne po 3 dniach inkubacji, na filtrach po trzech dniach są zbyt drobne by można było je dokładnie policzyć i scharakteryzować ich morfologię. Obserwacja wzrostu *Legionella* na filtrach membranowych należy prowadzić codziennie pomiędzy 3 a 7 dniem inkubacji.

W niektórych przypadkach dodawanie czynników selektywnych do podłoża hodowlanego może być niewystarczające. Znaczną redukcję mikroflory towarzyszącej można również uzyskać poddając próbki wody przed posiewem działaniu podwyższonej temperatury lub zakwaszeniu. Wyniki badań mających na celu dobranie optymalnego czasu przetrzymywania próbek wody w temperaturze 50°C, po którym następowałaby znaczna redukcja mikroflory towarzyszącej, przy zachowaniu możliwości wzrostu *Legionella* przedstawiono w tabeli I.

Inkubacja zaszczepionych próbek wody w temperaturze 50°C przez 30 minut nie miała znaczącego wpływu na wzrost *Legionella pneumophila*, spowodowała natomiast redukcję wyjściowej liczby komórek *Streptococcus faecalis* o 3 log, *Pseudomonas aeruginosa* o 2 log oraz *Escherichia coli* o 1 log. Przedłużenie czasu przetrzymywania zaszczepionych próbek w temperaturze 50°C do 45 minut spowodowało całkowitą redukcję wyjściowej liczby komórek *E. coli*, *Str. faecalis* oraz *P. aeruginosa*. Po 45 minutach ogrzewania zdolność wzrostu zachowały szczepy *L. pneumophila* i *S. aureus*,

Tabela I. Wzrost szczepów wzorcowych bakterii po różnym czasie inkubacji w łaźni wodnej w temperaturze 50°C
Growth of standard strains after different time of incubation in water bath at 50°C

Szczepy	Liczba kolonii w 1 ml		
	Czas inkubacji w temperaturze 50 ± 1°C (w minutach)		
	0	30	45
<i>E. coli</i> ATCC 35218	5,2 x 10 ⁸	7,3 x 10 ⁷	0
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	3,0 x 10 ⁸	9,5 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷
<i>Str. faecalis</i> ATCC 29212	2,0 x 10 ⁸	5 x 10 ⁵	0
<i>P. aeruginosa</i>	1,2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁶	0
<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	2,7 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁶

przy czym w obu przypadkach nastąpiła redukcja wyjściowej liczby komórek o 1 log. Dziesięciokrotna redukcja liczby komórek *Legionella* jaka następuje podczas 45 minut inkubacji w temperaturze 50°C może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych, w przypadku badania próbek wody zawierających niewielką liczbę komórek tych mikroorganizmów. Dlatego też należy przyjąć, że w badaniach wody w kierunku wykrywania pałeczek *Legionella* optymalnym czasem inkubacji w temperaturze 50°C jest 30 minut. Również Steel i wsp. [18] najkorzystniejsze wyniki izolacji *Legionella* uzyskali po 30 minutowej inkubacji próbek wody w temperaturze 50°C. W doświadczeniach Dennis i wsp. [4] bakterie z rodzaju *Legionella* ginęły w tej temperaturze po 240 minutach inkubacji, bakterie grupy coli po 150 minutach, *Micrococcus* sp. po 90 minutach a *Pseudomonas* sp. po 30 minutach.

Procedurą stosowaną alternatywnie lub równoległe do wysokiej temperatury, mającą na celu redukcję mikroflory towarzyszącej, jest potraktowanie próbek wody kwaśnym buforem o pH 2,2. W przeprowadzonych przez nas badaniach porównano wpływ działania niskiego odczynu pH na szczep wzorcowy *Legionella* oraz inne szczepy bakterii najczęściej występujące w zanieczyszczonych próbkach wody. Celem badania było dobranie optymalnego czasu kontaktu, podczas którego wystąpi wystarczająca redukcja mikroflory towarzyszącej bez znacznego wpływu na wzrost *Legionella*. Wyniki podano w tabeli II.

Inkubację w kwaśnym buforze przeprowadzono w czasie kontaktu 10, 20 i 30 minut. Zaobserwowano, że po 10 minutach następuje całkowita redukcja liczby komórek *Str. faecalis* przy wyjściowej liczbie komórek 1,1 x 10⁸ cfu/ml. W przypadku pozostałych szczepów zanotowano redukcję *E. coli* z 3,9 x 10⁸ do 3,5 x 10⁷ cfu/ml, *S. aureus* z 2,5 x 10⁸ do 1,5 x 10⁶ cfu/ml. Przedłużenie czasu kontaktu tych bakterii z kwaśnym buforem do 20 minut spowodowało całkowitą redukcję ich liczby. Przy najkrótszym z zastosowanych czasie kontaktu (10 minut) redukcja liczby bakterii *P. aeruginosa* i *L. pneumophila* wynosiła odpowiednio z 7,7 x 10⁷ do 4,6 x 10⁷ cfu/ml oraz 2,7 x 10⁷ do 1,3 x 10⁷ cfu/ml. Przedłużenie czasu kontaktu tych szczepów z kwaśnym buforem do 20 minut spowodowało całkowitą redukcję liczby komórek *P. aeruginosa*, natomiast liczba komórek *L. pneumophila* została zredukowana do 2 x 10⁶ cfu/ml.

Tabela II. Wzrost szczepów wzorcowych bakterii po różnym czasie inkubacji z kwaśnym buforem (pH 2,2)
Growth of standard strains after different time of contact with acid buffer (pH 2,2)

Szczepy	Liczba kolonii w 1 ml			
	Czas inkubacji z kwaśnym buforem o pH 2,2 (w minutach)			
	0	10	20	30
<i>E. coli</i> ATCC 35218	$3,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	$2,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	0	0
<i>Str. faecalis</i> ATCC 29212	$1,1 \times 10^8$	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	$7,7 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	0	0
<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	$2,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	2×10^6	0

Przedłużenie czasu inkubacji w buforze o pH 2,2 do 30 minut spowodowało całkowitą redukcję liczby komórek *L. pneumophila*.

Steel i wsp. zaproponowali 5-cio i 10-cio minutowy czas kontaktu próbek z kwaśnym buforem, przy czym skuteczniejszą redukcję mikroflory towarzyszącej uzyskali po 10 minutach [18]. Badania *Bopp'a* i wsp. [2] wykazały oporność *L. pneumophila* na 30 minutowe działanie kwaśnego buforu, przedłużenie czasu kontaktu do 60 minut powodowało dziesięciokrotną redukcję wyjściowej liczby komórek. Ponieważ jednak już po 5 minutach kontaktu następowała stukrotna redukcja liczby bakterii towarzyszących autorzy uznali, że po 5 minutach potraktowanie badanej próbki kwaśnym buforem jest wystarczające dla efektywnej izolacji *Legionella* z zanieczyszczonych próbek wody. Również 5-cio minutowy czas kontaktu badanych próbek z kwaśnym buforem zaleca norma ISO [8]. O wyraźnym wzroście efektywności izolacji *L. pneumophila* z próbek środowiskowych poddawanych obróbce wstępnej kwaśnym buforem donosi *Kusnetsov* [10]. Z zanieczyszczonych próbek wody potraktowanych buforem autor wyizolował do $2,2 \times 10^5$ cfu/ml komórek *Legionella*, podczas gdy z tych samych próbek bez obróbki wstępnej odzysk *Legionella* był co najmniej dziesięciokrotnie niższy. Analizując przedstawione wyniki badań własnych jak również dane z cytowanego piśmiennictwa, wydaje się, że najkorzystniejsze warunki izolacji *Legionella* z próbek wody o spodziewanym dużym zanieczyszczeniu można uzyskać stosując 10 minutowy czas kontaktu z kwaśnym buforem, natomiast przy spodziewanym mniejszym zanieczyszczeniu wystarczający może być 5 minutowy czas kontaktu.

WNIOSKI

1. Próbkę wody przeznaczone do badań, w kierunku wykrywania bakterii z rodzaju *Legionella*, w pierwszym etapie powinny zostać poddane działaniu kwaśnego buforu przez 10 minut lub inkubacji w temperaturze 50°C przez 30 minut.

2. Najkorzystniejszym wariantem wykrywania i izolacji pałeczek *Legionella* ze środowiska wodnego metodą filtracji membranowej jest zastosowanie filtrów z estrów celulozy lub fluorku poliwinylidenu i hodowla bakterii na filtrze umieszczonym bezpośrednio na podłożu BCYE z dodatkami selektywnymi GVPC.

3. Obserwacje wzrostu *Legionella* należy prowadzić codziennie pomiędzy 3 a 7 dniem hodowli. Kolonie rosnące na filtrach membranowych są błyszczące o gładkich brzegach, barwy kremowej lub białej. Na filtrach z fluorku poliwinylidenu wokół kolonii można zaobserwować wyraźną strefę przejaśnienia.

R. Matuszewska, B. Krogulska,

DETECTION AND ISOLATION OF BACTERIA OF GENUS *LEGIONELLA* FROM WATER ENVIRONMENT

Summary

The aim of this work was to find method of isolation of bacteria of genus *Legionella* from water environment. Were used reference strains such as: *L. pneumophila* ATCC 33152, strains of bacteria contaminated water samples: *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 12600, *Str. faecalis* ATCC 29212 and *P. aeruginosa* – strain from own collection, isolated from water environment. Because of the slow growth of bacteria of genus *Legionella* and dangers of contamination the preliminary treatment of examined water samples should be done. Water samples inoculated with standard strains of bacteria before inoculation by plated membrane filtration or plated directly methods were undergone acid pretreatment (acid buffer pH 2,2) and heat pretreatment (temp. 50°C). The contact time used for studies was respectively 10,20,30 min. and 30, 45 min. The best time used for acid treatment procedure was 10 min. , for heat treatment procedure was 30 min. Such adjust parameters of preliminary treatment of water samples should reduce enough growth of non-*Legionella* organisms and not to influence the growth of searched *Legionella* strains. The researches showed that the most succesfull of isolation is membrane filtration method, where filters are directly placed on the culture medium. In studies buffered charcoal yeast extract agar medium with cysteine, activated charcoal and selective supplements were used. The growth of bacteria on the cellulose, polycarbonate and polyvinylidene fluoride filters were compared. The best results were achieved with cellulose and polyvinylidene fluoride filters. Growth of colonies of bacteria on the filters should be examined between 3rd and 7th days of incubation period at 37°C and 90% relative humidity. *Legionella* forming colonies growing on membrane filters are shining with smooth edge, cream or white. On the polyvinylidene fluoride filters around colonies clear zones are observed.

PIŚMIENNICTWO

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Holt J.G. (Ed.) Williams and Wilkins Baltimore, Hong Kong, London, Sydney 1984 Vol 1, 279–288
2. Bopp C.A., Sumner J.W., Morris G.K., Wells J.G.: Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J.Clin.Microb. 1981, 4, 13, 714–719.
3. Boulanger C.A., Edelstein P.H.: Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. Appl. Environ. Microb. 1995, 5, 61, 1805–1809.
4. Dennis P.J., Bartlett C.L.R., Wright A.E.: Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In *Legionella*. Proceedings of the 2nd International Symposium ed. Thornsberry, C. Balows, A. Feeley, J.C. and Jakubowski. 1984a. Washington, DC: American Society for Microbiology.
5. Edelstein P.H.: Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimen. J. Clin. Microb. 1981, 9, 14, 298–303.
6. Edelstein H.: Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. J. Clin. Microb. 1982, 4, 16, 697–699.

7. Feeley J.C., Gibson R.J., Gorman G.W., Langford N.C., Rasheed K.J., Mackel D.C., Baine W.B.: Charcoal-Yeast Extract Agar: Primary isolation Medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microb. 1979, 10, 4, 437–441.
8. ISO/FDIS 11731:1998(E): Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*.
9. ISO/CD 11731–2: 1998: Water quality – Microbiological Methods Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2: Detection in drinking water and treated bathing waters by membrane filtration method.
10. Kusnetsov J.M., Jousimies-Somer H.R., Nevalainen A.I., Martikainen P.J.: Isolation of *Legionella* from water samples using various culture methods. J. Appl. Bakter. 1994, 76, 155–162.
11. Lee J.V., West A.A.: Survival and growth of *Legionella* species in the environment. J. Appl. Bact. Symp. Suppl. 1991, 70, 1215–1219.
12. Magdzik W.: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Zapobieganie i zwalczanie. Ed.II. Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne. Kraków 1993, 197–203.
13. Palmer C.J., Tsai Y.L., Paszko-Kolva C., Mayer C., Sangermano L.R.: Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. Appl. Environ. Microb. 1993, 11, 59, 3618–3624.
14. PN-77/C-04615/05. Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie bakterii grupy coli typu fekalnego metodą fermentacyjną próbkową.
15. PN-77/C-04615/08. Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie bakterii grupy coli typu fekalnego metodą filtrów membranowych.
16. Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W.: Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable Water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microb. 1994, 60, 5, 1585–1592.
17. Smith L., Carroll K., Mottice S.: Comparison of membrane filters for recovery of *Legionellae* from water samples. Appl. Environ. Microb. 1993, 1, 59, 344–346.
18. Steele T.W., Lanser J., Sangster N.: Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. Appl. Environ. Microb. 1990, 1, 56, 49–53.
19. Washington C., Winn Jr.: *Legionella*. Manual of Clinical Microbiology. Sixth ed. Ed. P.R. Murray. ASM PRESS Washington, 1995, 533–544.
20. Yee R.B., Wadowsky R.M.: Multiplication of *Legionella pneumophila* in Unsterilized tap water. Appl. Environ. Microb. 1982, 43, 6, 1330–1334.

Otrzymano: 1999.10.08