



Legionella pneumophila groeit in biofilms uitsluitend in protozoa

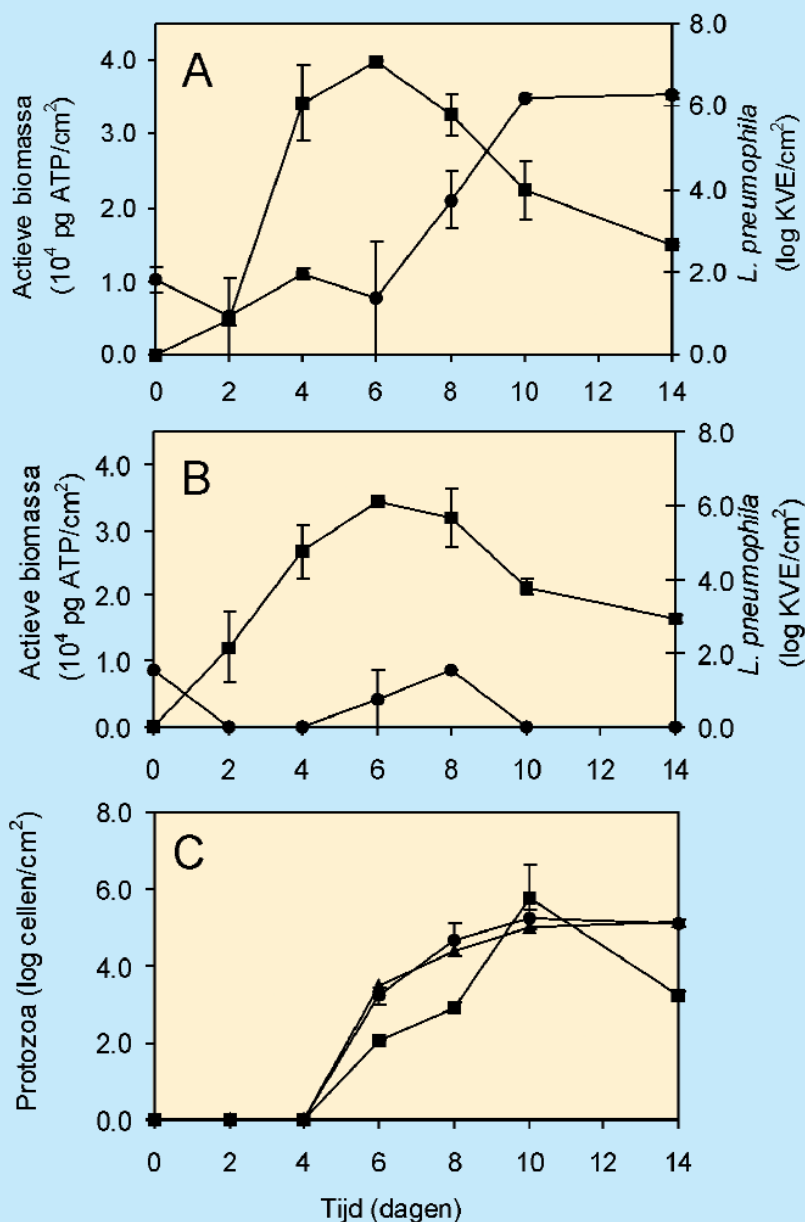
MELANIE KUIPER, WAGENINGEN
UNIVERSITEIT EN RESEARCH CENTRUM
BART WULLINGS, KIWA WATER RESEARCH
DICK VAN DER KOOIJ, KIWA WATER
RESEARCH

Al bijna 25 jaar is bekend dat legionella-bacteriën zich kunnen vermeerderen in protozoa. Nog steeds wordt echter aangenomen dat vermeerdering in biofilms ook mogelijk is op uitscheidingsproducten van bacteriën. Om duidelijkheid te krijgen over de rol van protozoa bij de groei van *Legionella* in leidingwaterinstallaties zijn experimenten uitgevoerd met biofilms gekweekt op stukjes zacht PVC. *Legionella* groeide niet in de biofilms gekweekt zonder protozoa. Met behulp van moleculair-biologische methoden werd aangetoond dat *Legionella* in de biofilm met protozoa zich uitsluitend vermeerderde in amoeben van de soort *Hartmannella vermiformis*. Nadere informatie over de aanwezigheid en het gedrag van protozoa, die in leidingwaterinstallaties als gastheer dienst kunnen doen voor *Legionella*, is nodig voor het definiëren van preventieve en correctieve maatregelen voor de bestrijding van *Legionella*.

Legionella pneumophila is een bacterie met hoge voedingseisen. Toch is dit organisme aanwezig in natuurlijke zoetwatermilieus en in allerlei kunstmatige watersystemen, zoals installaties voor warm tapwater, koeltorens, whirlpools en fontein. Al in 1980 meldde Rowbotham⁵⁾ dat *L. pneumophila* zich op een vaste voedingsbodem kan vermeerderen in de amoëbe *Acanthamoeba castellanii*. Een aantal jaren later toonden Wadowsky en collega's⁷⁾ aan dat groei van *Legionella* in leidingwater bij 35°C alleen optrad in aanwezigheid van bepaalde amoeben. Inmiddels is bekend dat een aantal amoeben (*Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Dictyostelium*) en ook ciliaten (*Tetrahymena pyriformis*) kunnen dienen als gastheer voor *Legionella*¹⁾.

Amoeben en ciliaten zijn protozoa die zich voeden met bacteriën. Deze protozoa grazen op slijm laagjes (biofilm) en sediment in waterleidingen. Groei van *Legionella* is echter ook waargenomen op een voedingsbodem in de nabijheid van kolonies van de bacteriesoort *Flavobacterium* ('satellietgroei')⁶⁾. Bovendien is gerapporteerd dat *Legionella* zich vermeerderde in situaties waarbij geen protozoa werden waargenomen³⁾. Ook is een experiment beschreven waarbij groei van *Legionella* optrad, terwijl de groei van protozoa met een giftige stof werd onderdrukt⁴⁾. Deze waarnemingen leidden tot de opvatting dat *Legionella* in het watermilieu kan groeien in amoeben, maar dat amoeben niet essentieel zijn voor de groei

Afb. 1: A. Concentraties van ATP (■) en *L. pneumophila* (●) in de kolven met stukjes zacht PVC en ongefiltreerd entmateriaal.
B. Idem, met gefiltreerd entmateriaal.
C. Concentraties van protozoa in de kolven met het ongefiltreerde entmateriaal, bepaald via de MPN-kweekmethode (■), directe celtellingen met behulp van de FISH-methode (▲) en primuline-kleuring (●).



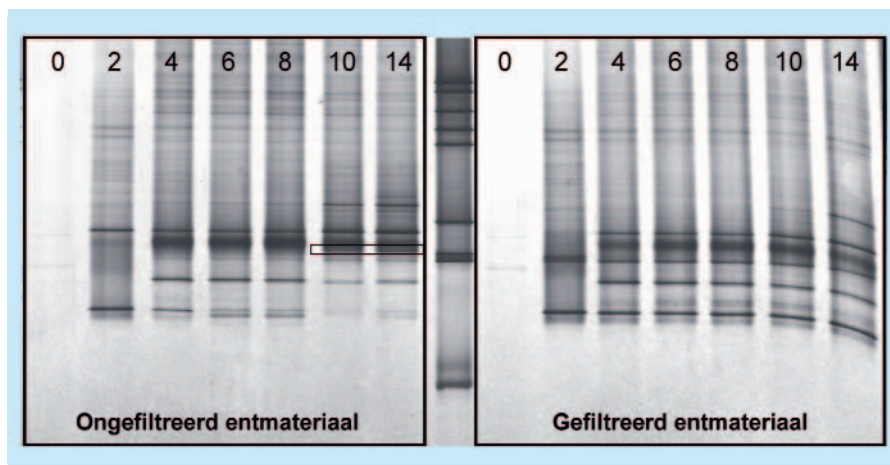
van *Legionella* in biofilms waarin bacteriën stoffen uitscheiden die groei van deze bacterie bevorderen.

Afbreekbare stoffen in het water en/of afkomstig uit leidingmaterialen bevorderen de vorming van biofilms in leidingen in contact met drinkwater en ook in leidingwaterinstallaties. Deze biofilms met bacteriën en protozoa vormen een potentiële niche voor *Legionella*, met name bij temperaturen boven 25°C. Kennis over de relaties tussen *Legionella*, protozoa en bacteriën in de biofilms is nodig voor het definiëren van condities waarbij de groei van *Legionella* wordt beperkt. Daarom is nagegaan of protozoa een rol spelen bij de groei van *Legionella* in biofilms. Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van diverse molecuulair-biologische methoden²⁾.

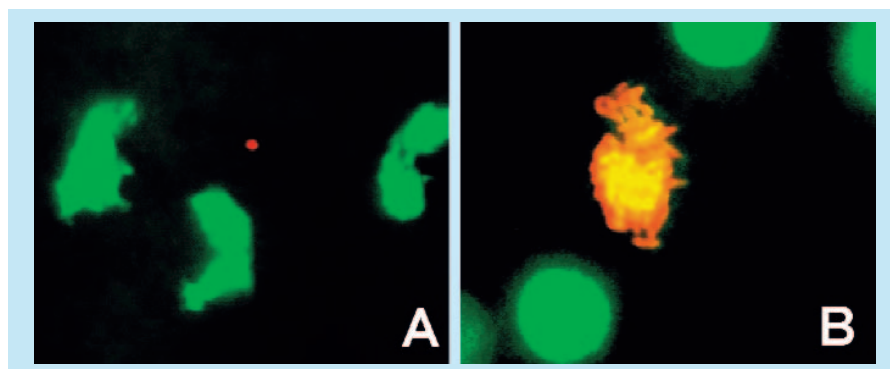
Experimenten met zacht PVC

Zacht PVC (PVC-p) bevat weekmakers die bij contact van het materiaal met water de groei van bacteriën op het oppervlak bevorderen. Van deze eigenschap is gebruik gemaakt voor het kweken van een biofilm voor het onderzoek naar de groei van *Legionella*. Hierbij werden stukjes PVC-p onder steriele condities geplaatst in steriel leidingwater (15 stukjes in 600 ml) in Erlenmeyer kolven. Vervolgens is per kolf ongeveer 5 ml water toegevoegd waarin *L. pneumophila* en andere micro-organismen zich hebben vermeerderd. Dit entmateriaal is bij enkele kolven ongefilterd toegevoegd en bij enkele kolven na filtratie door een filter met een poriegrootte van 3.0 µm. Aangetoond was dat dit filter wel de protozoa tegenhield, maar niet de bacteriën waaronder *Legionella*. De kolven zijn vervolgens in het donker bewaard bij een temperatuur van 37°C, de optimale temperatuur voor de groei van *L. pneumophila*.

Met behulp van metingen van het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) is gedurende twee weken de ontwikkeling van biomassa in het water en op de materialen (biofilm) bepaald. Adenosinetrifosfaat is alleen aanwezig in levende (micro-) organismen en kan met een snelle en gevoelige methode worden gedetecteerd. Daarnaast is de samenstelling van de bacteriepopulatie bepaald met een op de polymerase kettingreactie gebaseerde methode. Hierbij wordt het genetische materiaal van de aanwezige bacteriën kunstmatig vermenigvuldigd, waarna met de zogeheten denaturerende gradiënt gel elektroforese (DGGE)-techniek een 'vingerafdruk' (streepjespatroon) wordt verkregen van de bacteriepopulatie in de kolven. Een verschil in streepjespatroon wil zeggen een verschil in bacteriële samenstelling. Bovendien is de concentratie van *L. pneumophila* bepaald met behulp van een semiselectieve voedingsbodem, conform NEN 6265. De concentratie



Afb. 2: 'Streepjespatronen' van de bacteriepopulaties in de biofilm uit de kolven met het ongefilterde en het gefilterde entmateriaal. De streepjespatronen zijn gemaakt op dag 0, 2, 4, 6, 8, 10 en 14.



Afb. 3: A. Actieve vormen (trophozoïten) van de amoebe *Hartmannella vermiformis*. B. Een actieve *Hartmannella*-amoebe die volledig is geïnfecteerd met *L. pneumophila* (midden) tussen twee inactieve, niet-geïnfecteerde amoeben (boven en onder).

van protozoa is bepaald met de 'most probable number' (MPN)-methode via kweken in bacteriesuspensies en aan de hand van directe cellellingen met behulp van een microscoop.

Legionella groeit alleen in aanwezigheid van protozoa

Uit de ATP-metingen blijkt dat binnen enkele dagen een sterke groei optrad in alle kolven met stukjes PVC-p. De maximale ATP-concentraties op de materialen was in de kolven met de gefilterde ent nagenoeg gelijk aan de groei in de kolven met de ongefilterde ent (zie afbeelding 1). Bovendien blijkt uit de DGGE-patronen dat weinig verschil bestaat in de bacteriële samenstelling in de kolven met gefilterd en met ongefilterd entmateriaal (zie afbeelding 2). Een klein, maar belangrijk verschil is te zien vanaf dag 10, waarbij in de kolven met het ongefilterde entmateriaal de band horende bij *L. pneumophila* zichtbaar wordt. Deze band ontbreekt in de kolven met het gefilterde entmateriaal. De *Legionella*-bepalingen bevestigden dat in de kolven met het ongefilterde entmateriaal vanaf dag 6 een sterke groei optrad, terwijl in de kolven met het gefilterde entmateriaal geen groei maar een afname van *Legionella* optrad.

Filtratie verwijderde dus de groeibevorderende factor voor *L. pneumophila* uit het entmateriaal. In de kolven met het ongefilterde entmateriaal groeien protozoa vanaf dag 4 explosief, maar in de kolven met het gefilterde entmateriaal zijn geen protozoa waargenomen (zie afbeelding 1B en 1C).

Legionella groeit in protozoa

Deze waarnemingen wijzen erop dat protozoa de groei van *Legionella* bevorderen, maar hiermee is nog niet bewezen dat de groei van *Legionella* een gevolg is van groei in de protozoa. Een andere molecuulair-biologische techniek, de fluorescente in situ hybridisatie (FISH)-methode, is daarom toegepast om de groei van *L. pneumophila* in protozoa aan te tonen. Met deze techniek kunnen verschillende soorten micro-organismen ieder van een specifieke fluorescente kleur worden voorzien. Deze kleuren zijn vervolgens waar te nemen met de fluorescentie-microscoop. In dit onderzoek is een universele 'probe' gebruikt voor de kleuring van protozoa. Alle protozoa (inclusief amoeben) lichten hierdoor groen op onder de microscoop. Daarnaast is een specifieke 'probe' gebruikt, die *L. pneumophila* onder de microscoop een rode kleur geeft. De aanwezigheid

van *Legionella* in de protozoa afkomstig van de PVC-p-stukjes is duidelijk te zien (zie afbeelding 3). Uit waarnemingen met de microscoop kwam duidelijk naar voren dat *Legionella* ook daadwerkelijk groeide in de protozoa. Bij de celtellingen met behulp van de microscoop en in de kweekmethode was bovendien slechts één type protozoa te zien. Op basis van morfologische eigenschappen en met behulp van moleculaire technieken is vastgesteld dat het hier gaat om de amoebe *Hartmannella vermiformis*. Dit organisme is ook door Wadowsky en collega's waargenomen⁷⁾.

Legionella groeit uitsluitend in protozoa

L. pneumophila groeide niet in de biofilm zonder protozoa (in kolven met gefiltreerde ent). Dit betekent dat de bacteriën in de biofilm op PVC-p zonder protozoa geen stoffen uitscheidde die groei van *Legionella* mogelijk maken. De vraag is echter of groei in een biofilm met protozoa uitsluitend in de protozoa plaatsvindt. Op dag 8 van het experiment waren bijna alle amoeben ($93,9 \pm 6,1$ %) aanwezig in de actieve (trophozoïte) vorm. Op dag 10 zijn bijna alle amoeben ($94,3 \pm 3,0$ %) aanwezig in de passieve (cyste) vorm, een soort spore.

Alleen de actieve protozoa eten bacteriën en kunnen dus worden geïnfecteerd met *L. pneumophila*. Dit verklaart waarom na dag 10 geen groei meer plaatsvindt.

Groei van *L. pneumophila* is dus het gevolg van opname door en intracellulaire groei in protozoa die hierbij te gronde gaan. Per amoebe, die volledig is geïnfecteerd met *L. pneumophila*, komen ongeveer 100 *L. pneumophila*-cellen vrij (afbeelding 3B).

Conclusie

De beschreven waarnemingen leiden tot de volgende conclusies:

- Zonder protozoa bevorderden de bacteriën van de biofilm de groei van *L. pneumophila* niet;
- In aanwezigheid van protozoa trad wel groei van *L. pneumophila* op;
- De groei van *Legionella* was uitsluitend het gevolg van intracellulaire groei in *H. vermiformis*.

Door het gebruik van bacteriën, protozoa en *Legionella* uit leidingwater zijn de condities van het experiment representatief voor praktijksituaties. De groei van *Legionella* hangt dus rechtstreeks samen met de groei van protozoa die als gastheer dienen voor deze bacterie. De vraag is nu onder welke omstandigheden deze protozoa zich in biofilms vermeerderen en welke kwantitatieve relaties bestaan tussen het aantal protozoa in de biofilm en het aantal *Legionella* bij verschillende milieufactoren, zoals beschikbaarheid van afbreekbare stoffen en temperatuur. Kennis over deze relaties is van belang voor het definiëren van voorwaarden waarbij de groei van *Legionella* kan worden beperkt. ◀

LITERATUUR

- 1) Abu Kwaik Y., L. Gao, B. Stone, C. Venkataraman en O. Harb (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 9, pag. 3127-3133.
- 2) Kuiper M., B. Wullings, A. Akkermans, R. Beumer en D. van der Kooij (2004). Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 11, pag. 6826-6833.

- 3) Rogers J., A. Dowsett, P. Dennis, J. Lee en C. Keevil (1994). 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. Microbiol.* nr. 5, pag. 1585-1592.
- 4) Surman S., G. Morton, B. Keevil en R. Fitzgeorge (2002). *Legionella pneumophila* proliferation is not dependent on intracellular replication. In 'Legionella' (ed. R. Marre), pag. 86-89.
- 5) Rowbotham T. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for fresh water and soil amoeba. *J. Clin. Pathol.* nr. 33, pag. 1179-1183.
- 6) Wadowsky R. en R. Yee (1983). Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 6, pag. 1447-1449.
- 7) Wadowsky R., L. Butler, M. Cook, S. Verma, M. Paul, B. Fields, G. Keleti, J. Sykora en R. Yee (1988). Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of *Hartmannella amoeba* as growth factors. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 11, pag. 2677-2682.