

RINSKE VALSTER, KIWA WATER RESEARCH / WAGENINGEN UNIVERSITEIT & RESEARCH CENTRUM

BART WULLINGS, KIWA WATER RESEARCH

GEO BAKKER, VITENS WATERTECNOLOGIE

DICK VAN DER KOOIJ, KIWA WATER RESEARCH

Legionella pneumophila vermeerdt zich in (leiding)waterinstallaties in vrijlevende protozoa, die grazen op biofilm en sediment. Verhinderen van de groei van dergelijke protozoa zal de vermeerdering van *Legionella* beperken. Over de aanwezigheid en het gedrag van vrijlevende protozoa in leidingwater is echter weinig bekend. Een onderzoek is gestart gericht op de detectie en identificatie van vrijlevende protozoa in (leiding)water met behulp van moleculair-biologische technieken. Uit de eerste resultaten blijkt dat in oppervlaktewater, reinwater en leidingwater een grote diversiteit van eukaryoten (micro-organismen met een celkern) aanwezig is. Protozoa komen algemeen voor in drinkwater. Ook twee typen die als gastheer voor *L. pneumophila* kunnen dienen, zijn aangetroffen. Verder onderzoek richt zich op de factoren die de groei van deze protozoa in biofilms bevorderen.

Sinds de grote uitbraak van legionellapneumonie ('veteranenziekte') in 1999 onder bezoekers van de West-Friese Flora te Bovenkarspel, worden jaarlijks meer dan 200 gevallen van legionellapneumonie in Nederland gerapporteerd. Voor heel Europa is dit niveau gestegen naar meer dan 4500 ziektegevallen (ongeveer

veertien per miljoen inwoners) per jaar⁴. Verbeterde diagnose en betere rapportage geven dus meer complete informatie over de incidentie van deze ernstige ziekte. *Legionella*-pneumonie is een gevolg van inademing van waterdruppeltjes (aerosol) met *Legionella pneumophila*⁶. Dit organisme groeit in natuur-

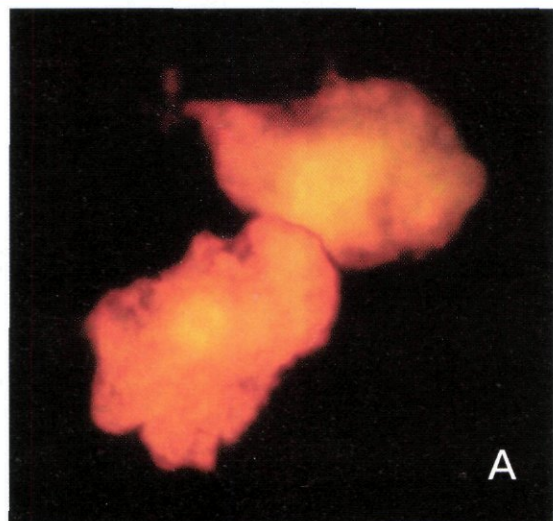
Vrijlevende zoetwaterprotozoa

De meeste vrijlevende protozoa in zoetwater zijn eencellige organismen. Ze behoren tot de eukaryoten: organismen met een membraan om het genomisch DNA. Bij bacteriën, die prokaryoten worden genoemd, ligt het genomische DNA vrij in de cel. Vrijlevende protozoa kunnen worden onderverdeeld in drie groepen; amoeben, ciliaten en flagelaten¹. Per protozoasoort kan de diameter sterk variëren; zo hebben de kleinste protozoasoorten een doorsnede van 4 µm en de grootste een doorsnede van 1,2 mm. Vrijlevende protozoa voeden zich met bacteriën, schimmels, algen en andere protozoa in water, biofilm en sediment. In de actieve (vegetatieve) levensvorm foerageert het organisme over de biofilm en vermenigvuldigt het zich. In de niet actieve overlevingsfase (cyste) is het protozoa beschermd tegen ongunstige milieuomstandigheden en voedt en vermenigvuldigt zich dan niet. Afbeelding 1 toont het protozoa Hartmannella vermiformis, waarbij de twee stadia zijn weergegeven. Deze soort staat ook beschreven als gastheer voor *L. pneumophila*⁴.

lijke en door de mens gemaakte watersystemen uitsluitend in protozoa (zie kader). Dit zijn eencellige eukaryotische organismen (diertjes) die zich voeden met bacteriën en andere organismen in de biofilm, een slijm laagje op oppervlakken die in contact staan met water, bijvoorbeeld waterplanten en leidingmaterialen. Deze biofilm bestaat uit verschillende typen micro-organismen, zoals bacteriën, schimmels en protozoa en uit organische en anorganische componenten. Ook andere dierlijke organismen, waaronder waterpissebedden, nematoden en draadwormen zijn aanwezig in biofilms en sedimenten in waterleidingen⁷.

Protozoa grazen op de biofilm en het sediment en kunnen daarbij ook *L. pneumophila* opnemen. Deze legionellabacteriën vermeerderen zich vervolgens in bepaalde protozoa, die hierdoor worden gedood waarbij een groot aantal bacteriën vrijkomt. Protozoa die bekend staan als gastheer voor *L. pneumophila* zijn onder andere *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* en *Vexillifera*^{2,5,6}. Informatie over de aanwezigheid van deze en andere protozoa in drinkwater en in leidingwaterinstallaties is zeer schaars, mede omdat het moeilijk is om dergelijke organismen te kweken en te identificeren.

Afb. 1: Hartmannella vermiformis in twee stadia: A = vegetatief, B = cysten.



Vanwege de rol van protozoa bij de groei van *Legionella* is in het kader van het BTO-programma, met subsidie van Delft Cluster, een onderzoek gestart naar de detectie van protozoa in leidingwater met behulp van moleculaire technieken. De eerste fase van dit onderzoek omvat het toepasbaar maken van de moleculaire technieken voor het bepalen van de diversiteit en identiteit van eukaryotische organismen in leidingwater. De nadruk ligt hierbij op het opsporen van protozoa die kunnen dienen als gastheer voor *L. pneumophila*.

Hieronder worden de resultaten beschreven van de eerste fase van het onderzoek.

Watertypen en detectiemethoden

In de eerste fase van het onderzoek zijn monsters genomen van oppervlaktewater, reinwater ('af pompstation') en leidingwater (zie tabel 1). Deze monsters zijn gefiltreerd (poriegrootte 1,2 µm). Vervolgens is het erfelijke materiaal (DNA) geïsoleerd uit de op de filters verzamelde micro-organismen. Met behulp van de polymerasekettingreactie is een specifiek DNA-fragment, dat aanwezig is in alle eukaryoten, kunstmatig vermeerderd³⁾. Dit specifieke fragment verschilt per groep organismen en verdere analyse maakt het mogelijk om deze organismen van elkaar te onderscheiden. De samenstelling van de eukaryotische gemeenschap is bepaald met twee moleculaire analysetechnieken. De eerste techniek geeft een beeld van de eukaryotische diversiteit. Met de tweede techniek worden de aangetroffen organismen geïdentificeerd.

Diversiteit

Informatie over de diversiteit van de eukaryotische gemeenschap wordt verkregen met de vingerafdruktechniek T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism). Hierbij wordt het met de PCR vermeerderde DNA-fragment voorzien van een fluorescent label en vervolgens geknipt met een enzym. Er ontstaan nu kortere DNA-fragmenten met label en zonder label. Van de gelabelde DNA-fragmenten wordt met behulp van capillaire elektroforese de lengte bepaald, waarbij van ieder monster een 'streepjescode' wordt verkregen. Ieder streepje staat voor een DNA-fragment met een bepaalde lengte en vertegenwoordigt één type organisme. Een verschil in 'streepjescode' wil dus zeggen dat er een verschil is in eukaryotische samenstelling. Veel streepjes duiden op een hoge diversiteit en weinig streepjes geeft aan dat er weinig verschillende groepen aanwezig zijn (in het betreffende water).

De lengte van de verkregen DNA-fragmenten varieert van 50 tot 500 basenparen. In alle monsters zijn minimaal 20 verschillende DNA-fragmenten ('streepjes') aanwezig (zie afbeel-

ding 2). In de 'vingerafdrukken' van RW 4, RW 5 en LW 1 zijn minimaal 70 streepjes te onderscheiden. Dit betekent dat veel verschillende organismen (DNA-sequenties) in het onderzochte water aanwezig waren. In de monsters OW 1 en LW 2 zijn ongeveer 45 streepjes te onderscheiden, terwijl in OW 2, RW 1 en LW 3 beduidend minder streepjes zijn te zien. In deze monsters is een lagere eukaryotische diversiteit.

Op basis van aan- of afwezigheid van de bandjes is een 'overeenkomstboom' gemaakt (zie afbeelding 2). Hierin is te zien dat de eukaryotische gemeenschappen in OW 2 en in LW 2 veel overeenkomst met elkaar hebben en dat RW 4 en LW 3 weinig overeenkomst vertonen.

Identificatie

De samenstelling van de eukaryotische gemeenschap is bepaald met behulp van een 'kloonbibliotheek': een verzameling van DNA-fragmenten uit één monster. Met een recombi-

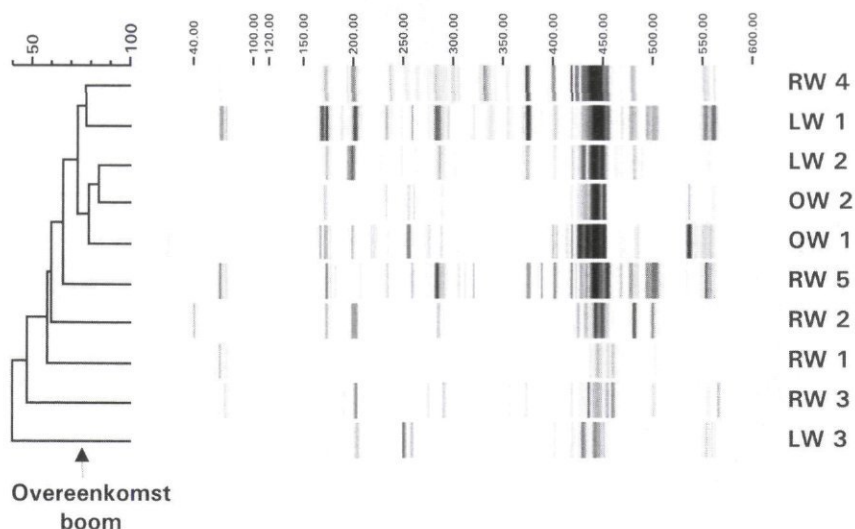
nanttechniek worden de verschillende DNA-fragmenten van elkaar gescheiden door vermeerdering in *E. coli*-cellen (klonen). Vervolgens is van iedere kloon de sequentie van het DNA-fragment bepaald. Deze sequenties worden vergeleken met al eerder beschreven DNA-sequenties van organismen die zijn opgenomen in een databestand. Op deze wijze kan worden bepaald of en zo ja in welke mate sprake is van verwantschap tussen een DNA-fragment en het DNA van de in het databestand opgenomen organismen, waaronder protozoa.

De gemiddelde samenstelling van de eukaryotische gemeenschap per watertype is weergegeven in afbeelding 3. Aanwezig zijn: metazoa (meercellige dieren), planten, schimmels, vrijlevende protozoa en een groep onbekende organismen die nog niet zijn te identificeren met het gebruikte databestand. In alle watertypen zijn protozoa aanwezig; in reinwater heeft 62 procent van de klonen de grootste

Tabel 1. Onderzochte watertypen.

watertype	code	T (°C)
reinwater van aëroob grondwater	RW 1	10
reinwater van anaëroob grondwater met een hoog gehalte organische stof	RW 2	11
reinwater van aëroob grondwater met een laag gehalte organische stof	RW 3	11
reinwater van oppervlaktewater	RW 4	15
reinwater van anaëroob grondwater	RW 5	14
leidingwater na 15 min. doorstroming	LW 1	16
stilstaand leidingwater van anaëroob grondwater	LW 2	21
stilstaand leidingwater van aëroob grondwater	LW 3	20
oppervlaktewater (rivier)	OW 1	13
oppervlaktewater (rivier)	OW 2	13

Afb. 2: 'Streepjespatroon' van eukaryotengemeenschappen in oppervlaktewater (OW), reinwater (RW) en leidingwater (LW). Ieder streepje vertegenwoordigt één type eukaryotisch organisme. De overeenkomst tussen de 'streepjespatronen' van de verschillende monsters wordt weergegeven met de boom.



overeenkomst met vrijlevende protozoa. In het oppervlaktewater heeft bijna de helft van de klonen de grootste overeenkomst met vrijlevende protozoa. Sequenties met de hoogste overeenkomst voor metazoa zijn in oppervlaktewater niet gevonden.

Protozoa in reinwater uit aëroob grondwater

Nader onderzoek is uitgevoerd naar de identiteit van de protozoa in reinwater dat is bereid uit aëroob grondwater met een laag gehalte aan organische stof (RW 3). Van de in totaal 140 geanalyseerde klonen heeft 61 procent de grootste overeenkomst met vrijlevende protozoa. Deze protozoa kunnen worden ingedeeld in 13 verschillende geslachten (zie tabel 2). Veel van de DNA-fragmenten hebben een overeenkomst tussen 90 en 95 procent met geslachten van protozoa in het databestand. Dit relatief lage percentage vormt een aanwijzing dat de gevonden sequenties afkomstig

zijn van protozoa die nog niet eerder zijn beschreven.

Twee groepen klonen hebben de grootste overeenkomst met geslachten van protozoa die bekend staan als gastheer voor *L. pneumophila*, namelijk *Acanthamoeba* en *Vexillifera*. *Acanthamoeba* behoren tot de amoeben en komen algemeen voor in zoetwater en in de bodem. Ze voeden zich en bewegen zich voort met uitstulpingen van het lichaam, ook wel schijnvoetjes of pseudopodia genoemd. Protozoa die tot het geslacht *Vexillifera* behoren, vallen ook onder de amoeben. Van dit organisme zijn nog geen cellen in het cystestadium waargenomen.

Conclusies en verder onderzoek

De waarnemingen leiden tot de volgende conclusies:

- Toepassingen van PCR-gebaseerde technieken, de 'vingerafdruktechniek' en kloonbibliotheken, geven veel informatie over de diversiteit en identiteit van de eukaryoten in water. Met behulp van deze technieken is het mogelijk om protozoa te identificeren;
- Drinkwater bevat een grote verscheidenheid aan vrijlevende protozoa. Van veel van deze organismen is de DNA-sequentie nog niet beschreven. Kweken van protozoa uit water kan aanvullende informatie geven over de aanwezige protozoageslachten;
- Protozoa die onder bepaalde omstandigheden dienen als gastheer voor *L. pneumophila* zijn aanwezig in drinkwater.

Verder onderzoek zal zich richten op het bepalen van de aantallen protozoa in diverse typen drinkwater en in biofilms en op de omstandigheden die de groei van deze organismen versterken. Dergelijke informatie kan bijdragen aan het definiëren van preventieve maatregelen voor het beperken van de groei van *L. pneumophila* in (leiding)watersystemen.

LITERATUUR

- 1) Fenchel T. (1987). *Ecology of Protozoa*. Springer-Verlag.
- 2) Fields B., R. Benson en R. Besser (2002). *Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation*. Clin. Microbiol. Rev. nr. 25, pag. 506-526.
- 3) Heijnen L., G. Wubbels, H. Veenendaal en G. Medema (2005). Real-time PCR bevestigt snel en betrouwbaar *E. coli*-kolonies. *H₂O* nr. 7, pag. 69-71.
- 4) Joseph C. (2005). Zesde internationale Legionella-congres. Chicago (VS).
- 5) Kuiper M., B. Wullings en D. van der Kooij (2004). *Legionella pneumophila* groeit in biofilms uitsluitend in protozoa. *H₂O* nr. 7 pag. 51-53.
- 6) Steinert M., U. Hentschel en J. Hacker (2001). *Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray*. FEMS Microbiology Reviews nr. 26, pag. 149-162.
- 7) Van Lieverloo H., G. Veenendaal en D. van der Kooij (1997). *Dierlijke organismen in systemen voor distributie van drinkwater. Resultaten van een inventarisatie*. Kiwa. Rapport SWE 96.013.

Tabel 2. Identiteit van vrijlevende protozoa in RW 3.

geslacht	overeenkomst (%)	aandeel protozoa (%)
niet gekweekte cercozoan	> 89	25,4
<i>Cercomonas</i>	> 92	14,3
<i>Bodo</i>	> 91	12,7
<i>Acanthamoeba</i> *	> 95	7,9
<i>Neobodo</i>	92	7,9
<i>Rhynchomonas</i>	98	7,9
<i>Vexillifera</i> *	94	7,9
<i>Diaphanoeca</i>	92	3,2
<i>Entorhipidium</i>	94	3,2
niet gekweekte peritriche flagelaat	87	3,2
<i>Paravahlkampfia</i>	89	3,2
<i>Alexandrium</i>	91	1,6
<i>Frontonia</i>	96	1,6

* = gastheer voor *L. pneumophila*.

Afb. 3: De eukaryotische diversiteit bepaald met kloonbibliotheken in monsters van oppervlaktewater (OW), reinwater (RW) en leidingwater (LW).

