

Het belang van protozoa in de prokaryote-eukaryote co-evolutie

*Protozoa kennen een kosmopolitische verspreiding, waarbij hun abundantie en diversiteit sterk bepaald wordt door allerhande omgevingsfactoren. Ze vormen een onmisbare schakel in elk ecosysteem omdat ze zorgen voor het onder controle houden van algen en bacteriële populaties, voor de recirculatie van biomassa in de voedselketen en omdat ze bijdragen tot de co-evolutie van pro- en eukaryoten. In de loop van de evolutie hebben bepaalde micro-organismen een manier ontwikkeld om predatie of vertering door protozoa tegen te gaan. Predatie wordt tegengegaan door bijvoorbeeld de aanwezigheid van toxines in de microbiële celwand. Andere bacteriesoorten worden wel opgenomen, maar hebben een gesofisticeerd systeem ontwikkeld om intracellulair te overleven in de protozoogastheer. Het bestuderen van interacties tussen protozoa en protozoa resistente micro-organismen geniet momenteel veel wetenschappelijke aandacht aangezien verschillende van beiden gekend zijn als humaan pathogenen (bv. *Naegleria fowleri*, *Legionella pneumophila*). Inzicht in de infectie en replicatie van zulke micro-organismen in protozoa draagt bij tot de studie naar hun ecologie en mogelijke bestrijding.*

Algemene inleiding en classificatie

Protozoa behoren samen met de ééncellige algen en slijmzwammen tot het koninkrijk van de protisten en omvatten een grote collectie micro-organismen ($\pm 35\ 000$ soorten), met aanzienlijke onderlinge morfologische en fysiologische verschillen (Sigeo, 2005). Het merendeel van hen is chemoheterotroof (= voor bepaalde essentiële voedingscomponenten zijn ze afhankelijk van anderen, die deze stoffen wel kunnen produceren). Echter, bepaalde protozoa bevatten ook chloroplasten en zijn zo in staat tot foto-autotrofie (= in staat om zonder de hulp van anderen chemische energie in de cellen op te slaan in een proces waarbij (zon)licht de energiebron is). De meeste protozoa zijn gemiddeld $2\ \mu\text{m}$ tot ongeveer $1\ \text{mm}$ in diameter, met uitzondering van bepaalde slijmzwammen die afmetingen van enkele centimeters kunnen bereiken.

Momenteel worden de eukaryoten in zes supergroepen ingedeeld (Adl et al., 2005). Vier van de zes supergroepen vertegenwoordigen de protozoa. Deze zijn:

- Amoebozoa: hier worden de amoeben (bv. *Acanthamoeba* spp.) en slijmzwammen (bv. *Dictyostelium* spp.) in onderverdeeld. Amoebozoa bewegen zich voort door middel van cytoplasmatische stromingen of pseudopodia (= schijnvoetjes). Onder bepaalde ongunstige omgevings- of voedingscondities vindt er een transformatie naar de cystevorm plaats. Hierbij worden de cellen door een buitenste capsule omgeven, waardoor ze zeer resistent worden aan allerhande invloeden van buitenaf. Wanneer de omstandigheden opnieuw gunstig worden zullen de cellen excyteren.
- Chromalveolata: hierbinnen bevinden zich de Ciliophora of ciliaten bv. *Paramecium caudatum*, tesamen met heel wat flagellate groepen. De ciliaten zijn een extreem grote groep en zijn de meest gespecialiseerde en gecompliceerde protozoa. Flagellaten en ciliaten zijn twee klas-

sen van protozoa met locomotorische organellen. Flagellen zijn typisch langer dan de rest van de cel, in tegenstelling tot de ciliën die meer op haartjes lijken en korter zijn dan de cel.

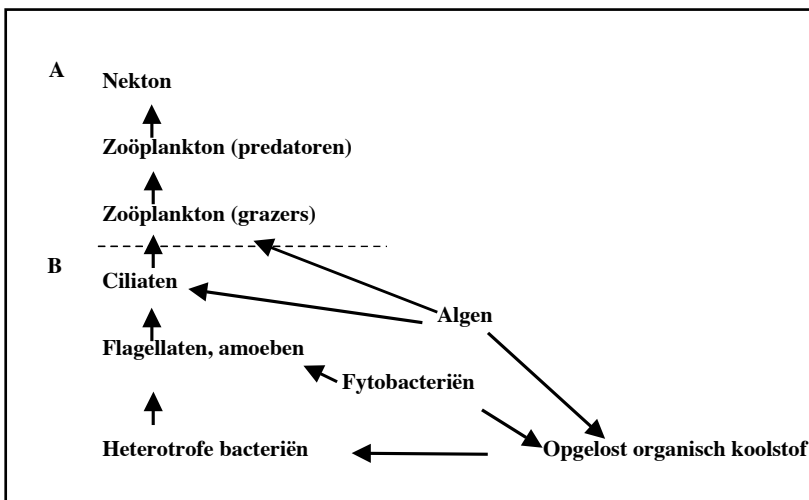
- Rhizaria: bv. *Euglena* spp. Deze organismen bevatten fijne pseudopodia, al dan niet ondersteund door microtubuli (axopodia).
 - Excavata: bv. *Giardia trichomonas*. Deze groep omvat zowel vrij-levende als symbiotische organismen, alsook enkele belangrijke humane parasieten. De meeste onder hen bezitten twee, vier of meerdere flagella en hebben een duidelijk zichtbare ventrale voedingsgroeve, ondersteund door microtubuli.
- Zowel de Rhizaria als de Excavata bevatten heel wat flagellate vertegenwoordigers.

Voedselopname en ecologische impact

Protozoa komen algemeen voor in de bodem, water en lucht, waar ze een groot aantal ecologische niches en trofische niveaus innemen (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Welk type van protozoa waar wordt teruggevonden is afhankelijk van verschillende omgevingskenmerken zoals de saliniteit, de pH, de temperatuur, de aanwezigheid van nutriënten en de hoeveelheid opgeloste gassen zoals zuurstof, koolstofdioxide en zwavel. Flagellaten en ciliaten worden voornamelijk teruggevonden in open water waar ze prederen op planktonische of vrijzwemmende micro-organismen. Sedimentatie van de protozoa wordt hierbij tegengegaan door actief te bewegen, drijven of het zich vasthechten aan de planktonische biota. Flagellaten en ciliaten zijn doorgaans filtervoeders of prederen actief op hun prooi. Kleine ciliaten en amoeben daarentegen beperken zich doorgaans tot het afgrazen van biofilmen (= georganiseerde gemeenschappen van micro-organismen die onderling en aan het substraatoppervlak gehecht zijn door middel van extracellulaire polymere substanties).

Als predatoren van unicellulaire of filamenteuze algen, bacteriën en microfungi zijn protozoa zeer belangrijk voor de stabiliteit en productiviteit van biologische gemeenschappen en dragen ze zo bij aan de waterkwaliteit en de bodemvruchtbaarheid (Jürgens en Matz, 2002; Weekers *et al.*, 1993). Het is aangetoond dat *Acanthamoeba castellanii* en *Colpoda maupasi* een grote rol vervullen in de populatiedynamica van biofilmgemeenschappen. Figuur 1 geeft duidelijk de positie en het aandeel van protozoa in de voedselketen weer. Enerzijds zijn ze van belang in de microbiële lus (Figuur 1B), waar ze ervoor zorgen dat de koolstof geproduceerd door de primaire producenten (= algen en fyto bacteriën) doorgegeven wordt aan de hogere trofische niveaus (klassieke pelagische voedselketen) (Figuur 1A). Daarenboven vormen ze ook een belangrijke voedselbron voor micro-invertebraten. Het is duidelijk dat protozoa zorgen voor een turnover van nutriënten en zo lagere en hogere trofische niveaus linken (Boenigk en Arndt, 2002; Hahn en Höfle, 2001).

Figuur 1: Schematische weergave van de turnover van nutriënten in het milieu door toedoen van protozoa (Sigeo *et al.*, 2005). (A) Klassieke pelagische voedselketen, (B) Microbiële lus. Naast de klassieke pelagische voedselketen vormt de microbiële lus een belangrijke trofische sequentie in aquatische systemen.



Evolutief gevolg van predatie

Bepaalde micro-organismen hebben doorheen de evolutie verscheidene strategieën ontwikkeld om predatie of vertering door protozoa tegen te gaan.

A. Tegengaan van predatie

Van de meeste protozoa is gekend dat ze zeer selectief micro-organismen opnemen (Boenigk *et al.*, 2001). Meestal wordt er geselecteerd op grootte, wat een invloed heeft op de grootte-distributie van micro-organismen in de desbetreffende gemeenschappen (Hahn *et al.*, 2000). Als antwoord hierop gaan enerzijds bepaalde cellen kleiner worden omdat kleine cellen zichtbaar een lagere graasdruk kennen. Anderzijds gaan micro-organismen zich groeperen en filamenten, aggregaten en microkolonies vormen wat ook zeer effectief blijkt te werken (Matz *et al.*, 2002). Tevens zijn er niet-morfologische adaptaties gekend zoals

een toename in de motiliteit (versnelde kolonisatie van nieuwe habitatten) of replicatiesnelheid (om het uitsterven van de bacteriële populatie tegen te gaan) (Matz *et al.*, 2004). Bepaalde bacteriesoorten zoals *Pseudomonas aeruginosa* zijn in staat tot het modificeren van hun celwand en bevatten bijvoorbeeld toxische pigmenten en enzymen met een toxische werking naar protozoa toe.

B. Tegengaan van vertering

Protozoa resistente micro-organismen of PRM hebben zich in de loop van de evolutie aangepast aan de intracellulaire omgeving en zijn op die manier in staat vertering tegen te gaan (Greub en Raoult, 2004). De PRM worden in twee grote groepen onderverdeeld.

B1. Obligaat intracellulaire levenswijze

Deze micro-organismen worden ook wel endosymbionten (= een gereguleerd harmonieus samenleven van twee niet-gerelateerde partners, waarbij de ene in het lichaam van de andere leeft) genoemd. Deze endosymbiontische relatie mag niet als absoluut worden opgevat omdat veranderende omgevingscondities er alsnog voor kunnen zorgen dat de gastheer gelyseerd wordt (Greub *et al.*, 2003). De micro-organismen zijn in staat hun replicatieve niche binnenin de amoeben te behouden. Een gekend voorbeeld hiervan is *Coxiella burnetii* (La Scola en Raoult, 2001). Naar schatting zijn ongeveer 20% van de *Acanthamoeba* spp. isolaten drager van endosymbiontische micro-organismen, waarbij deze laatsten bij elke celdeling aan de dochtercellen worden doorgegeven. Omwille van het feit dat obligaat intracellulaire micro-organismen niet kunnen overleven buiten de gastheer, werden ze pas dertig jaar geleden voor het eerst ontdekt via electronen microscopische observaties (Proca-Ciobanu *et al.*, 1975).

B2. Facultatief intracellulaire levenswijze

Deze groep van micro-organismen bestaat uit drie groepen (Snelling *et al.*, 2006):

- Intracellulaire overleving zonder replicatie bv. *Mycobacterium* spp.
- Intracellulaire replicatie zonder cellysis van de gastheer bv. *Vibrio cholerae*.
- Intracellulaire replicatie gevolgd door cellysis van de gastheer bv. *Listeria* spp. Het lysisproces kan al na een paar uur (Mimivirus) of een paar dagen (*L. pneumophila*) optreden, waarbij de vrijgestelde micro-organismen nieuwe ecologische niches gaan koloniseren of potentiële gastheren infecteren.

Het feit dat micro-organismen in amoeben kunnen repliceren houdt in dat het intracellulaire milieu talrijke voordelen biedt, waaronder de aanwezigheid van voldoende voedingsstoffen. Zoals eerder vermeld is het geweten dat bepaalde protozoa onder ongunstige omgevingscondities overgaan van de trofozoiet (actief) naar de cyste (dormant) levensvorm. De cyste beschermt de

amoëbe tegen droogte, voedselgebrek, chemische processen (desinfecterende en antimicrobiële middelen, pH veranderingen) en fysische processen (warmte, koude en ultraviolet (UV) radiatie) (Aksozek *et al.*, 2002). Bij deze overgang gaan de intracellulaire micro-organismen ook over naar een soort van dormant stadium. Bij de overgang van de cyste naar de trofozoïet zullen de intracellulaire parasieten opnieuw actief worden en hun celdeling hervatten.

Trojaanse paarden van de microbiële wereld

Voor bepaalde humaan pathogenen worden protozoa echt aanzien als trojaanse paarden (Barker en Brown, 1994). Hierbij brengen de protozoa ('de paarden') resistente en humaan pathogene micro-organismen het menselijke 'Troje' binnen. Op die manier omzeilen deze laatste de eerstelijnsdefensie van het menselijk lichaam ter hoogte van de respiratorische tractus en worden ze vlot naar de longblaasjes vervoerd. Ook is geweten dat amoëben besmet met bv. *L. pneumophila* in staat zijn vesikels te produceren die tot 10^4 bacteriën per vesikel kunnen bevatten (Berk *et al.*, 1998). Deze vesikels zorgen voor een toegenomen transmissiepotentiaal van *Legionella*. Studies hebben immers uitgewezen dat de vesikels resistent zijn tegen allerhande biociden en omgevingsomstandigheden en dat de bacteriën in staat zijn zich over een straal van ongeveer 10 km te verspreiden, met behoud van de bacteriële pathogeniciteit. Kilvington en Price (1990) toonden aan dat *A. polyphaga* cysten intracellulaire *L. pneumophila* tegen 50 mg l⁻¹ vrije chloor konden beschermen.

We kunnen protozoa dus zien als een soort van evolutionaire kribbe/trainingskamp en een belangrijk genetisch reservoir van allerhande humaan pathogene bacteriën. Het is namelijk zo dat het intracellulaire milieu van macrofagen en amoëben sterk op elkaar lijkt en dat voor bijvoorbeeld *L. pneumophila* de mechanismen van herkenning, opname en intracellulaire replicatie voor beiden vergelijkbaar zijn (Steinert *et al.*, 2002). De constante selectieve druk die uitgaat van de protozoa op de PRM is hierbij een kritieke factor voor het behoud van de bacteriële virulentie. Het is namelijk zo dat door bepaalde genetische veranderingen, als gevolg van een verblijf in het intracellulaire protozoa milieu, vrijgezette micro-organismen een hogere virulentie bezitten ten opzichte van macrofagen.

Besluit

De toegenomen interesse van microbiologen voor protozoa is te wijten aan het feit dat velen van hen humaan pathogeen zijn en als reservoir dienen voor protozoa resistente micro-organismen, waarvan velen op hun beurt ook humaan pathogeen zijn. Door het ingrijpend veranderen van de omgeving en het bouwen van onder andere

koeltorens, air conditioning systemen, douches, tropische zwembaden, whirlpools, recreatiecentra en fonteinen is de kans dat de mens in contact komt met besmette protozoa de laatste decennia aanzienlijk toegenomen. Wetenschappelijk onderzoek wordt uitgevoerd om waar mogelijk meer inzicht te verwerven in de interactie tussen protozoa en humaan pathogene bacteriën en dit inzake hun ecologie, epidemiologie en gevaar voor de volksgezondheid.

Referenties

- Adl SM., Simpson AGB., Farmer MA., *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 399-451.
- Aksozek A., McClellan K., Howard K., Niederkorn JY., Alizadeh H. (2002) Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. *J. Parasitol.* 88: 621-623.
- Barker J., Brown M. (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology+*. 140: 1253-1259.
- Berk S., Ting RS., Turner GW., Ashburn RJ. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by the *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microb.* 64: 279-286.
- Boenigk J., Arndt H. (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 465-480.
- Boenigk J., Matz C., Jürgens K., Arndt H. (2001) Confusing selective feeding with differential digestion in bacterivorous nanoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 425-432.
- Busselen P. (2004) Cursustekst dierkunde: Invertebraten. KULAK.
- Greub G., Raoult D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 413-433.
- Greub G., La Scola B., Raoult D. (2003) *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba castellanii* depending on the incubation temperature. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 990: 628-634.
- Hahn MW., Höfle MG. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 113-121.
- Hahn MW., Moore ER., Höfle MG. (2000) Role of microcolony formation in the protistan grazing defense of the aquatic bacterium *Pseudomonas* sp. *Mwhl. Microbiol. Ecol.* 39: 175-185.

Jürgens K., Matz C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 413-434.

Kilvington S., Price J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 519-525.

La Scola B., Raoult D. (2001) Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 75-79.

Matz C., Boenigk J., Arndt H., Jürgens K. (2002) Role of bacterial phenotypic strains in selective feeding of the heterotrophic structure of a bacterial community. *Microb. Ecol.* 45: 384-398.

Matz C., Deines P., Boenigk J., Arndt H., Eberl L., Kjelleberg S., Jürgens K. (2004) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microb.* 70: 1593-1599.

Proca-Ciobanu M., Lupascu GH., Petrovici A., Ionescu MD. (1975) Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int. J. Parasitol.* 5: 49-56.

Rodriguez-Zaragoza S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 225-241.

Sigee DC. (Redacteur) (2005) In: *Freshwater microbiology*. Wiley & Sons, LTD pp. 524.

Snelling WJ., Moore JE., McKenna, JP., Lecky DM., Dooley JSG. (2006) Bacterial-protzoa interactions: an update on the role these phenomena play towards human illness. *Microbes. Infect.* 8: 578-587.

Sogin ML., Silberman JD. (1998) Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int. J. Parasitol.* 28: 11-20.

Steinert M., Hentschel U., Hacker J. (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 149-162.

Weekers P., Bodelier P., Wijen J., Vogels G. (1993) Effect of grazing by the free-living amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmanella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 59: 2317-2319.

P. Declerck en F. Ollevier

Laboratorium voor Aquatische Ecologie en Evolutiebiologie, Zoölogisch Instituut, Katholieke Universiteit Leuven, Charles Deberiotstraat 32, 3000 Leuven, Belgium

Corresponderende auteur: Priscilla Declerck

Telefoon: + 32 16 32 36 86

fax: + 32 16 32 45 75

e-mail: Priscilla.declerck@bio.kuleuven.be