

Overlevingsstrategieën en biocontrole van *Legionella pneumophila*

Ondanks de toenemende inzichten in microbiële ecologie en de ontwikkeling van nieuwe waterbehandelingstechnieken, blijven zich grote problemen voordoen met de *Legionella* bacterie, veroorzaker van de veteranenziekte. Recent werden aan de universiteit van Gent belangrijke nieuwe inzichten bekomen die deze problematiek moeten helpen inperken.

Men stelde vast dat met gesloten watersystemen periodieke waterbehandeling aanleiding kan geven tot plotse *Legionella* opstoten die enkele weken kunnen aanhouden en dus een acuut infectiegevaar opleveren. De verklaring voor deze opstoten werd gevonden in het verschijnsel necrotrofie, waarbij *Legionella* in staat is om zich te voeden met organisch materiaal dat afgedood werd door de waterbehandelingen. Deze belangrijke nieuwe overlevingsstrategie doet ons inzien dat de bestrijding van deze pathogeen over een heel andere boeg gegooid moet worden. De eerste stappen daartoe werden gezet door de watersystemen aan te rijken met onschadelijke necrotrofe competitieorganismen om *Legionella* onder bepaalde drempelwaarden te houden.

Legionella pneumophila (*L. pn.*) vormt, als veroorzaker van onder meer de veteranenziekte (zware potentieel dodelijke longontsteking), een aanzienlijk gevaar voor de volksgezondheid. Deze bacterie is wereldwijd terug te vinden in nagenoeg alle zoetwaterbronnen en kan zich sterk manifesteren in humane watersystemen zoals koeltorens, douches, zwembaden en bubbelbaden. Aangezien overdracht van mens tot mens niet gekend is, richten alle maatregelen om deze pathogeen te bestrijden zich op die watersystemen waar potentieel veel mensen mee in aanraking komen. Bij voorkeur zal men die installaties in het oog houden waar kleine waterdruppeltjes gevormd worden, aangezien die de overdracht mogelijk maken van *L. pn.* van water naar ons lichaam.

Ondanks het universele voorkomen van deze bacterie rijzen nog steeds veel vragen over de eigenlijke overlevingsstrategieën van *L. pn.*. Men merkt immers dat de pathogeen heel wat nutriëne eisen stelt wanneer men ze op laboschaal wil opgroeien en gegevens over de factoren die bijdragen aan de overleving en actieve groei in haar natuurlijke habitat zijn zeer gering. Enerzijds

weet men dat *L. pn.* zich via interne replicatie in protozoa (vb. sommige amoeben) sterk kan manifesteren; anderzijds lijken steeds meer gegevens voorhanden die erop wijzen dat ook protozoa-onafhankelijke overleving en groei mogelijk is. Zo zou de aanwezigheid van een biofilm in waterleidingen of (humane) waterreservoirs een belangrijke schuilplaats kunnen vormen.

Tijdens een vierjarig GBOU project (Generisch Basisonderzoek van de Universiteiten) aan het Laboratorium

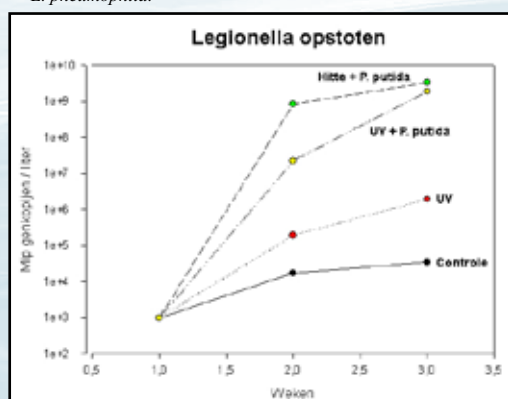
voor Microbiële Ecologie en Technologie van Prof. Willy Verstraete werd onderzocht welke protozoa-onafhankelijke overlevingsstrategieën *L. pn.* zou kunnen aanwenden om zich dermate succesvol in water te manifesteren. Dit onderzoek omvatte drie delen, eerst werd gekeken naar de invloed van enkele huidige waterbehandelingsmethoden op de aantallen *L. pn.*. Vervolgens werd onderzocht hoe *L. pn.* kon groeien en overleven zonder protozoa, om tot slot op basis van de bekomen inzichten een biologische manier te bedenken om *L. pn.* onder controle te houden.

Legionella opstoten

De preventie van *L. pn.* vermenigvuldiging in watersystemen wordt momenteel uitgevoerd door een combinatie van frequente verhitting van het water en een korte verblijftijd in de leidingen of reservoirs. Echter, veel watersystemen bevatten afgelegen of doodlopende stukken waar deze behandeling geen invloed op heeft. Naast deze structurele tekortkomingen blijkt *L. pn.* ook zeer resistent te zijn aan extreme omstandigheden, waaronder bv. aan hoge temperaturen. *L. pn.* kan perfect overleven en mogelijks groeien bij temperaturen van 5 tot 65°C. Daardoor is het nagenoeg onmogelijk *L. pn.* volledig te verwijderen uit een watersysteem. Recente observaties geven melding van sterk verhoogde aantallen *L. pn.* na temperatuursbehandeling van de watersystemen. Dit fenomeen werd in het GBOU project uitvoerig onderzocht en daarbij bleek dat verschillende types waterbehandeling (hitte, UV, sonicatie,...) de hoeveelheid *L. pn.* wel degelijk deden stijgen.

In figuur 1 is duidelijk te zien dat bij dagelijkse kortstondige behandeling van een gesloten watersysteem de hoeveelheid *L. pn.* na 1-2 weken sterk toeneemt om gedurende 3 weken zeer hoge en potentieel gevaarlijke waarden te vertonen. Wanneer aan het watersysteem ook *Pseudomonas putida* werd toegevoegd, ter bevordering van

Figuur 1. *Legionella*-opstoten in een gesloten watersysteem na verscheidene dagelijkse periodieke waterbehandelingen. Bepaling met realtime PCR op basis van het specifieke mip gen van *L. pneumophila*.



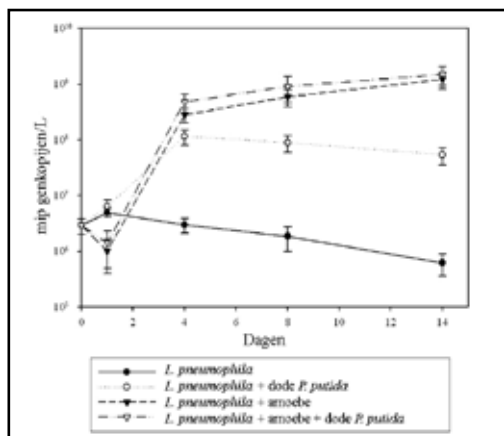
biofilmvorming, bleek *L. pn.* zich nog veel sterker te manifesteren. Met behulp van uitplatingen en realtime PCR werd het aantal *L. pn.* opgevolgd en een drievoudige herhaling van deze proefopzetten leidde tot dezelfde resultaten. Omdat de aanwezigheid van biofilmvorming dit fenomeen sterk leek te bevorderen werd dit aspect in een tweede luik onderzocht. Daarbij werd uitgegaan van de hypothese dat *L. pn.* de nodige voeding moest vinden in de gevormde biofilm.

Necrotrofie

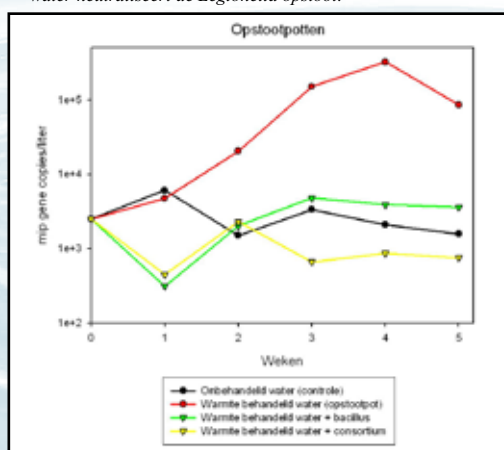
Op basis van de voorgaande bekomen gegevens ging met uit van het idee dat waterbehandelingen aanleiding kunnen geven tot een gedeeltelijke afbraak van biofilm, hetgeen dan op zijn beurt een opstapeling van dood organisch materiaal tot gevolg heeft in bepaalde zones van het watersysteem. Dit materiaal zou dan als voedingsbron kunnen dienen voor de fractie *L. pn.* die de waterbehandeling overleefde.

Er werd zodoende via een aantal tests bepaald of *L. pn.* in staat is te groeien met afgedode

Figuur 2. Aantal *L. pn.* cellen in een gesloten steriel watersysteem zoals bepaald met realtime PCR. Aan *L. pn.* werd ofwel afgedode *P. putida*, of een levende amoëbe of beide toegevoegd om na te gaan wat de kinetiek is van necrotrofie, interne replicatie of een combinatie van beide.



Figuur 3. Aantal *L. pn.* cellen in een gesloten watersysteem zoals bepaald met realtime PCR. Onbehandeld water is de negatieve controle (geen *Legionella* opstoot); hittebehandeld water is de positieve controle (*Legionella* opstoot); toevoeging van *Bacillus* of de set (consortium) necrotrofie biofilm isolaten aan hittebehandeld water neutraliseert de *Legionella* opstoot.



microbiële cellen als enige bron van voeding. Deze vorm van voeding duidt men aan met de term necrotrofie. Kwantificatie met behulp van uitplatingen, realtime PCR en flow cytometrie toonde meermaals aan dat *L. pn.* wel degelijk in staat is om necrotroof te groeien. In steriel water met afgedode *Pseudomonas putida* bacterie als enige vorm van voeding bleek *L. pn.* na 96u met 2 log eenheden toegenomen te zijn. De vereiste hoeveelheid dode cellen om een significante groei vast te stellen lag 100x hoger dan de startconcentratie aan *L. pn.*. Deze necrotrofe groei werd nadien ook vastgesteld bij gebruik van afgedode *Escherichia coli*, *Acanthamoeba castellanii*, *Saccharomyces boulardii* en een biofilm staal.

Gezien het belang van de interne replicatie van *L. pn.* in protozoa werd ook daarmee een vergelijk gemaakt en de resultaten worden weergegeven in figuur 2. Hieruit bleek dat die interne replicatie uiteindelijk tot hogere aantallen *L. pn.* leidt, maar dat de necrotrofie vooral op korte tijdsperiodes een belangrijke manier van overleving en proliferatie van *L. pn.* in watersystemen kan betekenen. Waterbehandelingstechnieken die zich specifiek richten op de eliminatie van protozoa zullen dus niet noodzakelijk leiden tot de verwijdering van *L. pn.* in het watersysteem. Enkel wanneer ook de vorming van dood organisch materiaal beperkt kan worden geeft dit mogelijks een positieve uitkomst.

De noodzaak werd zodoende duidelijk dat een nieuwe aanpak van de *Legionella* bestrijding zich opdrong, waarbij in een derde en laatste deel van het project gekeken werd naar de mogelijkheden van biologische bestrijding.

Biocontrole

De huidige waterbehandelingstechnieken in de bestrijding van *Legionella* zijn ofwel chemisch of fysisch. Deze blijken volledig tekort te schieten en vaak aanleiding te geven tot averechtse effecten (zie hoger). Vandaar werd in dit project gezocht naar een biologisch alternatief, waarbij uitgegaan werd van de kennis over necrotrofie. Er werd gezocht naar andere, veilige bacteriën die eveneens in staat waren necrotroof te groeien om zodoende na hun aanrijking in het watersysteem aanleiding te kunnen geven tot een wegconcurreren van *Legionella*.

Er werden meerdere stalen genomen van biofilms om daaruit bacteriële isolaten te nemen en hen te testen op hun capaciteiten tot necrotrofe groei. Een set van 3 isolaten bleek inderdaad dergelijke groei te vertonen, zodat deze in verdere proefopzetten werden opgenomen. Eén van deze isolaten werd geïdentificeerd als een *Bacillus* sp., wat omwille van de sporenvorming voldoende perspectieven bood om dit species te gebruiken voor toevoeging aan watersystemen. Als belangrijkste proefopzet werd gebruik gemaakt van de opstootexperimenten uit het eerste deel van het project. In figuur 3 is duidelijk te zien dat we op-

nieuw via warmtebehandeling van water in een gesloten systeem konden zorgen voor een opstoot aan *L. pn.* (positieve controle). Het onbehandelde systeem (negatieve controle) vertoonde geen *Legionella* opstoot. Wanneer aan het hittebehandelde systeem de *Bacillus* werd toegevoegd, of de set van necrotrofe organismen, bleek de *Legionella* opstoot volledig teniet gedaan. Een drievoudige herhaling van dit experiment, alsook bijkomende *in vitro* testen toonden aan dat de *Bacillus* wel degelijk in staat is om *Legionella* in een watersysteem onder controle te houden. Bijkomend onderzoek zal uitwijzen of deze aanpak haalbaar is voor praktijktoepassingen, eventueel in combinatie met bestaande waterbehandelingssystemen.

Besluit

Gedurende het vierjarige *Legionella* project werd duidelijk dat de huidige bestrijding van *Legionella* d.m.v. een aantal waterbehandelingstechnieken uiterst inefficiënt is, met mogelijks *Legionella* opstoten als gevolg. Dit onder meer door bepaalde overlevingsstrategieën zoals necrotrofie die *Legionella* heel persistent maken. De ontwikkeling van een biologische controle van de pathogeen met onschadelijke necrotrofe competitiebacteriën kan een uitkomst bieden.

Relevante literatuur

1. Devos, L., N. Boon, and W. Verstraete. 2006. *Legionella pneumophila* in the environment: occurrence of a fastidious bacterium in oligotrophic conditions. *Rev. Environ. Sci. Biotech.* *In press.*
2. Fields, B., R. Benson, and R. Besser. 2002. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:506-526.
3. Molmeret, M., M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. Abu Kwaik. 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:20-28.

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

5. Temmerman, R., Vervaeren, H., Boon, N. and W. Verstraete 2006. Necrotrophic growth of *L. pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4323-4328.

6. van der Kooij, D., H. Veenendaal, and W. Scheffer. 2005. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res.* 39:2789-2798.

7. Vervaeren, H., R. Temmerman, L. Devos, N. Boon and W. Verstraete. 2006. Introduction of a boost of *Legionella pneumophila* in a stagnant water model by heat treatment. Submitted to *FEMS Microbiol. Ecol.*

8. Webb, J.S., L.S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov and S. Kjelleberg. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 185:4585-4592.

9. Wellinghausen, N., C. Frost, and R. Marre. 2001. Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3985-3993.

Dr. R. Temmerman

*R&D Manager Chrisal N.V.
Priester Daensstraat 9
3920 Lommel
Tel. 011/54.80.00
Fax. 011/54.80.02
Robin@chrisal.be*