

Seminární práce- Výzkumný projekt mého potenciálního zaměření

Téma: Vliv bakteriálních biofilmů na šíření Legionelly a potenciální způsob omezení jejího výskytu ve vodních prostředích.

Martin Šotek, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, obor
Speciální biologie

1. Úvod do problematiky a popis současného stavu

1.1 Bakteriální biofilmy

Biofilm je mikroskopický ekosystém, jenž je tvořen mikroorganismy, jež jsou přichyceny na živém či neživém povrchu a k sobě navzájem (Bailey, William, C., 2011) Biofilmy jsou útočištěm pro mnoho druhů mikroorganismů, ale jsou to ve většině případů bakterie, které jsou zodpovědné za vznik těchto mikrobiálních společenstev. Pouze bakterie a řasy mohou tvořit biofilmy tím, že se přichytí k povrchu a začnou ze svého povrchu vylučovat lepkavé polysacharidy a postupně vytvářet kolem sebe slizký ochranný obal. Ten poskytuje ideální prostředí pro mikroorganismy, které nejsou schopny biofilmy vytvářet samostatně, včetně virů, prvoků a bakterií s nedostatečnou schopností pro tvorbu biofilmů. Postupně se vytváří rozsáhlá mikrobiální komunita schopná vnitrodruhové i mezidruhové komunikace sestávající ze širokého spektra mikroorganismů, mezi kterými mohou být i potenciální patogeny.(Chalmers et. al., 2014) Schopnost tvořit biofilmy, nebo se přichytit k již existujícímu biofilmu se označuje jako primární, respektive sekundární kolonizace.(Szewzyk et. al., 2000) Tvorba biofilmů také souvisí se změnami buněčné fyziologie u bakterií, které biofilm vytvářejí.(Larsson et. al. 2008) Mezi patogenní bakterie, které mají schopnost tvořit biofilmy, patří například *Vibrio cholerae* a *Helicobacter pylori*. (Yildiz and Schoolnik, 1999) Schopnost přichytit se k již existujícímu biofilmu a stát se jeho součástí byla prokázána u mnoha bakteriálních patogenů.(Chalmers et.al., 2014) Vznik biofilmů je podmiňován mnoha faktory, jako jsou přítomnost potravy v prostředí, hustota vyskytujících se organismů, změna teploty a jiné biotické i abiotické faktory.(Al-Azemi et. al., 2010) Vznik biofilmu bývá často považován za obrannou reakci proti přílišnému stresu.(Costerton et. al., 1999) To může mít mimořádný význam pro patogeny, protože ty mohou mít problém při přežití ve vodním prostředí, jež se v mnohém liší od prostředí jejich hostitele (například osmotický tlak, nebo nedostatek potravy, teplota). Vystavení různým nepříznivým vlivům, jako je přítomnost mikrobicidních látek, může představovat spouštěč pro tvorbu biofilmů. Biofilmy mohou představovat zdroj potenciální kontaminace vodních prostředí, zejména vodárenských trubek. Schopnost uvolňovat mikroorganismy zachycené v biofilmu do vodního proudu závisí na stabilitě biofilmu a síle proudu. Biofilmy mohou mikroorganismům poskytovat mnoho výhod. Především se jedná o vyšší mechanickou a chemickou ochranu (prostředí biofilmu poskytuje větší šanci na přežití), vyšší metabolický potenciál (metabolické produkty jednoho druhu mohou být využity jinými druhy mikroorganismů), mezidruhová interakce a komunikace,

výměna genetického materiálu (vnitrodruhová i mezidruhová konjugace mezi bakteriemi, může zvýšit patogenitu, nebo vytvořit nové patogenní kmeny). (Chalmers et. al., 2014)

1.2 Legionella sp.

Biofilmy jsou prostředím, které hraje velkou roli při přenosu vodou šířitelných patogenů. Mezi patogenní bakteriální rody nejvíce přizpůsobené k šíření v biofilmech patří rod *Legionellae*. (Chalmers et. al., 2014) *Legionelly* jsou gram-negativní nesporulující bakterie patřící do třídy Gammaprotobacteria. Tyto bakterie jsou krátké (přibližně 0,3-0,9 μm široké a 1-3 μm dlouhé) tyčinkovitého až kokobaciliárního tvaru. (Rodgers et. al, 1978) Většina druhů je schopna aktivního pohybu ve vodním prostředí a uvnitř infikovaných buněk (kromě *L. oakridgensis*, *L. londinensis* a *L. nautarum*) pomocí jednoho nebo více bičíků. Možný je také výskyt pillů a fimbril. *Legionelly* jsou striktně aerobní a ke svému růstu potřebují L-cystein a železité soli, to je také důvod proč je není možné kultivovat na běžných bakteriologických médiích. Optimální kultivační teplota je 35°C. *Legionelly* obsahují katalázu a nejsou schopny redukovat dusičnany, také nemohou zpracovávat uhlovodíky pomocí oxidace nebo kvašení. (Chalmers et. al., 2014) Rod *Legionellae* sestává ze zatím známých padesáti druhů. (Wullings and Van der Kooij, 2006) Nejvýznamnějším a nejběžnějším patogenem v tomto rodu je *L. pneumophilla* (způsobuje více než 70% případů legionelózy). Mezi další významné druhy z klinického hlediska patří *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumofii* a *L. longbeachae*. (Joseph, 2002)

Legionelly způsobují legionelózu, která může mít dvě formy- legionářskou nemoc a tzv. Pontiackou horečku (Pontiac fever). Pontiacká horečka je výrazně častější, má krátkou inkubační dobu (1-2 dny) a způsobuje chřipce podobné symptomy (zejména kašel, horečku, malátnost, bolesti hlavy, nevolnost, průjem, zvracení) nejedná se o závažné onemocnění, symptomy trvají 2-7 dní). Legionářská nemoc má delší inkubační dobu (2-10 dní), není příliš častá, ale má vážnější průběh. Napadá respirační systém a způsobuje vážné pneumonie, napadá také centrální nervovou, gastrointestinální a vylučovací soustavu. Nemoc může trvat od několika týdnů do několika měsíců). Fatalita se pohybuje okolo 10%. (Chalmers et. al., 2014) Legionelóza se nejčastěji přenáší kontaminovanými aerosoly. Mezi nejčastější zdroje legionelózy patří zvlhčovače, rozprašovače, zdroje pitné a horké vody, sprchové hlavice a vířivky. (Wullings and Van der Kooij, 2006) Přesun z člověka na člověka se předpokládá za nepravděpodobný. Nejčastěji používané antibiotikum proti *legionellám* je erytromycin, účinný je také ciprofloxacin nebo rifampicin. (Chalmers et. al., 2014)

Legionella se nejčastěji vyskytuje v přirozených a v člověkem uměle vytvořených vodních prostředích, kde je teplota vody vyšší než v okolním prostředí. Výskyt *legionelly* ve vodovodním systému nemusí nutně vést k propuknutí epidemie legionelózy, nebo ke zvýšení počtu nakažených, přesto mohou aerosoly obsahující tyto bakterie vést k nemocničním nákazám, nebo k nakažení osob s potlačenou imunitou. Ve vodním prostředí dokáže *Legionella* úspěšně přežívat intracelulárně uvnitř prvoků, nejčastěji rodů *Naegleria* a *Acanthamoeba*. Jejich plazmatická membrána jim poskytuje dostatečnou ochranu před různými škodlivými vlivy. Bylo zjištěno, že tímto způsobem mohou napadat i makrofágy a

přežívat v jejich fagozomech, kterým dokážou zabránit ve sloučení s lysozomem. (Chalmers et. al., 2014)

2. Definice problému a navržení řešení

Legionelly dokážou úspěšně přežívat a množit se v biofilmech vyskytujících se ve vodovodních systémech. (Chalmers et. al., 2014) Bylo prokázáno, že se *legionella* vyskytuje v 100% biofilmů z umělých a v 81% biofilmů z přirozených vodních prostředí. Prvoci rodů *Naegleria* a *Acanthamoeba* se v těchto biofilmech vyskytovali velmi hojně, což dokazuje, že je *Legionelly* hojně využívají ve svůj prospěch. To jim pomáhá úspěšně přežít a množit se v biofilmech. (Declerk et. al., 2007) Pomocí dezinfekce je možné snížit množství *legionelly* ve vodních prostředích. Chloramin je považován za efektivnější vůči *legionelle* než chlor a oxid chloričitý se ukázal být velmi účinný proti mikroorganismům vázaným v biofilmech. (Chalmers et. al., 2014) Schopnost proniknout do buněk prvoků se jeví jako klíčová při přežití působení dezinfekce, protože bakterie ukryté uvnitř prvoků dokážou snést i několikanásobně vyšší dávku dezinfekce. (García et. al., 2007) Tepelná dezinfekce je v případě *Legionelly* účinná nad 60°C. Jako alternativní způsob regulace biofilmů jako zdrojů potenciální nákazy *legionellou* se může jevit použití žlučových kyselin obsahujících taurin. Bylo zjištěno, že kyselina taurocholová, která je produkována kmenem bakterie *Rhodococcus erythropolis* vyskytující se v rybí mikroflóře, dokáže inhibovat vznik biofilmu produkovaného bakterií *Vibrio cholerae* a také způsobuje rozpad již vzniklého biofilmu této bakterie. Tato látka patří mezi žlučové kyseliny produkované lidským tělem. V další fázi tohoto výzkumu bylo zkoumáno působení 12 lidských žlučových kyselin (včetně kyseliny taurocholové) na tvorbu a rozpad biofilmů tvořených bakteriemi *Vibrio cholerae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Z těchto vybraných 12 žlučových kyselin tři vykazovaly působení pouze vůči biofilmům tvořenými *Vibro Cholerae*, tři působily proti biofilmům *Pseudomonas aeruginosa* a jedna účinkovala proti obojím typům biofilmů. Je možné, že by tyto žlučové kyseliny mohly účinkovat i proti biofilmům tvořenými jinými typy bakterií. (Sanchez et. al., 2016)

3. Metoda řešení a cíl práce

Cílem mé potenciální vědecké práce by bylo zjištění účinků lidských žlučových kyselin na tvorbu a rozpad vzorků bakteriálních biofilmů odebraných z vodovodní sítě. Kdyby se prokázal účinek některých žlučových kyselin na biofilmy tvořenými různými typy bakterií, bylo by možné vytvořit směs těchto účinných látek, která by účinkovala vůči všem typům biofilmů vyskytujících se ve vodovodní síti. Tato směs by mohla tvořit šetrnější a možná i účinnější alternativu k dnes již používané chlorové dezinfekci. Omezení výskytu biofilmů ve vodovodní síti by mohlo představovat zhoršení podmínek pro různé druhy patogenních bakterií tvořících, nebo využívajících biofilmy, včetně *Legionelly*. Používání této alternativní dezinfekce by teoreticky mohlo vést ke snížení pravděpodobnosti lokální epidemie legionelózy, stejně jako možného nakažení touto chorobou.

4. Závěr

Cílem této seminární práce bylo poukázat na spojitost mezi šířením legionelózy a výskytem bakteriálních biofilmů ve vodních prostředích a navrhnout řešení, které by mohlo pomoci v prevenci a likvidaci kontaminace vodních zdrojů *Legionellou* a případně i dalšími bakteriálními chorobami přenášenými vodou. Domnívám se, že jsem zde tuto problematiku dostatečně vysvětlil a že navrhované řešení pro ni je smysluplné a uskutečnitelné. Chtěl bych se tomuto tématu věnovat i ve své bakalářské, případně diplomové práci.

5. Zdroje

Al-Azemi, A., Fielder, M.D., Abuknesha, R.A., Price R.G., 2010 Effects of chelating agent and enviromental stresses on microbial biofilms: relevance to clinical mikrobiology. J. Appl. Microbiol.

Bailey, WC 2011, *Biofilms : Formation, Development And Properties*, New York: Nova Science Publishers, Inc, eBook Academic Collection Trial, EBSCOhost, viewed 3 January 2017.

Costerton, J.w., Steward, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284.

Declerk, P., Behets, J., Van Hoef, V., Ollevier, F., 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. Water. Res.

García, M.T., Jones, S., Pelas, C., et. al., 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella Pneumophila* after disinfection. Environ. Microbiol.

Chalmers, R, Gray, N, Williams, D, Percival, S, & Yates, M 2014, *Microbiology Of Waterborne Diseases : Microbiological Aspects And Risks*, Amsterdam: Academic Press, eBook Academic Collection Trial, EBSCOhost, viewed 3 January 2017.

Joseph, C., et. al., 2002. Surveillance of legionnaires' disease in Europe. In: Marre, R (Ed.), *Legionella*. ASM, Washington DC.

Larsson, S., Mezule, L., Juhna, T., 2008. Survival of E.coli in drinking water biofilm: the application of FISH technique. Techneau.

Rodgers, F.G., Macrae, A.D., Lewis, M.J., 1978. Electron microscopy of the organism of Legionnaires' disease. Nature (London).

Sanchez, L, Cheng, A, Warner, C, Townsley, L, Peach, K, Navarro, G, Shikuma, N, Bray, W, Riener, R, Yildiz, F, & Lington, R 2016, 'Biofilm Formation and Detachment in Gram-Negative Pathogens Is Modulated by Select Bile Acids', *Plos One*, 11, 3, p. e0149603, MEDLINE Complete, EBSCOhost, viewed 3 January 2017.

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.H., 2000. Microbiological safety of drinking water. *Ann. Rev. Microbiol.*

Wullings, B.A., van der Kooij D., 2006. Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. *Appl. Environ. Microbiol.*

Yildiz, F.H., Schoolnik, G.K., 1999. *Vibrio Cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

