

Powstawanie biofilmu w warunkach przemysłowych.

Cz. 3. Zagrożenia bakteriami *Legionella pneumophila* .

Dr. habil. Anna Sałek

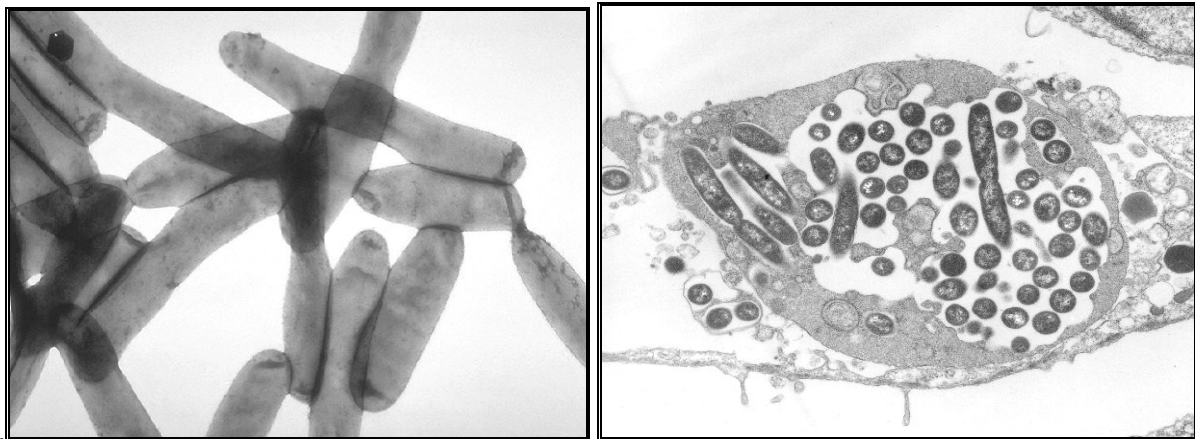
International Bio-Consulting, Germany; Domatec GmbH, Niemcy

Anna.Salek@T-Online.de www.international-bio-consulting.com

Bakterie *Legionella pneumophila*

Problematyka wspomnianych wyżej bakterii *Legionella pneumophila*, szczególnych patogenów, pojawia się nie tylko w ośrodkach użyteczności publicznej (baseny, hotele, szpitale, sanatoria) lecz również w zakładach przemysłu spożywczego.

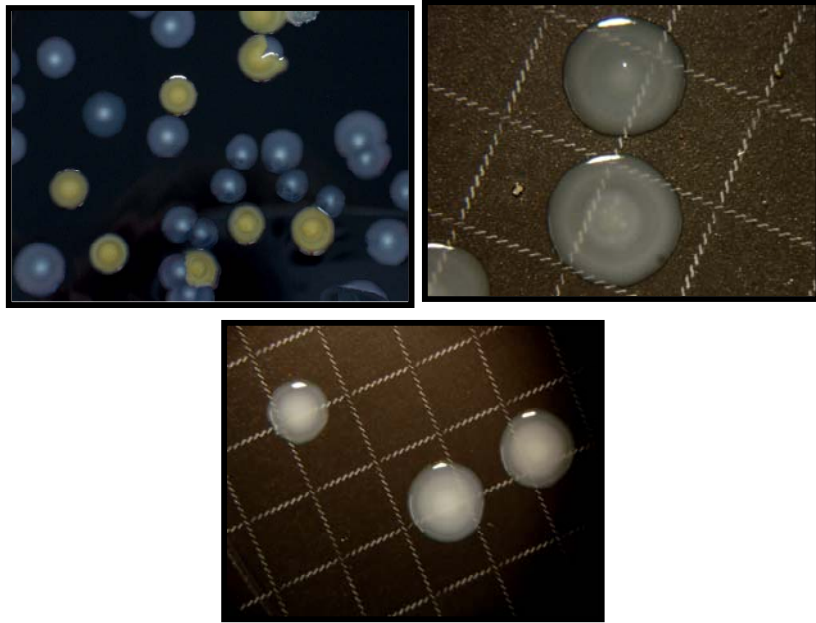
Legionella to bakterie tlenowe, gram-ujemne, niesporujące, ruchliwe, o długości 2-5 µm (Rys. 1), występujące pod postacią kilkudziesięciu (ponad 40) gatunków, przy czym najbardziej patogenną jest *Legionella pneumophila* grupy serologicznej 1 (spośród 15 grup sorologicznych).



Rys. 1. Bakterie *Legionella* sp.: A. – Zdjęcie spod mikroskopu elektronowego, B. – Ekosystem z bakteriami *Legionella*.

Morfologicznie kolonie bakterii *Legionella pneumophila* są bardzo zróżnicowane, zależnie od grupy serologicznej (Rys. 2). Wszystkie gatunki *Legionella* wymagają do wzrostu

mikroaerofilnych warunków, wilgoci oraz specyficznych podłoży, wzbogaconych m. in. w jony żelaza i aminokwasy, jak cysteinę i glicyna.



Serogrupa 1

Serogrupa 1

Serogrupa 2-15

Rys. 2. *Legionella pneumophila* serogrupa 1 na podłożu selektywnym GVPC (a), na czarnym filtrze celulozowo-octanowym i pożywce GVPC (b) i *L. pneumophila* serogrupy 2-15 również na czarnym filtrze celulozowo-octanowym umieszczonym na pożywce GVPC [Photo: A. Salek].

Bakterie *Legionella* występują w wodach powierzchniowych i w ziemi, w naturalnych zbiornikach słodkowodnych, jak również w wodach zasolonych (morskich). Etiologia choroby legionelloza wywodzi się od zmasowanego zachorowania żołnierzy z Legionów wojsk amerykańskich, stacjonujących w Filadelfii (182 spośród 4000) i śmierci 29 legionistów, wywołanej w 1976 roku przez nieznanne mikroorganizmy, od których pochodzi nazwa wyizolowanej bakterii – *Legionella*. Bakterie te atakowały górne drogi oddechowe (objawy podobne, jak przy zapaleniu płuc) i tak, jak przy grypie, powodowały wysoką temperaturę, odwodnienie organizmu, a w przypadkach osłabionego systemu immunologicznego (15-20%) – śmierć.

Czas inkubacji bakterii *Legionella pneumophila* (grupy serologicznej 1) wynosi 2 – 10 dni. W Niemczech rocznie notuje się 6.000 – 10.000 zachorowań i ok. 1000 – 2000 przypadków śmiertelnych.

Jedynym spośród antybiotyków, który jest w stanie zapobiec rozwojowi choroby i śmiertelnym zejściom to erytromycyna lub z nowszych wersji: azytromycyna oraz fluorchinoliny.

Zródłem infekcji bakteriami *Legionella pneumophila* jest rozpylona ciepła woda w postaci aerozolu, gdyż optimum temperatury dla tych mikroorganizmów wynosi 35 – 45°C. Stąd wszelkiego rodzaju cyrkujące wilgotne powietrze w urządzeniach klimatyzacyjnych oraz ciepłe opary z aparatów do inhalacji, czy z różnego rodzaju natrysków, ociekaczy, systemów chłodniczych - stanowi zagrożenie i możliwość transportu bakterii do organizmu ludzkiego w czasie oddychania.

W browarnictwie, z zagadnieniem bakterii *Legionella* spotkać się można wówczas, gdy klasyczny proces technologiczny poddany jest modernizacji wg nowych trendów, np. podczas suplementacji brzeczek związkami mineralnymi. Ponadto jakość i skład chemiczny wód technologicznych (stężenie elektrolitów, jonów nieorganicznych, TOC i pH) w dużej mierze warunkuje potencjał zagrożenia bakteriami *Legionella* i pałeczkami jelitowymi. Wynika to z faktu specyficznych zapotrzebowań i właściwości fizjologicznych w.w. bakterii na związki mineralne, szczególnie na te, które są interesujące z punktu widzenia technologii piwowarstwa (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+3}).

Wiadomo, że bakterie *Legionella pneumophila* i inne bakterie Gram-ujemne są wrażliwe na związki chelatujące (np. EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid czy cytrynian), powszechnie stosowane przy sanizacji obiektów zakażonych tymi mikroorganizmami. Na tej podstawie stwierdzono, że szczególnie *Legionella pneumophila* do aktywnego wzrostu i metabolizmu potrzebuje właśnie tych metali, które są wiązane przez EDTA. Wyjątkowo ważne dla prawidłowego metabolizmu bakterii *Legionella* jest żelazo, cynk, mangan i miedź. Metale te wchodzi w skład trzech klas metalo-enzymów, dysmutazy nadtlenkowej (SOD, *superoxide dismutase*, *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD*), osłaniających komórkę przed ujemnymi efektami nadtlenku wodoru, katalazy, peroksydazy i innych oksydantów ze środowiska [John & Steiman, 1996; Reeves i in., 1981; Sadosky i in., 1994; Yaradou i in., 2007].

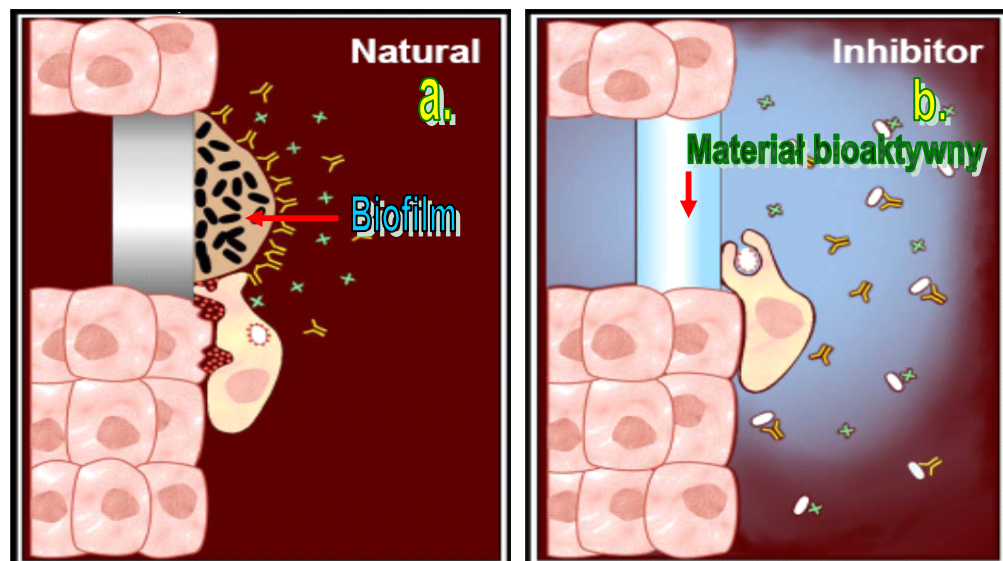
Istnieje więc ryzyko, że zbyt duża zawartość żelaza w wodzie technologicznej może sprzyjać rozwojowi bakterii *Legionella pneumophila* i tworzeniu się biofilmu w instalacjach systemu wodnego browaru. Ponadto suplementacja brzeczek jonami Zn^{+2} , czy Cu^{+2} również wspiera system enzymatyczny dysmutaz, ochraniając bakterie *Legionella pneumophila*, poprzez aktywność SOD, przed wolnymi rodnikami.

Jony Zn^{+2} , niezależnie od bioaktywności w dysmutazach, odgrywają ważną rolę w mechanizmie adsorpcji bakterii *Legionella* do powierzchni innych mikroorganizmów, rozwijających się w biofilmie, co jest związane z systemem receptorowym *Legionella pneumophila* i wzmożoną, w wyniku podwyższonej koncentracji jonów cynku, zdolnością adhezyjną do innych komórek.

W przeciwieństwie do jonów cynku miedź sama w sobie, jako metal, jest doskonałym inhibitorem wzrostu bakterii *Legionella pneumophila* i innych patogenów, co jest ważnym aspektem w browarach, gdyż do dziś wiele z nich jest wyposażone w urządzenia, m.in. kadzie, których głównym materiałem jest miedź.

Perspektywy badań nad biofilmem i materiałami do instalacji

Pewnym praktycznym sposobem likwidacji biofilmu jest opracowanie specjalnych materiałów do budowy instalacji wodnych (lub do innych płynów technologicznych), np. powłok nano-polimerowych, które uniemożliwiają osadzanie się biofilmu na powierzchniach rur i urządzeń, pozostających w ciągłym kontakcie z wodą (Rys. 3).



Rys. 3. Diagram przedstawia model formowania się biofilmu na materiałach do budowy instalacji: a). Instalacja z materiału naturalnego, tradycyjnego, na którym osadza się biofilm trudny do usunięcia, b). instalacja z materiału bioaktywnego (np. z nano-polimerów), na którym osadzanie się biofilmu jest praktycznie niemożliwe, a bakterie są zawracane do planktonu, gdzie podlegają inhibicji, np. przez

powszechnie stosowane środki odkażające, czy antybiotyki [Lewandowski i in., Montana State University – Bozeman, 1996, internet].

Dotychczas stosowaną metodą ograniczania rozwoju bakterii, a w związku z tym, formowanie się biofilmu na przemysłowych powierzchniach, było stosowanie materiałów o działaniu inhibitującym rozwój mikroorganizmów (instalacje ze stali kwasoodpornej lub z dużą domieszką miedzi [Rogers in., 1994a i 1994b]).

Regulacje prawne

Od szeregu lat, w Niemczech, gdzie analityka wody jest priorytetem, obecność bakterii *Legionella pneumophila*, zasiedlających instalacje wód technologicznych w przemyśle spożywczym, systemy doprowadzające wodę do picia (miejskie i prywatne), oraz objekty użyteczności publicznej (np. baseny, termy, urządzenia do fizykoterapii w sanatoriach, itp.), powierzchnie urządzeń chłodniczych (głównie w przemyśle) są ściśle kontrolowane, tj. objęte obligatoryjnymi badaniami (wg określonych metod, podanych w ISO normach), w akredytowanych laboratoriach (wg ISO 17025). Dozwolona ilość bakterii regulują ustawy oraz europejskie i wewnętrzne zarządzenia (np. VDI, DVGW, TrinkwVO 2001).

Wykrycie ponadnormatywnej liczby bakterii *Legionella pneumophila* (szczególnie z grupy serologicznej 1, najbardziej agresywnej w swojej patogenności) pociąga za sobą obowiązek informowania odpowiednich urzędów, odpowiedzialnych za bezpieczeństwo zdrowia obywateli (m.in. landowe ministerstwa ds. konsumentów). Konsekwencją skażeń jest nakaz dezynfekcji sieci wodnej przez specjalne, certyfikowane służby techniczne. Tok postępowania ujęty jest w regulacjach ogólnofederalnych oraz w systemie HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) i należy do tzw. *Hygiene Monitoring* środowiska miejskiego (przemysłowego, publicznego) oraz naturalnego [Türetgen & Cotuk, 2007].

Referencje

John G.St., Steiman H.M., Periplasmic copper-zinc superoxidase dismutase of *Legionella pneumophila*: Role in stationary-phase survival, 1996, J. of Bacteriology, 178 (6):1578-1584.

Lewandowski Z., Stoodley P., Biofilm Coceptual Illustration with Labels, 2006, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, MT, www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image_Library /Structure-Function/Full-image%20pages/BiofilmWithlabelsjpg.htm.

Reeves M.W., Pine L., Hutner S.H., George J.R., Harrell W.K., Metal requirements of *Legionella pneumophila*, 1981, J. of Clinical Microbiol., 13 (4):688-695.

Rogers J., Dowset A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W., 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, 1994a, Appl. Environ. Microbiol., 60 (5): 1585-1592.

Rogers J., Dowset A.B., Dennis P.J., Lee J.V. (1), Lee J.P. (2), Keevil C.W., Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems, 1994b, Appl. Environ. Microbiol., 60 (6): 1842-1851.

Sadosky A.B., Wilson J.W., Steinman H.M., Shuman H.A., The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability, 1994, J. of Bacteriology, 176 (12):3790-3799.

Yaradou D.F., Raze D., Ginevra F., Ader F., et al., Zinc-dependent cytoadherence of *Legionella pneumophila* to human alveolar epithelial cells *in vitro*, 2007, Microbial Pathogenesis, 43 (5-6):234-242.