

# Virkingen av cyanobakterier på vekst av *Legionella bozemanii*

Eva Aas



Mastergradsoppgave i molekylærbiologi  
**Institutt for molekylær biovitenskap**  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

05.10.2010



## Forord

Oppgaven ble utført ved Folkehelseinstituttets (FHI) divisjon for miljømedisin og avdeling for vannhygiene (MIVA). Daglig veiledning ble gitt av seniorforsker Hans Utkilen som også hadde ideen til oppgaven. Jeg vil takke ham for gode ideer, kunnskap og ikke minst optimisme og engasjement som gjorde oppgaven mulig. Det har vært fint å jobbe med en veileder som hele tiden uttrykte forvissning om at jeg ville evne og løse oppgaven på en bra måte.. Det har også vært en berikelse å møte deler av Utkilens store kontaktnett, og høre hans ideer og faglige vurderinger av andres arbeid. Samtidig vil jeg takke alle ansatte på MIVA for åpen og vennlig mottakelse av masterstudenter, og oppmerksomhet rundt vår situasjon og behov. Det har vært interessant å se hvilken forskning som utføres på MIVA og andre steder ved FHI

Oppgaven inngår i en mastergrad ved Universitetet i Oslo, studieretning for molekylær biovitenskap. Veileder fra universitetet var professor Reidun Sirevåg. Hun har bidratt med uvurderlig hjelp ved organisering og skriving av oppgaven. Hennes rutine har gitt perspektiv og trygghet, noe som var spesielt verdifullt når det oppstod problemer ved utføringen av arbeidet. Jeg vil takke henne spesielt for varme og omtanke i perioder da livet utenfor studiene førte til forsinkelser i arbeidet med oppgaven.

Til slutt vil jeg takke mine to minste nevøer Henrik og Kristian for interesse og undring omkring temaene i masteroppgaven. Deres iver etter å forstå fremgangsmåter, høre om resultater og finne forklaringer var en stadig kilde til ny inspirasjon.



## Sammendrag

*Legionella* er en vannlevende bakterieslekt som er alminnelig i norske innsjøer. Til tross for dette er det vist at *Legionella* stiller strenge krav til næring når den dyrkes i laboratoriet, og optimal vekst oppnås ved omkring 35 °C. Ved naturlige forhold er det imidlertid vist at *Legionella* kan vokse som intracellulær parasitt i flere typer protozoer. *Legionella* kan også overføres til mennesker via inhalerbare aerosoler. Dette kan føre til intracellulær vekst av *Legionella* i lungenes makrofager og derved alvorlig lungebetennelse. Av de mer enn 50 ulike artene i slekten *Legionella* er det *L. pneumophila* som i størst grad opptrer som opportunistisk humanpatogen. Den rådende oppfatningen er at naturlig vekst av *Legionella* er avhengig av eukaryote celler. Like fullt har vekstforsøk vist at den termofile cyanobakterien *Fisherella* kan stimulere vekst av *Legionella*. *Fisherella* og *Legionella* ble dyrket på næringsfattig medium ved 45 °C, uten tilsetning av eukaryote celler. Resultatene fra dette vekstforsøket var utgangspunkt for denne oppgaven. Hensikten med oppgaven var imidlertid også å undersøke forhold som tilsvarer de vi kan finne i naturen i Oslo-området. Av den grunn ble forsøkene utført ved 25 °C, og *Legionella* ble dyrket sammen med *Planktothrix agardhii* fra norske innsjøer. Resultatene viste at *P. agardhii* ikke stimulerte vekst av *Legionella* ved forhold som tilsvarer de som kan finnes i lokal natur.



## Forkortelser

BSA	Bovint serumalbumin
BCYE	Buffered charcoal-yeast extract
cfu	Colony forming units: Kolonidannende enheter
cyano	cyanobakterie
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
ER	Endoplasmatisk Retikulum
FEBS	Federation of European Biochemical Societies
FEMS	Federation of European Microbiological Societies
FHI	Folkehelseinstituttet
ISO	International Organization for Standardization
LD <sub>x</sub>	Letal dose som er dødelig for x % av forsøksdyrene.
LLAPs	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogens
NCBI	National Center for Biotechnology Information

## VIII

---

NIVA	Norsk institutt for vannhygiene
NIVA CYA	Betegnelse på cyanobakterier fra NIVA sin kultursamling.
MIVA	Divisjon for miljømedisin og vannhygiene ved FHI
PCC	Betegnelse på bakterier fra Pasteurinstittet sin kultursamling
P. ag +	<i>Planktothrix agardhii</i> NIVA CYA 34, en cyanobakteriestamme som produserer mikrocytin
P. ag -	<i>Planktothrix agardhii</i> NIVA CYA 116, en cyanobakteriestamme som ikke produserer mikrocytin
RT-PCR	Real-time Polymerase chain reaction
Sg	serogruppe



---

# Innhold

FORORD.....	III
SAMMENDRAG .....	V
FORKORTELSER .....	VII
INNHold .....	IX
1. INNLEDNING.....	1
1.1 <i>Legionella</i> .....	1
1.1.1 <i>Legionellaceae</i> .....	3
1.1.2 <i>Legionella</i> som intravacuolær parasitt.....	5
1.1.3 Genomet.....	10
1.2 Cyanobakterier.....	11
1.3 Virkning av cyanobakterier på <i>Legionella</i> .....	14
1.4 Årungen .....	15
1.5 Målet med oppgaven.....	16
2. MATERIALER OG METODER.....	17
2.1 Materialer.....	17
2.1.1 <i>Legionella</i> .....	17
2.1.2 Cyanobakterier.....	17
2.1.3 Dyrkningsmedier .....	18
2.2 Metoder.....	21
2.2.1 Sterilteknikk.....	21
2.2.2 Dyrking av celler for oppbevaring av kulturene .....	21
2.2.3 Vekstforsøk.....	21

---

3.	RESULTATER.....	25
3.1.1	Problemer for gjennomføringen av prosjektet.....	26
3.1.2	Dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> .....	27
3.2	Virkning av lys på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> .....	28
3.3	Virkning av tilsatte cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> .....	32
3.3.1	Virkning av tilsatte cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> dyrket i lys .....	32
3.3.2	Virkning av tilsatte cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> dyrket i mørke.....	34
4.	DISKUSJON .....	39
4.1	Drøfting av metode.....	39
4.1.1	Positiv kontroll av evne til vekst for <i>L. bozemanii</i> .....	39
4.1.2	Forurensing ved dyrking på ACES-medium .....	40
4.1.3	Bestemmelse av dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> .....	40
4.1.4	Påvirkning av heterotrofe bakterier. ....	41
4.2	Overlevelsen av <i>L. bozemanii</i> .....	42
4.3	Drøfting av resultater.....	42
4.3.1	Ingen vekst av <i>L. bozemanii</i> .....	42
4.3.2	Høyere dyrkbarhet av <i>L. bozemanii</i> ved tilsetning av cyanobakterier til næringsfattig medium. ....	44
4.3.3	Høyere dyrkbarhet av <i>L. bozemanii</i> i mørke .....	45
4.4	Konklusjon .....	45
4.5	Videre undersøkelser .....	46
	KILDELISTE .....	48
5.	VEDLEGG .....	A1
	Vedlegg 1 .....	A1
5.1.1	Virkning av tilsetning av levende cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> dyrket i lys.....	A1
	Vedlegg 2 .....	A3

---

5.1.2	Virkning av tilsetning av ekstrakter av døde cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> dyrket i lys .....	A3
	Vedlegg 3.....	A5
5.1.3	Virkning av tilsetning av levende cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> dyrket i mørke .....	A5
	Vedlegg 4.....	A7
5.1.4	Virkning av tilsetning av ekstrakter av døde cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>L. bozemanii</i> dyrket i mørke.....	A7
	Vedlegg 5.....	A9
5.1.5	Virkning av tilsetning levende cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>Legionella bozemanii</i> ved dyrking på 20°C.....	A9
	Vedlegg 6.....	A10
5.1.6	Virkning av tilsetning levende cyanobakterier på dyrkbarheten til <i>Legionella bozemanii</i> ved dyrking på 20°C .....	A10
5.1.7	Sammenligning av Figur V5 og V6.....	A10



---

# 1. Innledning

## 1.1 *Legionella*

*Legionella* er en gruppe bakterier som finnes naturlig i akvatiske miljøer, og som kan opptre som opportunistiske humane patogener i menneskeskapt systemer, som for eksempel kjøletårn. Humane infeksjoner av *Legionella* kalles med en fellesbetegnelse legionellose og infeksjonen kan ha to ulike forløp som kalles henholdsvis Legionærsyke eller Pontiac-feber etter to kjente sykdomsutbrudd.

Legionærsyken er en alvorlig form for lungebetennelse som fikk navnet etter en kongress for krigsveteraner ved Bellevue Stratford hotell i Philadelphia i 1976. Kongressen fikk mye oppmerksomhet i media etter at 29 veteraner og 5 forbigående døde av lungebetennelse, og det tok flere måneder å finne den medisinske årsaken. Obduksjoner viste ødeleggelser i alveolene i lungene, men kjente tester utelukket lenge både virus, bakterier og andre organismer, før man tilslutt klarte å isolere en bakterie fra lungevev. Bakterien lot seg dyrke noen dager i egg med kyllingembryoer, før embryoet døde. Marsvin ble så inokulert med infisert materiale fra eggene, og etter nitidig gransking ble det funnet en ansamling av bakterier i leveren til ett marsvin. Tidligere var det registrert at enkelte pasienter fra utbruddet i Philadelphia også hadde leversvikt. Ved hjelp av fluoriserende antistoffer klarte man å vise at det var bakterien som forårsaket sykdommen som var isolert, og den fikk navnet *Legionella pneumophila* (Fraser, 2005; Sharrar *et al.*, 1997). Pontiac-feber fikk navn etter et utbrudd av en alvorlig influensalignende sykdom hos personer som arbeidet i helsedepartementsbygningen i Pontiac, Michigan i 1968. Alle som ble rammet, hadde vært i bygningen mens luftkondisjoneringsanlegget var aktivt. Forsøk viste at marsvin som var utsatt for aerosoler av ufiltrert vann fra dette anlegget, utviklet lungebetennelse. Etter at legionærsyken fikk sin forklaring, ble det vist at også dette sykdomsutbruddet skyldes *L. pneumophila* (Fraser, 2005).

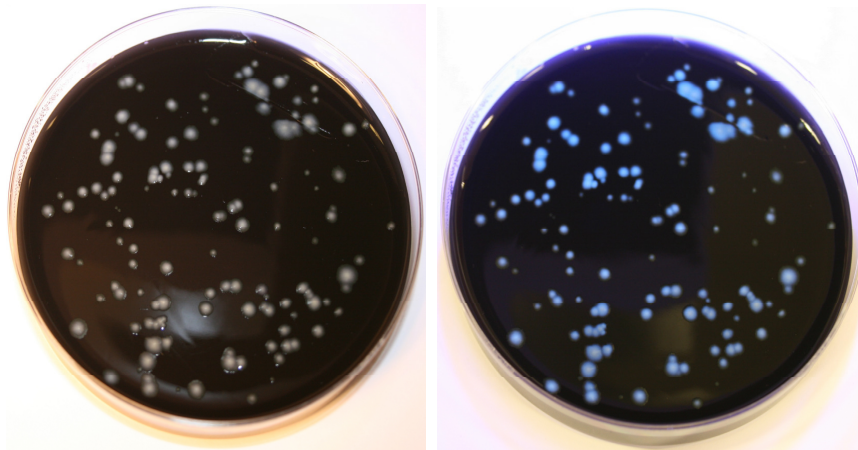
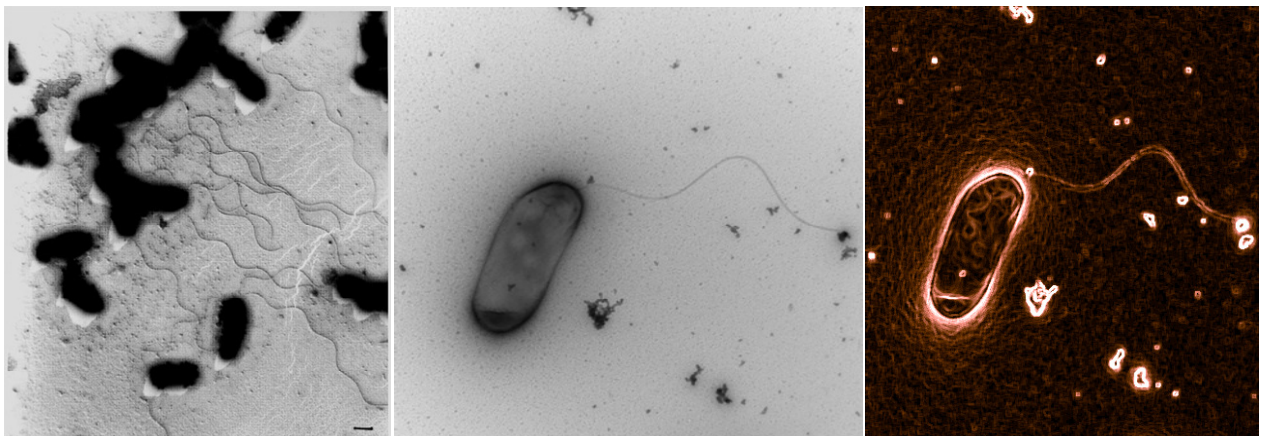


Fig. 1.1 Kolonier av *Legionella bozemanii* dyrket på agarskål med BCYE (Buffered charcoal-yeast extract). Til venstre: Fotografert under vanlig lys. Til høyre: Fotografert under UV-lys (365 nm) for å vise fluorisering. Foto: Eva Aas

*Legionella* defineres av det internasjonale standardiseringsbyrået som en slekt av Gram-negative organismer som normalt vokser etter minimum 2 dager på BCYE-agar som inneholder L-cysteine og jern(III). *Legionella* former kolonier, og disse er som regel hvite, rosa til blå eller limegrønn i farge. Enkelte arter fluoriserer under langbølget ultrafiolett lys, som vist i figur 1.1 *Legionella* vokser ikke i fravær av L-cystein, bortsett fra i noen veldig få unntakstilfeller (ISO 11731)

*Legionella* er en gramnegativ aerob, stavformet bakterie, bevegelig, med polar flagell, se figur 1.2. Den er omkring 0,5  $\mu\text{m}$  bred og 2  $\mu\text{m}$  lang og tilhører  $\gamma$ -proteobakteriene (Borella *et al.*, 2005). Dette er en bakterie med strenge næringskrav, og for å vokse i renkultur må den tilføres en rekke aminosyrer som L-cysteine, arginin, isoleucin, leucine, threonin, valin, metionin, fenylalanin, tyrosin og serin. Dessuten vil tilførsel av sporelementer som Fe, Mn, Mg, Ca, Zn, K, Mg og Cu i tillegg til fosfat stimulere veksten (Taylor *et al.*, 2009).



**Fig 1.2** Elektronmikroskopibilder av *Legionella pneumophila* med flagell. Cellene er omkring 0,5  $\mu\text{m}$  brede og 2  $\mu\text{m}$  lange. Bildet helt til høyre er manipulert i photoshop (Borella *et al.*, 2005; Ericsson, 2005; Robert Koch Institut, 2001).

---

Av alle aminosyrene *Legionella* må tilføres, blir L- cystein regnet for å ha størst betydning. Det er derfor verdt å merke seg at det i 1983 ble rapportert om vekst av *L. bozemanii* på medium uten L- cystein ved vekst sammen med *Flavobacterium breve* (Wadowsky *et al.*, 1983).

*Legionella* finnes naturlig i akvatiske miljøer, men arten utgjør mindre enn 1 % av bakteriepopulasjonen i et gitt miljø (Fliermans *et al.*, 1981). Bakterien kan overleve innenfor et vidt spekter av fysiske og kjemiske betingelser. Den er isolert fra vannprøver som varierte i temperatur fra 5,7 til 63 °C, og har en fettsyre sammensetning som ligner kjente termofile bakterier (Moss *et al.*, 1981; Moss *et al.*, 1977). Vekstforsøk med *Legionella* i amøber og biofilm har vist at *Legionella* vokste bra ved 40 °C, overlevde 50 °C, men døde ut når temperaturen ble holdt konstant på 60 °C eller mer (Rogers *et al.*, 1994).

### **1.1.1 Legionellaceae**

Det var i 2009 beskrevet 56 ulike arter som tilhører slekten *Legionella* som er den eneste slekten innenfor familien *Legionellaceae* (Gomez-Valero *et al.*, 2009). Den best beskrevne arten er *L. pneumophila* som har 15 serogrupper (sg) der *L. pneumophila* sg 1 regnes som den vanligste og den mest virulente *Legionella*-gruppen, se tabell 1.1 og 1.2. *L. pneumophila* sg 1 er imidlertid den eneste serogruppen som lar seg påvise ved hjelp av en enkel antistofftest av urin, noe som kan ha ført til en underdiagnostisering av legionærsyke som skyldes andre *Legionellaceae* (Gomez-Valero *et al.*, 2009). Vannprøvene i tabell 1.1 og 1.2 er i vesentlig grad hentet fra sykehus., og metodene i undersøkelsene kan derfor ha ført til at *L. pneumophila* sg 1 er overrepresentert både pasient- og vannprøvene.

	Internasjonalt	Frankrike	
	pasientprøver [%]	pasientprøver [%]	vannprøver [%]
<i>L. pneumophila</i> sg 1	84,2	95,4	28,2
<i>L. pneumophila</i> sg 3	1,0	1,2	10,8
<i>L. pneumophila</i> sg 6	1,7	0,8	11,1
<i>L.pneumophila</i> øvrige sg.	4,6	1,4	25,4
<i>L. pneumophila</i> totalt	91,5	98,8	75,5
<i>Legionella</i> untatt <i>L.pneumophila</i>	8,5	1,2	24,5
Totalt	100,0	100	100
Antall prøver	465	259	2747

**Tab 1.1** Fordelingen av enkelte serogrupper (sg) av *Legionella pneumophila* hentet fra to undersøkelser; en internasjonal studie og en fra Frankrike. Pasientprøvene er kliniske isolat fra pasienter med påvist legionærsyke. Vannprøvene er ikke systematisk samlet inn og et vesentlig antall kommer fra sykehus (Doleans *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2002).

	Internasjonalt	Frankrike	
	pasientprøver [%]	pasientprøver [%]	vannprøver [%]
<i>L. pneumophila</i>	91,5	98,8	75,5
<i>L. anisa</i>	0,2	0,8	13,8
<i>L. bozemanii</i>	2,4	0	0,4
<i>L. longbeachae</i>	3,9	0	0
<i>Legionella</i> øvrige arter	2,0	0,4	10,3
Totalt	100,0	100	100
Antall prøver	465	259	2747

**Tab 1.2** Fordelingen av noen av de vanligste artene *Legionella* hentet fra samme undersøkelser som tabell 1.1.1.1 (Doleans *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2002)

I Norge finnes det ikke oversikt over ulike *Legionella* i miljøprøver, men *L. pneumophila* sg 1, er isolert i forbindelse med sykdomsutbrudd (Nygård *et al.*, 2008). *Legionella bozemanii* er isolert fra innsjøen Årungen i Akershus. Det er bare pasienter med et vesentlig svekket immunforsvar som har fått påvist legionærsyke som følge av

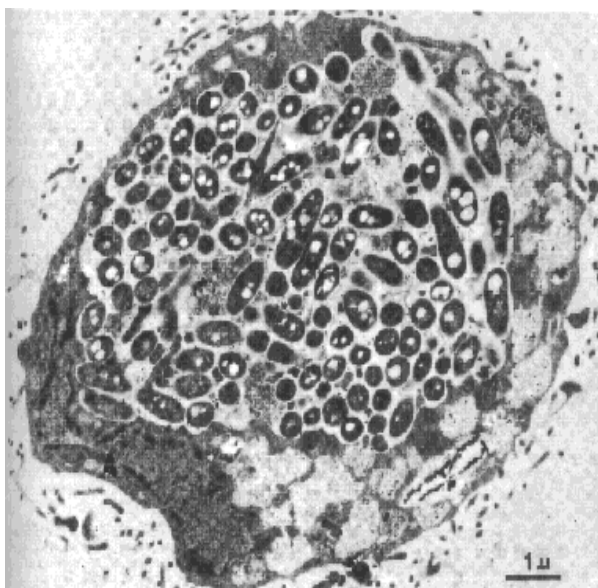


---

*L. bozemanii* (Widmer *et al.*, 2007). Tabell 1.2 viser at *L. bozemanii* utgjorde 0,4 % av *Legionellaceae* miljøprøvene, men den var ikke årsak til noen av sykdomstilfellene i Frankrike (Doleans *et al.*, 2004). Siden *L. bozemanii* er mindre patogen enn *L. pneumophila*, ble *L. bozemanii* benyttet i arbeidet med denne oppgaven. Det er likevel grunn til å behandle *L. bozemanii* med forsiktighet siden den i den internasjonale undersøkelsen, vist i tabell 1.2, utgjorde så mye som 2,4 % av tilfellene av legionærsyke selv med den tidligere nevnte muligheten for underrapportering.

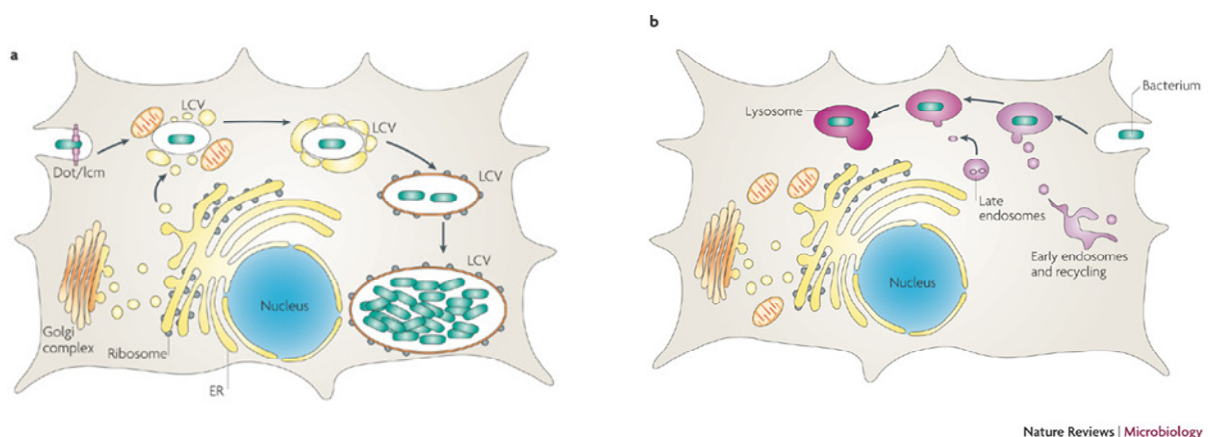
### 1.1.2 *Legionella* som intravacuolær parasitt

Allerede i 1980 ble det vist at *Legionella* har evne til å formere seg som intracellulær parasitt i amøber (Rowbotham, 1980) Det er til nå dokumentert at *Legionellae* har formert seg i 16 forskjellige arter av protozoer og 1 slimsopp (Fields, 2007). En stor overvekt av protozoene var amøber. Det er vist at veksten av *Legionella* i menneskeskapte systemer kan begrenses ved å kontrollere dannelsen av biofilm (Kuiper *et al.*, 2004; Murga *et al.*, 2001). Intracellulær vekst i eukaryote vertsceller spiller også en viktig rolle for *Legionella* som humanpatogen, og ved legionærsyke formerer *Legionella* seg i makrofager i lungealveolene (Franco *et al.*, 2009). Figur 1.3 viser infeksjon av *L. pneumophila* i lungene på et marsvin.



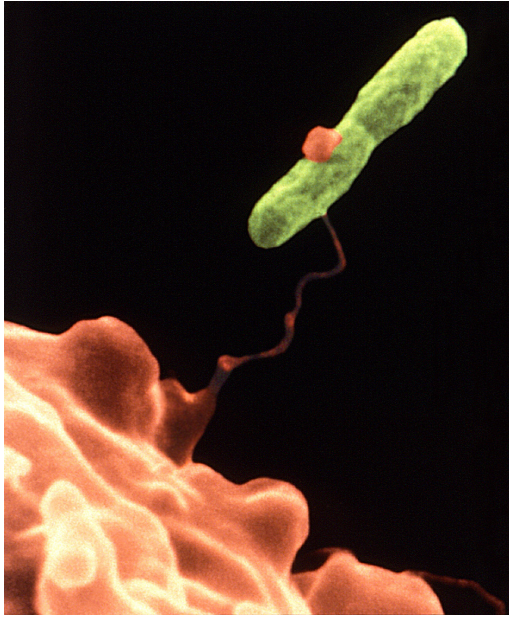
**Fig 1.3** Transmisjonselektroskopi fra lungealveole i marsvin infisert med *Legionella pneumophila*. (Rechnitxer *et al.*, 1992)

*Legionella* kan tas opp i vertsorganismene både ved reseptormediert endocytose der vertscellens eget cytoskjelett ødelegges av *Legionella*, og ved fagocytose der den eukaryote cellemembranen kveiler seg rundt bakterien (Abu *et al.*, 1998). Selv om opptaket av *L. pneumophila* kan foregå på ulike måter, vil opptaket av bakterien medføre at det dannes en vakuole med bakterie(r), se figur 1.4. Noen minutter etter at *L. pneumophila* er tatt opp, vil vakuolen omgis av mitokondria og vesikler som er frigjort fra vertens endoplasmatisk retikulum. Dette vil utvikle seg videre slik at vakuolen etter hvert er dekket av granulert endoplasmatisk retikulum som vertens immunforsvar ikke reagerer på, slik at *Legionella* kan formere seg uten å gjenkjennes av vertscellens immunforsvar (Isberg *et al.*, 2009).



**Fig 1.4a** Dannelsen av en vakuole til formering av *Legionella Pneumophila* i makrofag eller protozo. Dot/Icm (Defect in organelle trafficking / Intracellular multiplication) transporterer signalmolekyler fra *Legionella pneumophila* til vertscellen. Signalene fører til at mitokondria og vesikler transporteres til vakuolen (LCV: Legionella-containing vacuole). Vesiklene har membran fra er fra vertens ER (endoplasmatisk retikulum) og membranen vil etter hvert dekke vakuolen samtidig som proteiner fra vesiklene tilføres vakuolen. Videre rekrutteres ribosomer til vakuolen slik at vakuolen omgis av av granulert ER. *L. pneumophila* har skaffet et hulrom for formering som ikke oppdages av vertens immunforsvar.

**Fig 1.4b** Et vanlige forløpet når en ikke-patogen bakterie tas opp i makrofag eller protozoa. Bakterien ender i lysosomet hvor den brytes ned. (Isberg *et al.*, 2009)

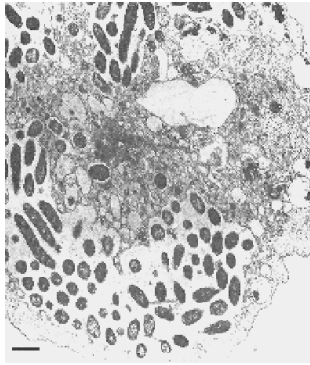


**Fig. 1.5** Elektronmikroskopi av amøben *Hartmannella vermiformis* (oransje) som fanger *Legionella pneumophila* (grønn) ved å strekke ut en pseudopod (Oceanus Magazine, 2009).

Foto: Centers for Disease Control and Prevention and Dr. Barry S Fields.

Mekanismen for opptak av *L. pneumophila*, er best beskrevet for amøben *Hartmannella vermiformis*. Denne strekker ut sin pseudopod for å fange bakterier som vist i figur 1.5 På overflaten av amøben er det et lektin som fungerer som reseptor for *L. pneumophila* og hemmes av galaktose/N-acetyl-galaktosamin (Hoffman *et al.*, 2007; Venkataraman *et al.*, 1997). Når levende *L. pneumophila* binder seg til reseptoren defosforylerer reseptoren og andre vertsproteiner som cytoskjelettproteinene paxillin og vinculin homologer (Venkataraman *et al.*, 1997) Det tyder på at *L. pneumophila* har en aktiv rolle når den tas opp ved fagocytose i *H. vermiformis*.

Opptak av *L. pneumophila* hos *Acanthamoeba* blokkeres ikke av galaktose/N-acetyl-galaktosamin i motsetning til det som var tilfelle hos *H. vermiformis*, og defosforyleringen av reseptoren er heller ikke like effektiv. Det antas derfor at flere reseptorer er involvert i *Legionellas* forankring og opptak i *Acanthamoeba* (Abu *et al.*, 1998; Venkataraman *et al.*, 1997). Figur 1.6 (s. 8) viser *Legionella lytica*, tidligere *Sarcobium lyticum*, som er avbildet i amøben *Acanthamoeba castellanii* (Adeleke *et al.*, 1996; Drozanski *et al.*, 1990; Palusinska-Szyszlak *et al.*, 2008).

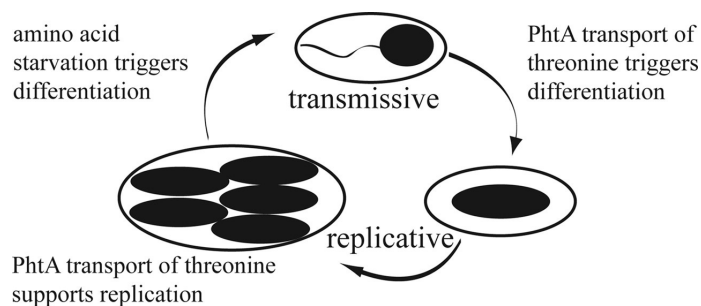


**Fig. 1.6** Transmisjonselektronmikroskopi av bakterien *Legionella lytica* (tidligere *Sarcobium lyticum*) i amøben *Acanthamoeba castellanii*.

— = 1  $\mu\text{m}$ .

(Adeleke *et al.*, 1996; Drozanski *et al.*, 1990; Palusinska-Szyszk *et al.*, 2008)

Det finnes mange *Legionella*-lignende patogene bakterier i amøber (*Legionella*-like amoebal pathogens: LLAPs). Disse har ikke latt seg dyrke på laboratoriemedium, men kan dyrkes i protozoa og makrofager, og føre til legionellose (Scola *et al.*, 2004). Det finnes også LLAPs som har utviklet seg til å være helt avhengi av spesifikke amøber for å kunne formere seg (Hoffman *et al.*, 2007) Videre har LLAPs i laboratorieforsøk utviklet mutualisme med *Amoeba proteus*, og blitt til en obligatorisk endosymbiont for amøben (Park *et al.*, 2004)



**Fig 1.7** Livsyklusen til *Legionella pneumophila*. Ved mangel på aminosyrer vil *L. pneumophila* uttrykke flagell for transport fra den anvendte verten til invasjon av nye vertsceller. Endringen av *L. pneumophila* til en delbar celle, vil utløses av at aminosyren treonin transporteres med PhtA (Phagosomal transporter A). (Sauer *et al.*, 2005)

*L. pneumophila* sin livssyklus er tilpasset en veksling mellom ekstracellulær overlevelse og intracellulær formering, se figur 1.7 (Sauer *et al.*, 2005). Forsøk har vist at makrofager infisert med *L. pneumophila* med uttrykt flagell, etter 19, 5 timer hadde en vakuole med dusinvis av *L. pneumophila* uten flageller. Etter at forsøket hadde pågått i 22 timer, uttrykte *L. pneumophila* igjen flageller noe som førte til

---

nekrose i makrofagene. (Byrne *et al.*, 1998). Når veksten av *L. pneumophila* når stasjonærfasen, er det blitt vist at den i makrofager har ødelagt membranen rundt vakuolen spredt seg til makrofagens cytosol, hvor bakterien har fortsatt å formere seg, før den har endret genuttrykk (Molmeret *et al.*, 2009). Endringen i genuttrykk reguleres av tilgjengelige aminosyrer (Sauer *et al.*, 2005). Etter noen timer i cytosol uttrykkes flagellen, det dannes porer i vertens cellemembran, og bakterien frigjør seg fra verten (Alli *et al.*, 2000; Molmeret *et al.*, 2009).

*L. pneumophila* viste en lignende tilpasning ved vekst på rikt medium. I den eksponentielle vekstfasen var *L. pneumophila* uten flagell og tolerant for endringer i konsentrasjonen av natrium. Når veksten avtok og kulturen gikk over i stasjonærfase ble imidlertid cellene bevegelige og cytotoxiske. Cellene var også natriumsensitive, men osmotisk resistente ved tilsetning av kaliumklorid. Endringen i fenotype fant ikke sted hvis aminosyrer ble tilført kulturen og forandringen kan derfor anses som en respons på manglende aminosyrer (Byrne *et al.*, 1998).

Det er vist at *L. pneumophila* kan frigjøres fra *Acanthamoeba* i en lytisk prosess der det dannes vesikler med hundrevis av *L. pneumophila*. Disse vesiklene kan pustes inn, og det antas derfor at vesiklene kan ha vært smittebærere ved enkelte tilfeller av legionellose (Hoffman *et al.*, 2007)

I næringsfattige omgivelser uten tilgjengelige vertsceller, kan *Legionella* etter hvert gå over i en inaktiv tilstand der inokulering av marsvin ikke fører til sykdom hos dyrene. Overgangen til inaktiv form er temperaturavhengig og går saktere ved 4 °C enn ved 37 °C. (Hussong *et al.*, 1987) *Legionella* er ikke dyrkbar på laboriemedium i inaktiv tilstand (Steinert *et al.*, 1997). Det er vist at *L. pneumophila* danner reservestoffet poly- $\beta$ -hydroxybutyrate for å kunne overleve i næringsfattige omgivelser, og at lavere nivå av dette lipidet henger sammen med redusert dyrkbarhet (James *et al.*, 1999). Inaktiv *Legionella* reaktiveres hvis den tilsettes amøben *Acanthamoeba castellanii* (Steinert *et al.*, 1997).

Ved dyrking av *L. pneumophila* på næringsrikt medium ble forholdet mellom virulens og temperatur endret. Ved dyrking av *L. pneumophila* sg 1 ved 37 °C viste bakteriekulturen en LD<sub>50</sub> verdi lik 4,0 log<sub>10</sub> for marsvin som pustet inn aerosoler. Tilsvarende forsøk, der temperaturen ble senket til 24 °C, viste LD<sub>50</sub> lik null, men når temperaturen ble satt tilbake til 37 °C steg samtidig verdien av LD<sub>50</sub> til opprinnelig verdi (Mauchline *et al.*, 1994). *L. pneumophila* endrer fenotype ved endringer i vekstforholdene, og dette kan sees i sammenheng med livssyklusen til *L. pneumophila* som frittlevende celler og intracellulære parasitter (Hoffman *et al.*, 2007).

### 1.1.3 Genomet

I skrivende stund, mars 2010, er det komplette genomet til 4 stammer av *L. pneumophila* publisert (Corby, Lense, Paris og Philadelphia sg.1). I tillegg er genomet til 2 stammer av *L. longbeachae* publisert. Denne organismen er den vanligste årsaken til Legionærsyken i Australia, men uvanlig i andre deler av verden (Kozak *et al.*, 2010). I tillegg er genomet til *L. drancourtii* sekvensert, og tidligere undersøkelser angir denne bakterien som en strengt intracellulær parasitt hos amøben *Acanthamoeba polyphaga* (Scola *et al.*, 2004).

Sammenlignende genomstudier har vist at bakterier som har spesialisert seg som intracellulære parasitter, er karakterisert av massivt tap av gener og reduksjon av genomet (Merhej *et al.*, 2009) Innenfor ordenen *Legionellales*, med familiene *Legionellaceae* og *Coxiellaceae*, viser genomstudier at intracellulære parasitter i amøber har omtrent dobbelt så stort genom som nære slektinger med intracellulær livsform i andre organismer. En mulig årsak til dette er at mange ulike bakterier passivt havner i amøber som bytte, og dermed ender et mangfold av bakterier opp i samme amøbe, noe som gir mulighet for horisontal genoverføring. Samtidig kan bakteriene særskilt spesialisere seg på å unngå nedbryting siden de har mulighet til å tas inn i amøben ved passive mekanismer (Moliner *et al.*, 2010). Det er bare kjent 12 genom fra ordenen *Legionellales*, slik at grunnlaget for sammenligningen er forholdsvis lite (NCBI, 2010).

---

## 1.2 Cyanobakterier

Cyanobakterier er utbredt over store deler av jordkloden og finnes i vann, jord og på steiner. Cyanobakterier er prokaryote organismer som inneholder klorofyll a som fotosyntetiserende pigment og phycobiliproteiner som lyshøstende pigmenter, og artenes farge varierer fra blågrønt til rødt. Mange arter har phycocyanin som lyshøstende pigment, disse får en blågrønn farge og tidligere ble cyanobakterier kalt blågrønnalger. At de tidligere var regnet som alger gjenspeiler hvor lite det er økologisk som skiller mikroalger fra cyanobakteriene (Garcia-Pichel, 2009).

Alle cyanobakterier er autotrofe og kan vokse med CO<sub>2</sub> som eneste karbonkilde, og CO<sub>2</sub>-fikseringen foregår først og fremst *via* den reduktive pentosefosfatveien også kalt Calvin syklus. De fleste cyanobakterier er obligat fototrofe og kan ikke vokse i mørket på organiske forbindelser. For øvrig har de enkle krav til næring og vokser hvis de har vann, lys og tilstrekkelig med uorganiske forbindelser. I naturlige omgivelser i ferskvann kan tilgangen til fosfat være en begrensende faktor (Garcia-Pichel, 2009). Likevel er det viktig å være klar over at cyanobakterier har evne til å lagre fosfor nok til to eller fire celledelinger, og oppblomstring av cyanobakterier kan forekomme når konsentrasjonen av løst fosfat er på det laveste (Mur *et al.*, 1999).

Eutrofiering av innsjøer fører som regel til en opphopning av fytoplankton, og det er mest alminnelig at cyanobakterier er den dominerende gruppen ved slike oppblomstringer (Paerl *et al.*, 2001). Dominansen av cyanobakterier har flere årsaker. For det første har eksperimenter vist at blant fytoplankton er det cyanobakterier som har høyest affinitet for fosfor og nitrogen, og cyanobakterier kan utkonkurrere annet fytoplankton ved forhold der nitrogen og fosfor er begrensende faktorer (Mur *et al.*, 1999). For det andre forbruker cyanobakterier lite energi for å beholde funksjon og struktur, og de kan derfor opprettholde en høyere vekstrate enn annet fytoplankton når lysintensiteten er lav. Dermed får de en konkurransefordel etter hvert som en oppblomstring fører til uklart vann (Mur *et al.*, 1999). For det tredje utsettes planktoniske alger for vesentlig mer gressing enn cyanobakterier, og fordi

cyanobakterier har færre naturlige fiender, gjør dette populasjonen av cyanobakterier mer stabil enn alger når den først er etablert (Mur *et al.*, 1999).



Fig. 1.8 Oppblomstring av cyanobakterier i Årungen, 2007 (Foto: Sigrid Haande, NIVA)

Mange cyanobakterier vokser optimalt ved temperaturer over 25 °C, noe som kan forklare hvorfor mange cyanobakterier har oppblomstring om sommeren i tempererte strøk (Mur *et al.*, 1999). Figur 1.8 viser oppblomstring av cyanobakterier i juli 2007. Bildet er fra Årungen i Akershus (NIVA, 2008).

Mange cyanobakterier kan regulere oppdriften ved hjelp av intracellulære gassvakuoler, og kan dermed øke eller redusere lysintensiteten ved å bevege seg opp og ned i vannmassene. Andre bakterier kan utnytte dette ved å feste seg til cyanobakteriene for å redusere sedimentering. (Paerl *et al.*, 1996)

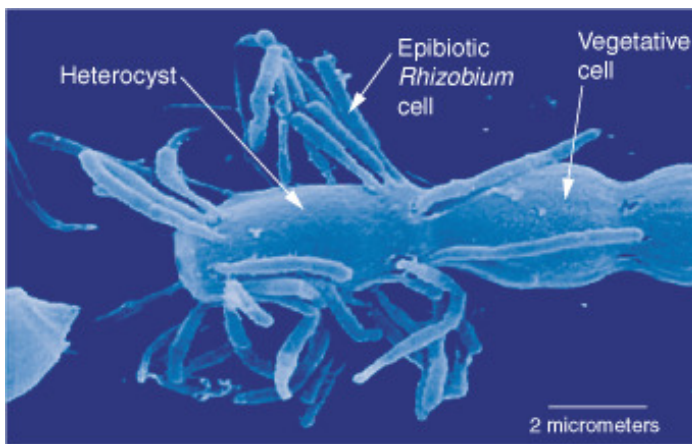
Cyanobakterier er morfologisk en sammensatt gruppe som kan deles inn i arter med enkeltstående, filamentdannende eller forgrenede arter (Garcia-Pichel, 2009). Noe av denne variasjonen er vist i figur 1.8, som gjengir de 3 artene som er benyttet i oppgaven. Dette er *Microcystis* som er en encellet organisme med enkel celledeling, der cellene går sammen og danner kolonier. Videre er det benyttet *Anabaena* som danner filamenter med heterocyster og *Planktothrix* som danner filamenter uten differensierte heterocyster.





**Fig 1.8** Mikroskopi av *Microcystis*, *Anabaena* og *Planktothrix* (FHI, 1999).

Mange cyanobakterier kan fikserer nitrogen. Enzymet nitrogenase som katalyserer nitrogenfikseringen inhiberes hvis de utsettes for  $O_2$ , og dette krever tilpasninger i forhold til fotosystem II hos cyanobakteriene som skiller ut oksygen. *Anabaena* er en nitrogenfikserende art som har spesialiserte celler, heterocyster, uten fotosystem II. Heterocystene har en ekstra tykk cellevegg som beskytter nitrogenasen mot oksygenet i omgivelsene. (Garcia-Pichel, 2009). I tillegg kan heterocyster være omgitt av heterotrofe bakterier, se figur 1.9. De heterotrofe bakteriene bidrar til å beskytte nitrogenasen ved å oksidere  $O_2$  til  $CO_2$  i miljøet rundt heterocysten.



**Fig 1.9** Sveipeelektronmikroskopi som viser et brukket filament av *Anabena* sp. Heterocysten er omgitt av stavformede celler med *Rhizobium* (Stevenson *et al.*, 2006). Bildet er farget blått og beskrevet (Heller, 2009).

Cyanobakterier uten heterocyster er også omgitt av heterotrofe bakterier (epifyttiske bakterier). I de frie vannmassene utgjorde epifyttiske bakterier som omgav *Microcystis*, mellom 19 og 40 % av den totale bakterieforekomsten (Sigeo, 2009). Det er mutualisme mellom cyanobakteriene og de epifyttiske bakteriene. Cyanobakteriene bidrar blant annet med næringsstoffer med fiksert nitrogen og organisk karbon samt  $O_2$ . De epifyttiske bakteriene bidrar blant annet med  $CO_2$ , redusert pH og uorganiske næringsstoffer.

Fylogenetisk utgjør cyanobakteriene en egen gruppe, tydelig adskilt fra sine nærmeste slektninger. Fylogenetiske undersøkelser støtter en teori om at kloroplaster har utviklet seg ved endosymbiose av cyanobakterier fordi plastisider fra alle hittil undersøkte kloroplaster utgjør en monofyletisk gruppe med nært slektsskap til nålevende cyanobakterier (Garcia-Pichel, 2009)

I perioden 1978 til 1998 registrerte NIVA 40 vann med regelmessig oppblomstring av cyanobakterier som produserer levertoksiner. 16 av oppblomstringene var dominert av *Anabaena*, 11 oppblomstringer var dominert av *Microcystis* og 9 oppblomstringer var dominert av *Planktothrix*. (FHI, 1999). Cyanobakteriene som er benyttet i oppgaven, er valgt ut fra artene i NIVAs registreringer. Det er bare arter som produserer levertoksiner som er medregnet i disse registreringene. Et kjent levertoksin er mikrocytin. I oppgaven er det benyttet to stammer av hver cyanobakterie, en stamme som produserer mikrocytin og en som ikke gjør det. Dette er gjort for å undersøke hvordan levertoksinet mikrocytin virker på *L. bozemanii*. Mikrocytin er et ikke-ribosomalt cyklisk peptid, og dets funksjon er ennå ikke kjent.

### 1.3 Virkning av cyanobakterier på *Legionella*

I 1980 ble det rapportert at den termofile cyanobakterien *Fisherella* stimulerte vekst av *Legionella* ved 45 °C (Tison *et al.*, 1980). Forsøket ble utført med prøver tatt fra en amerikansk forskningspark for miljø, ”Savannah River Site National Environmental Research Park”. Forskningsparken inneholdt områder som var sterkt påvirket av forurensing fra atomkraftverk og produksjon av kjernefysiske våpen (United States Department of energy, 2010b). Et pågående arbeid for opprensing av miljøet ble først satt i gang etter at Tison *et al.* utførte sine undersøkelser.

Kjølevannet fra anleggene dannet soner der temperaturen varierte mellom 55 °C og omgivelsestemperaturen. I disse områdene ble det påvist *Legionella sp.* i bakteriefilmer. Sammen med *Legionella* ble det også funnet cyanobakteriene *Fisherella*, *Phormidium* og *Planktothrix*. Cyanobakteriene ble isolert med sine

---

assosierte bakterier, og etter flere ukers dyrking, ble *L. pneumophila* sg 1 fortsatt påvist i cyanobakteriekulturene. Det ble videre gjort vekstforsøk med *L. pneumophila* der kulturer av *Fisherella* sp. som var frie for *L. pneumophila*, ble tilsatt bakterien og veksten målt. Fra de første 6 timene av dette forsøket, ble det rapportert om en veksthastighet for *L. pneumophila* som var høyere enn det man til da hadde oppnådd (Tison *et al.*, 1980).

Resultatene som ble beskrevet i artikkelen, Tison *et al.* 1980, er utgangspunktet for problemstillingen i denne oppgaven; undersøkelse av cyanobakteriers virkning på vekst av *Legionella*.

Cyanobakterier kan også påvirke *Legionella* via andre organismer. Som nevnt i avsnitt 1.1. om *Legionella*, bidro *Flavobacterium breve* til at *L. pneumophila* overlevde på laboratoriemedium uten L-cystein. Ved undersøkelse av et mulig samspill mellom cyanobakterier og *Legionella* er det verdt å merke seg at *Flavobacterium* kan leve som epifytt på cyanobakterier (Lupton *et al.*, 1981). Det er også tidligere nevnt at *Legionella* kan formere seg som intracellulær parasitt i protozoer, se avsnitt 1.1.2. Enkelte protozoer er kjent for å gresse på cyanobakterier, blant annet amøben *Naegleria* som også kan fungere som vert for *Legionella* (Fields, 1996; Xinyao *et al.*, 2006) I tillegg er det observert økte populasjoner av protozoer i forbindelse med cyanobakterieoppblomstringer (Sigeo, 2009). Undersøkelser av en eventuelt direkte påvirkning av cyanobakterier på *Legionella*, som i denne oppgaven, vil ikke være tilstrekkelige for å bekrefte om det er en årsakskjede der cyanobakterier virker på protozoer som i sin tur virker på *Legionella*.

## 1.4 Årungen

Årungen er en liten innsjø på 1,2 km<sup>2</sup> med gjennomsnittlig dybde på 8m, og vannets gjennomsnittstid i innsjøen (retensjonstid) er på 4,5 mnd slik at oppblomstringer ikke vaskes ut. Se figur 1.8 (s.12). Den eutrofe innsjøen ligger i et jordbruksområde ikke langt fra Universitetet for miljø- og biovitenskap på Ås i Akershus. De senere år har

det gjentatte ganger vært registrert oppblomstring av giftige cyanobakterier i innsjøen (NIVA, 2007; Romarheim, 2009).

Analyser i Årungen fra september 1998 viste at på det tidspunktet var *Anabena planktonica* den dominerende cyanobakterien mens *Aphanizomenon cf. klebahnii* var vanlig. På samme tid ble det funnet sporadiske funn av *Microcystis aeruginosa* og *Planktothrix agardhii* (Rudi *et al.*, 2000).

FHI avdeling MIVA tar jevnlig vannprøver fra Årungen, og *L. bozemanii* er isolert fra Årungen.

## 1.5 Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å undersøke om cyanobakterier kan påvirke vekst og dyrkbarhet av *L. bozemanii* i fravær av eukaryote celler og under vekstforhold som samsvarer med forholdene i Årungen. De gitte vekstforholdene omfatter både biotiske, fysiske og kjemiske faktorer. Vekst og dyrkbarhet er blitt undersøkt hos *L. bozemanii* i flytende kulturer, og er målt ved å telle kolonier på agarskåler.

---

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

Kjemikaliene ble bestilt fra Sigma og Fluka Bio Chemica, mediebasiser og BCYE-skåler fra Oxoid, fargeløsning fra Invitrogen.

#### 2.1.1 *Legionella*

Forsøkene er utført med en bakteriestamme av *Legionella bozemannie* som ble isolert fra Årungen i Akershus i 11.03.08. Isolasjonen ble utført i henhold til International Standard 11731, *Water quality - Detection and enumeration of Legionella*.

*L. bozemanii* ble funnet i en ubehandlet prøve, og artsbestemmelsen ble utført ved sekvensering av 300 basepar fra 16S rRNA genet. Sekvensen viste 100 % homologi med 16S rRNA genet til *L. bozemanii*. Analysen ble foretatt ved Enhet for molekylær epidemiologi og meningokokker på Folkehelseinstituttet. Betegnelsen ”organismen” er heretter i oppgaven synonymt med *L. bozemanii*.

#### 2.1.2 Cyanobakterier

Kulturer med cyanobakterier kom fra kultursamlingene ved NIVA (Norsk institutt for vannforskning) og Pasteurinstituttet i Paris.

Cyanobakterier	Stamme	Vannkilde
<i>Planktothrix Agardhii</i>	NIVA - CYA 34	Kolbotnvann, Akershus
<i>Planktothrix Agardhii</i>	NIVA - CYA 116	Årungen, Akershus
<i>Anabaena lemmermannii</i>	NIVA - CYA 438	Steinsfjorden
<i>Anabaena lemmermannii</i>	NIVA - CYA 298	Storavatn, Lindås, Hordaland
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA - CYA 228/1	Akersvannet, Vestfold
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIVA - CYA 143	Akersvannet, Vestfold

---

<b>Cyanobakterier</b>	<b>Stamme</b>	<b>Kilde</b>
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7806	Pasteurinstittet
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7806 mcyB $\pm$	Pasteruinstittet

### 2.1.3 Dyrkningsmedier

#### **ACES medium**

##### **Løsning 1**

ACES	5 g
Gjærekstrakt	2,5 g
Destilert vann	450 ml

pH justeres til 6,9 med 20 % NaOH

Autoklaveres og lagres ved 4°C

##### **Løsning 2**

Bovint serum albumin	5 g
Destilert vann	30 ml

##### **Løsning 3**

L-Cystein	0,20 g
Destilert vann	10 ml

##### **Løsning 4**

Jern-pyrofosfat	0,125 g
Destilert vann	10 ml

Når løsning 1 er avkjølt, tilsett løsning 2, 3 og 4 til løsning 1 ved sterilfiltrering

---

---

## O2 medium

---

### Jernkloridløsning

FeCl <sub>3</sub>	2,8 g
0,1 M HCl	100 ml

---

### EDTA-løsning

EDTA - Na <sub>2</sub> (titriplex)	3,9 g
0,1 M NaOH	100 ml

---

### Fe-løsning

Jernkloridløsning	10 ml
EDTA-løsning	95 ml

Bland Jernkloridløsningen og EDTA-løsningen og tilsett destilert vann til 1L. Autoklaver løsningen. EDTA løsning må lages for hver gang. Bruk heller ikke veldig gammel jernkloridløsning. For å hindre utfelling av jern tilsettes 10 ganger så mye EDTA som i den opprinnelige oppskriften.

---

### Natriumkarbonatløsning

NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Destillert vann	100 ml

Sterilfiltrer løsningen

---

### Mikroelementløsning

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,81 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>24</sub> · H <sub>2</sub> O	0,002 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,08 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,08 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,01 g
Destilert vann	1 L

Løsningen lagres ved 4 °C

---

## O2 medium

NaNO <sub>3</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,025 g
MgSO <sub>4</sub>	0,05 g
CaCl <sub>2</sub>	0,013 g
Destilert vann	0,980 L
Mikroelementløsning	1 ml

Autoklaver før Fe-løsning og Natriumkarbonatløsning tilsettes

Fe-løsning	10 ml
Natriumkarbonatløsning	5 ml

Juster eventuelt med destilert vann til 1 L løsning.

---

## **BCYE-agarskåler**

---

(BCYE: Buffered chacoal Yest Extract)

Oppskrift fra Oxoid. Skålene ble kjøpt ferdig derifra

### **Legionella CYE-agarbasis**

Aktivt kull	2 g/L
Gjærekstrakt	10 g/L
Agar	13 g/L

### **Legionella BCYE-vekstilskudd**

Buffer/ Kaliumhydroksid	10 g/L
Jern-pyrofosfat	0,25 g/L
L-cysteine HCl	0,4 g/L
$\alpha$ -Ketoglutarate	1,0 g/L

25g CYE-agarbasis løses i 900 ml destillert vann, kokes til det er fullstendig løst, autoklaveres og kjøles til 50 °C. Løs en porsjon BCYE-vekstilskudd i destilert vann, bland med CYE-agarbasis til 1 L ferdig løsning. Overfør til Petri-skåler.

## **Blodagarskåler**

---

Oppskrift fra Oxoid. Blodagarbasis ble kjøpt ferdig derifra, og skålene laget ved FHI sin substratlab.

### **Colombia blodagarbasis**

Spesialpepton	23,0 g/L
Stivelse	1,0 g/L
Natriumklorid	5,0 g/L
Agar	10 g/L

39 g blodagar basis tilsettes 1 L destilert vann, kokes til det er fullstendig løst, autoklaveres, kjøles og tilsettes 5 % sterilt defibrinert blod.

## **Diverse**

Sett med fargeløsning fra Invitrogen: LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy.



---

## 2.2 Metoder

I arbeidet med *Legionella bozemanii* ble det i henhold til internasjonale anbefalinger bare benyttet tekniker der faren for å danne aerosoler var minimal (ISO 11731).

### 2.2.1 Sterilteknikk

Det ble benyttet vanlig sterilteknikk der løsninger og utstyr ble sterilisert ved autoklaving. Løsninger som ikke tålte autoklaving ble steriltfiltrert.

### 2.2.2 Dyrking av celler for oppbevaring av kulturene

Kulturer med *L. bozemanii* ble dyrket på ACES-medium ved 37 °C til kulturen ble grønn, og deretter oppbevart i Erlenmeyerkolber ved 4 °C i omkring en måned.

BCYE-skåler med kolonier av *L. bozemanii* brukt som positiv kontroll i vekstforsøk, ble oppbevart ved 4 °C i omkring 5 måneder. I tillegg ble *L. bozemanii* lagret på GREAVES-medium i fryserør ved  $\pm 80$  °C.

Kulturer med cyanobakterier ble dyrket i lys ved 20 °C på O2-medum og fortynnet ved behov.

### 2.2.3 Vekstforsøk

I motsetning til en rekke vanlig forekommende heterotrofe bakterier vokser ikke *L. bozemanii* på blodagar (ISO 11731). Kulturer av *L. bozemanii* ble testet ved utsåing på blodagar før og etter forsøkene for å bekrefte at kulturen ikke var forurenset.

Konsentrasjonen av stamkulturen med *L. bozemanii* ble bestemt ved utsåing på BCYE-skåler og telling av kolonier. *L. bozemanii* ble deretter overført til O2-medium, eventuelt tilsatt cyanobakterier, slik at konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble  $1 \cdot 10^5$  cfu/ml. Forsøket ble utført i enten lys eller mørke med 3 paralleller for hver tilsatte cyanobakteriestamme. I tillegg ble det utført en negativ og positiv kontroll, med

dyrking av henholdsvis 3 paralleller med *L. bozemanii* på O2-medium og 3 paralleller med *L. bozemanii* på ACES-medium. Kulturene ble dyrket på Erlenmeyerkolber på ristebord.

Med unntak av pilotprosjektene, der kulturene ble dyrket ved 20 °C, ble forsøkene utført ved 25 °C.

Antall *L. bozemanii* ble beregnet ved hjelp av utsåing og telling av kolonier på BCYE-skåler, og oppgitt i cfu (colony forming units), og konsentrasjonen i cfu/ml. Fordi vekst av *L. bozemanii* varierte med temperatur og belysning, ble prøver tatt med 3 til 7 dagers mellomrom. For å kunne sammenligne dyrkbarheten av *L. bozemanii* i de ulike forsøkene ble prosentvis dyrkbarhet av *L. bozemanii* beregnet ut fra utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe.

Dyrking ved 20 °C foregikk i et temperaturregulert rom med stabil temperatur, og lyssetting for cyanobakterier. Dyrking ved 25 °C ble gjort i laboratoriet med variasjon i temperatur fra 23 til 27 °C, og vanlig belysning målt på henholdsvis dag og kveldstid til 8,2 og 11,9  $\mu$  Einstein  $m^{-2} s^{-1}$ .

De benyttede cyanobakteriestammene ble valgt fordi det i norske innsjøer er registrert oppblomstringer av cyanobakterieslektene *Anabaena*, *Microcystis* og *Planktothrix*, som beskrevet på s. 14. For hver slekt ble det valgt ut en art isolert fra norske innsjøer, der NIVA sin kultursamling inneholdt mikrocyistinproduserende og ikke-mikrocyistinproduserende stammer, se oversikt under pkt. 2.1.2 (s. 17). Det kunne dermed være mulig å avdekke en eventuell påvirkning fra mikrocyistin.

Ved oppstart av forsøket utgjorde de levende cyanobakteriene et biovolum på  $1,1 \cdot 10^8 \pm 0,3$  fl, per ml av kulturen. Dette ble målt på Casy celledetektor. For kulturer dyrket i lyset, ble biovolumet også målt ved avslutning av forsøket siden cyanobakteriene var forventet å vokse.

---

Ekstrakter av døde cyanobakterier ble laget ved frysetørking ved  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .. På grunn av liten eller ingen vekst i noen av cyanobakteriekulturene, ble det ikke laget ekstrakter av alle de samme stammene som ble testet i forsøket med levende celler. Det ble benyttet ekstrakt av *M. aeruginosa* fra Pasteurinstituttet sin kultursamling, i stedet for *M. aeruginosa* isolert fra Norge, se oversikt under pkt. 2.1.2 (s. 17 og 18). *Anabaena* utgikk, men ekstrakter av *P. agardhii* ble benyttet som planlagt. På samme måte som for de levende kulturene med cyanobakterier ble det utført separate forsøk med ekstraktene fra mikrocytinproduserende stammer og ikke-mikrocytinproduserende stammer. Ved oppstart av forsøk ble hver av ekstraktene oppslemmet i O<sub>2</sub>-medium til konsentrasjonen var lik 0,1 mg/ml. Deretter ble forsøket med ekstrakter utført på tilsvarende måte som forsøk med levende cyanobakterier.

Telling av kolonier på skåler med *L. bozemanii* viste at cellene som var dyrket i mørket hadde en høyere dyrkbarhet enn de som var dyrket i lyset. For å få et inntrykk av hvorvidt dette skyldes bakteriedød, eller endret evne til vekst på BCYE-plater, ble prøver av *L. bozemanii* farget og deretter undersøkt i mikroskop. Prøvene ble farget med LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy, slik at levende celler med hel cellemembran farges grønne mens døde celler med skadet membran farges røde. Det ble kun gjort en enkel visuell sammenligning av bakterier i synsfeltet.

Det ble vurdert å benytte OD-måling for å måle endringer i konsentrasjonen av *L. bozemanii*. Dette ble imidlertid forkastet fordi OD-målingen ble forstyrret både av pigmenter som *L. bozemanii* skilte ut og av pigmenter i cyanobakteriene. Dette begrenset hvilke bølgelengder som kunne benyttes.



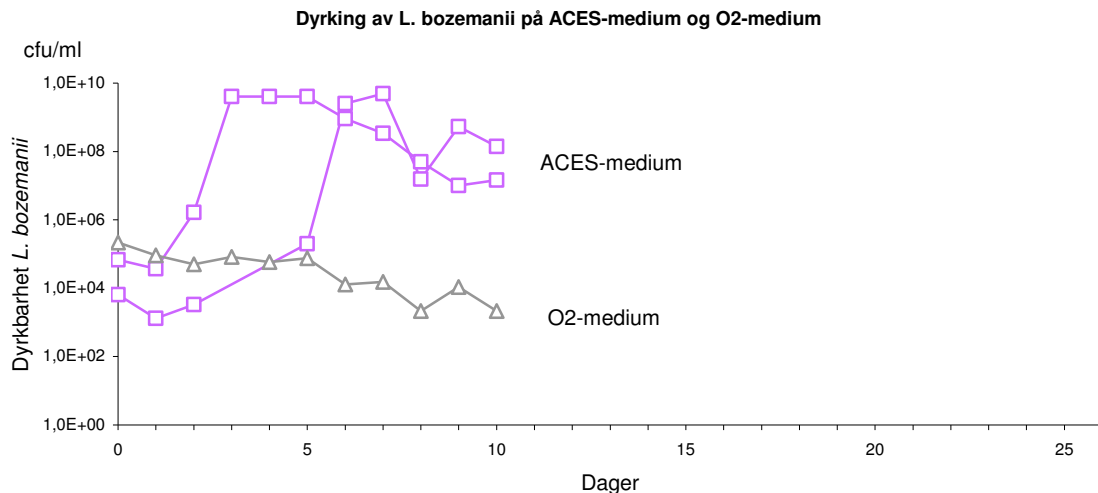
---

### 3. Resultater

Ingen av forsøkene resulterte i vekst av *L. bozemanii*. Forsøkene ble utført på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium med og uten tilsetning av levende eller døde cyanobakterier, i lys eller mørke, ved 20 eller 25 °C. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* i kulturene ble bestemt ved telling av kolonier fra utsådde prøver og oppgitt i cfu/ml. Bare kolonidannende celler ble regnet med.

Positiv kontroll av veksten til *L. bozemanii* ved 25 °C ble gjennomført ved dyrking på ACES-medium. Av totalt 12 kolber med *L. bozemanii* på ACES-medium, ble det påvist vekst av *L. bozemanii* i 5 kolber. I tillegg ble det påvist forurensende vekst i 3 kolber. I de resterende 4 kolbene ble det overhode ikke påvist vekst, verken på blodagar eller BCYE-skåler. Det er ikke kjent noen forsøk der *L. bozemanii* har vært dyrket ved 25 °C, slik at det ikke er noe forsøk å sammenligne med for å avdekke om organismen normalt opptrer på denne måten.

*L. bozemanii* ble også dyrket under optimaliserte forhold. Det vil si at cellene vokste på næringsrikt ACES-medium, i mørke og inkubert ved 34,5 eller 37 °C. Under disse vekstforholdene vokste *L. bozemanii* i alle forsøk. Figur 3.1 (s. 26) viser veksten for *L. bozemanii* dyrket under optimaliserte forhold sammenlignet med utviklingen på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium, der det foregår det en langsom reduksjon i dyrkbarhet. På det tidspunktet forsøket ble utført var det ikke tilgjengelige BCYE-skåler til å utføre forsøket med mer enn 2 paralleller. Selv om det ikke ble laget flere vekstkurver for optimalisert vekst av *L. bozemanii*, ble organismen gjentatte ganger dyrket under optimale betingelser for å skaffe ferske kulturer ved oppstart av nye forsøk. Det ble ikke laget vekstkurver for dette, men prøver ble sådd ut på skål for å beregne konsentrasjonen av celler. Under disse forholdene vokste *L. bozemanii* til utbyttet var på minst 10<sup>7</sup> cfu/ml.



**Fig. 3.1.** Konsentrasjonen av *Legionella bozemanii* i cfu/ml dyrket på næringsrikt ACES-medium og næringsfattig O2-medium ved 34,5 °C i mørket. —□— *L. bozemanii* på ACES-medium, —△— *L. bozemanii* på O2-medium. Veksten av celler på ACES-mediet til en konsentrasjon på omkring  $10^9$ , viste at *L. bozemanii* var i stand til å vokse under optimaliserte forhold.

### 3.1.1 Problemer for gjennomføringen av prosjektet

I startfasen av prosjektet ble det gjennomført to forsøk der *L. bozemanii* ble inkubert ved 20 °C. I disse forsøkene viste det seg for det første at *L. bozemanii* ikke økte i antall. Det vil si at den ikke vokste og delte seg. For det andre viste det seg at organismen var påvirket av lys, ved at konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble redusert raskere ved dyrking i lys enn i mørke. Vekstkurvene fra forsøkene er vedlagt oppgaven, se vedlegg 5 og 6. Den oppgitte veksttemperaturen for vekst av *Legionella* er mellom 25 °C og 42 °C (Fields, 2007), og dyrkningsforsøkene ble derfor utført ved vanlig romtemperatur for å være innenfor dette temperaturområdet. Men heller ikke ved denne temperaturen var det vekst av *L. bozemanii* på O2-mediet tilsatt cyanobakterier. Av den grunn ble det i stedet undersøkt om dyrkbarheten til *L. bozemanii* endret seg ved tilsetning av cyanobakterier.

Prosjektet ble planlagt med utgangspunkt i Tison sitt forsøk (Tison *et al.*, 1980), der *L. pneumophila* hadde en doblingstid på 2,7 timer. Undersøkelser av dyrkbarhet tar imidlertid mye lenger tid. For forsøk i mørket tok det opp mot 14 dager før det var

---

signifikant større konsentrasjon av *L. bozemanii* på O2-mediet tilsatt cyanobakterier sammenlignet med dyrking på O2-mediet uten tilsetninger.

Det mest påfallende resultatet viste seg å være ulik dyrkbarhet i lys og mørke.

Separate undersøkelser for å kunne sammenligne dyrkbarheten ved disse to betingelsene, var mer arbeidskrevende enn det ville vært å undersøke vekst ved en betingelse.

Da nye problemer dukket opp førte famlingen i startfasen av prosjektet til tidspress. Kulturene med *A. lemmermannii* og *M. aeruginosa* fra norske innsjøer døde ut, og det var da ikke tid til å vente på at nye kulturer skulle vokse opp slik at forsøkene kunne gjentas.

Når forsøkene med tilsetning av ekstrakter skulle gjentas, var det forurensning både på O2-mediet som skulle fungert som negativ kontroll og i de oppslammede prøvene. Årsaken var at kulturen med *L. bozemanii* i dette tilfellet var forurenset. Det var ikke tilgjengelige ekstrakter til å utføre forsøket på nytt, og ikke tid til å dyrke nye kulturer som det kunne lages ekstrakter fra.

De ubekreftede resultatene av første gjennomføring av forsøk er presentert som vedlegg til oppgaven, se vedlegg 1 til 4. På denne måten kan de bekreftes ved nye undersøkelser. Utover dette har resultatene relativt liten verdi. Ingen av de ubekreftede resultatene strider imidlertid mot konklusjonene i oppgaven.

Resultatene baserer seg på dyrking av *L. bozemanii* på O2-medium med og uten tilsetning av to ulike stammer *Planktothrix agardhii*.

### **3.1.2 Dyrkbarheten til *L. bozemanii***

Antall celler av *L. bozemanii* ble bestemt ved å telle kolonier på skåler, og følgelig ble bare kolonidannende enheter (cfu) regnet med. For hver måling er konsentrasjonen av kolonidannende enheter i prøven beregnet (cfu/ml).

De tilsatte cyanobakteriene førte til relativt liten endring i konsentrasjonen av *L. bozemanii* sammenlignet med dyrking på O<sub>2</sub>-medium uten tilsetning. Hvis konsentrasjonen av prøven skulle blitt benyttet som sammenlignende enhet, ville små ulikheter i utgangskonsentrasjonen ført til skjevheter i sammenligningen. Det var mer hensiktsmessig å sammenligne utbyttet av forsøkene. Utbyttet ble beregnet som forholdet mellom konsentrasjonen av en prøve og utgangskonsentrasjonen for kolben, som vist i ligningen:

$$\text{Utbytte} = \frac{\text{prøvekonsentrasjon} \quad [\text{cfu} / \text{ml}]}{\text{utgangskonsentrasjon} \quad [\text{cfu} / \text{ml}]} 100\%$$

Det ble ikke tatt hensyn til endringer av volumet til kulturen som følge av prøvetaking og fordampning, slik at volumet ble ansett som konstant.

En sammenfatning gis ved å sammenligne utbytte fra ulike dyrkningsforhold. I denne sammenhengen er begrepet dyrkbarhet benyttet. Begrepet **dyrkbarhet** er innført for å fremheve at forsøkene er utført som dyrkingsforsøk der bare kolonidannende enheter er medregnet. Forholdene som gir høyest utbytte, blir beskrevet som om de øker dyrkbarheten til *L. bozemanii*. Ingen av forsøkene resulterte i vekst av *L. bozemanii*. **Økt dyrkbarhet** er benyttet som betegnelse på langsommere reduksjon av konsentrasjonen til *L. bozemanii* sammenligning med andre forsøk og innebærer således ikke vekst av organismen.

Det ble i innledningen nevnt at *L. pneumophila* kan gå inn i en innaktiv tilstand uten evne til å danne kolonier ved utsåing på BCYE-skåler, men at cellene deretter kan reaktiveres av *Acanthamoeba castellanii* (s. 9 nederst). Det har derfor blitt sett på som spesielt viktig å skille mellom begrepene dyrkbarhet og overlevelse i denne oppgaven.

### 3.2 Virkning av lys på dyrkbarheten til *L. bozemanii*

*L. bozemanii* viste seg å være en organisme som ble påvirket av lys når den ble dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium. Organismen var påvirket av lys selv når fotosyntetiske



---

cyanobakterier ikke var tilsatt O<sub>2</sub>-mediet. Dette er illustrert i figur 3.2 (s.30).

Verdiene i figuren er hentet fra forsøk 1, mens forsøk 2 hadde omtrent tilsvarende verdier. Kort oppsummert kan forsøkene beskrives på følgende måte:

Utgangskonsentrasjon av *L. bozemanii* var omkring 10<sup>5</sup> cfu/ml. Ved dyrking i mørket ble konsentrasjonen redusert til omkring 10<sup>4</sup>cfu/ml i løpet av 3 til 5 dager.

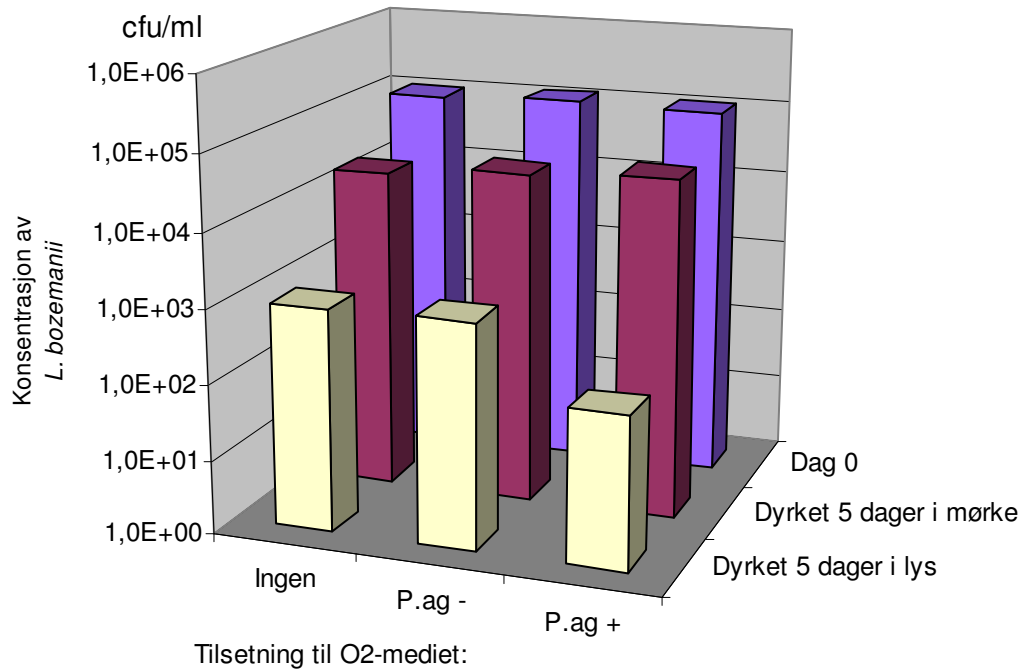
Tilsvarende periode i lys, reduserte konsentrasjonen til omkring 10<sup>3</sup> cfu/ml. Tabell 3.1 (s.31) viser konsentrasjonen av *L. bozemanii* samt den prosentvise nedgangen i dyrkbarhet for både forsøk 1 og 2.

For å undersøke om forskjellen mellom resultatene fra lys og mørke var signifikante, ble "Student's T-test" utført. Hypotesen (H<sub>0</sub>) som ble testet var at det ikke var forskjellig dyrkbarhet i lys eller mørke. Testen ble utført ved å sammenligne dyrkbarheten til *L. bozemanii* på O<sub>2</sub>-medium etter 3 til 5 dagers dyrking i lys eller mørke. Den alternative hypotesen (H<sub>A</sub>) var at dyrkbarheten for *L. bozemanii* var redusert ved dyrking i lys sammenlignet med dyrking i mørket. For alle forsøkene var dyrkbarheten signifikant mer redusert i lys enn i mørke ( $P \leq 0,100$ ), og P-verdiene for de enkelte forsøkene er vist i tabell 3.1 (s. 31).

Det ble ikke funnet tilsvarende sammenheng mellom dyrkbarhet og belysning når *L. bozemanii* ble dyrket på næringsrikt ACES-medium. Det var imidlertid vekst av *L. bozemanii* i 4 av parallellene i mørke og i en av parallellene i lys så også her var det på sett og vis best dyrkbarhet i mørket.

Hvorvidt redusert dyrkbarhet på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium skyldes at *L. bozemanii* døde ble ikke bestemt, men det ble foretatt en sammenligning av 4 prøver i mikroskop. Cellene ble farget slik at levende organismer med hel cellemembran fremstod som grønne, mens døde organismer med skadet membran fremstod som røde. En visuell sammenligning av organismer i synsfeltet, gav inntrykk av at det var like mange levende og døde celler, uavhengig av om organismene var dyrket i lys eller mørke. Men dette er ikke tilstrekkelig undersøkt. Det er undersøkt for få prøver, og undersøkelsen er ikke tilstrekkelig til å si om organismen fortsatt er i live.

### *Legionella bozemanii* dyrket på O2-medium



**Fig 3.2** Figuren er en grafisk fremstilling av lysets virkning på dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* på næringsfattig O2 medium. Forsøkene ble utført ved 25 °C med og uten tilsetning av cyanobakterien *Planktothrix agardhii*. Det ble benyttet *P. agardhii* NIVA CYA 116 (P. ag -) som ikke produserer mikrocytin, samt den mikrocytinproduserende stammen *P. agardhii* NIVA CYA 34 (P. ag +). ■ Bakre søyler representerer utgangskonsentrasjonen, ■ Midtre søyler representerer konsentrasjonen etter 5 dagers dyrking i mørket, ■ Fremre søyler representerer konsentrasjonen etter 5 dagers dyrking i lys.

		Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O2- mediet:	Konsentrasjonen av <i>L. bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant
				Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
Forsøk 1	Lys	5	Ingen	1,1E+05	1,0E+03	0,89 %		
	Mørke	5	Ingen	8,9E+04	2,1E+04	23,41 %	P = 0,004	Ja
	Lys	5	<i>P. ag -</i>	1,2E+05	1,0E+03	0,85 %		
	Mørke	5	<i>P. ag -</i>	1,1E+05	2,9E+04	26,14 %	P = 0,1*	Ja
	Lys	5	<i>P. ag +</i>	1,1E+05	1,1E+02	0,11 %		
	Mørke	5	<i>P. ag +</i>	1,0E+05	3,5E+04	34,94 %	P = 0,1*	Ja
Forsøk 2	Lys	3	Ingen	2,1E+05	2,2E+03	1,04 %		
	Mørke	4	Ingen	2,1E+05	1,4E+05	66,98 %	P = 0,002	Ja
	Lys	4	<i>P. ag -</i>	2,7E+05	5,3E+03	1,99 %		
	Mørke	4	<i>P. ag -</i>	2,7E+05	1,1E+05	42,95 %	P ≤ 0,001	Ja
	Lys	4	<i>P. ag +</i>	2,0E+05	1,5E+03	0,74 %		
	Mørke	4	<i>P. ag +</i>	2,0E+05	1,4E+05	69,20 %	P = 0,002	Ja

**Tab 3.11** Lysets virkning på dyrkbarheten til *Legionella bozemanii*. *L. bozemanii* ble dyrket på O2-medium med og uten tilsetning av *Planktothrix agardhii*. Forsøket ble utført ved 25 °C. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble bestemt ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) –agarskåler. Utbyttet ble beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. T-testen ble utført ved å sammenligne utbyttet etter 3 til 5 dagers dyrking i lys eller mørke. Hypotesen (H<sub>0</sub>) var at det lyset ikke påvirket dyrkbarheten til *L. bozemanii*. Den alternative hypotesen (H<sub>A</sub>) var at dyrkbarheten var lavere i lys enn i mørke. Det er ulike prøvedager for lys og mørke i ett tilfelle, Forsøk 2 uten tilsetninger til O2-mediet. Dette fører til at verdiene som sammenlignes er likere hverandre enn de ellers ville hvert, men dette har ikke avgjørende betydning. Utbyttet var signifikant lavere i alle forsøkene utført i lys sammenlignet med tilsvarende forsøk i mørke. Målingene ble utført ved kolonitelling på BCYE-skåler, og bare kolonidannende enheter er medregnet i konsentrasjonen.

### 3.3 Virkning av tilsatte cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii*

I næringsfattige omgivelser viste lys seg å være av større betydning for dyrkbarheten til *L. bozemanii*, enn tilsetning av cyanobakterier. For å kunne avgjøre betydningen av å tilsette cyanobakterier, ble forsøkene bare sammenlignet med andre forsøk utført under samme lysforhold.

#### 3.3.1 Virkning av tilsatte cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket i lys

*L. bozemanii* ble dyrket i lys ved 25 °C på O2-medium med og uten tilsetning av *P. agardhii*. Utgangskonsentrasjonen av *L. bozemanii* var omkring  $1 \cdot 10^5$  cfu/ml, etter 5 dagers dyrking var utbyttet omkring  $1 \cdot 10^3$  cfu/ml. Resultatene er grafisk fremstilt i figur 3.3.

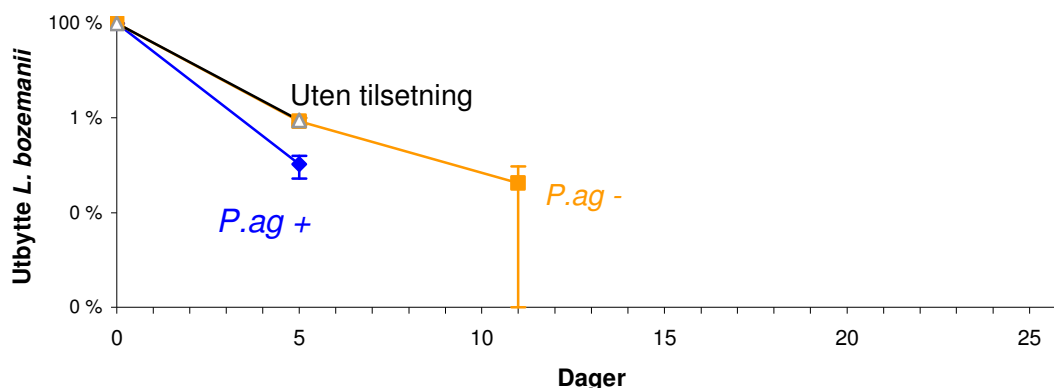
Tilsetningen av den mikrocystinproduserende *P. agardhii* NIVA CYA 34 til O2-mediet reduserte dyrkbarheten til *L. bozemanii* i første forsøk, men viste seg å være uten betydning for dyrkbarheten ved gjentakelse av forsøket. I begge forsøkene var det tilstrekkelig med forurensende bakterier på BCYE-skålene til at antallet *L. bozemanii* på skålen sannsynligvis ble lavere enn det ville vært uten forurensninger.

Tilsetning av den ikke mikrocystinproduserende *P. agardhii* NIVA CYA 116 viste i flere forsøk at tilsetningen ikke hadde signifikant påvirkning av dyrkbarheten av *L. bozemanii* ved dyrking i lys.

Positiv kontroll av *L. bozemanii* på ACES-medium ved dyrking i lys viste bare vekst av *L. bozemanii* i 1 av totalt 6 kolber.

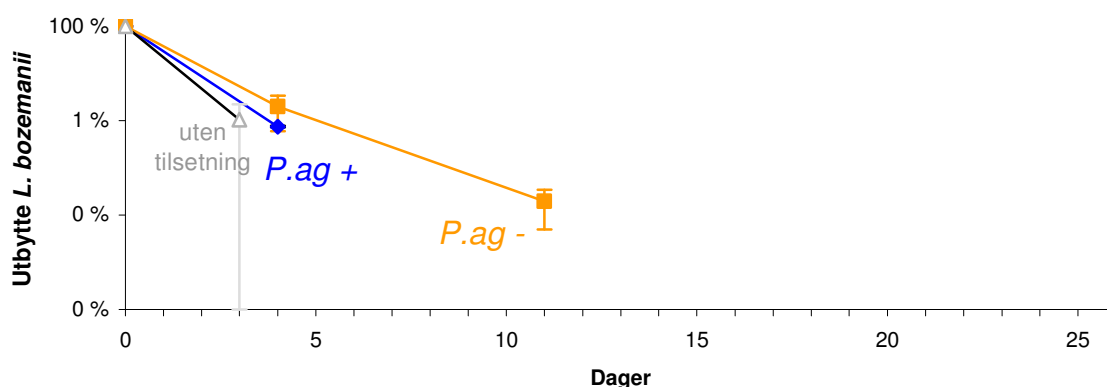
Ut fra disse resultatene kan det ikke avgjøres om *P. agardhii* hadde betydning for dyrkbarheten til *L. bozemanii*.

Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* på O2-medium tilsatt levende *Planktothrix agardhii*, dyrket i lys



**Fig 3.3a** Dyrkbarheten av *L. bozemanii* i lys ved 25 °C på O2-medium med og uten tilsetning av cyanobakterien *P. agardhii*: —□— uten tilsetning av cyanobakterier, —◆— tilsetning av *P. agardhii* NIVA CYA 34 (*P.ag +*) som kan produsere mikrocystin, —■— tilsetning av *P.agardhii* NIVA CYA 116 (*P.ag -*) som ikke produserer mikrocystin. Utgangskonsentrasjonen av *L. bozemanii* var omkring  $10^5$  cfu/ml og utbyttet var omkring  $10^3$  cfu/ml etter 5 dagers dyrking. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble beregnet ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) –agarskåler. Utbyttet ble beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer. Skålene med prøver av *L. bozemanii* dyrket på O2-medium tilsatt *P. ag +*, hadde rik vekst av forurensende bakterier. Positiv kontroll på ACES-medium viste bare vekst av *L. bozemanii* i 1 av 3 paralleller.

Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* på O2-medium tilsatt levende *Planktothrix agardhii*, dyrket i lys, gjentatt forsøk



**Fig 3.3b** En gjentakelse av forsøket i fig a. I dette forsøket var det ikke vekst av *L. bozemanii* i positiv kontroll.

**Fig 3.3 a og b:** Resultatene i de to gjentatte forsøkene viste ikke det samme, og det kan ikke avgjøres om dyrkbarheten til *L. bozemanii* på O2 medium påvirkes ved tilsetning av *P. agardhii*.

### 3.3.2 Virkning av tilsatte cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket i mørke

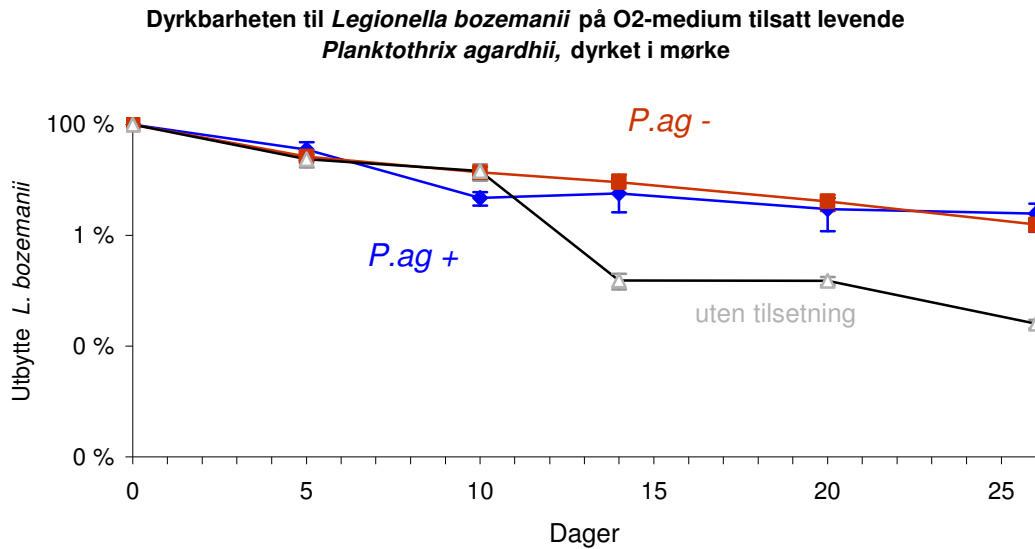
*L. bozemanii* ble dyrket i mørke ved 25 °C på O2-medium med og uten tilsetning av *P. agardhii*. Utgangskonsentrasjonen av *L. bozemanii* var omkring  $1 \cdot 10^5$  cfu/ml. Utbyttet etter 20 dagers dyrking på O2-medium tilsatt *P. agardhii*, var omkring  $1 \cdot 10^3$  cfu/ml. Samtidig var utbyttet på O2-mediet uten tilsetning redusert til  $10^2$  cfu/ml.

Resultatene er fremstilt i figur 3.4 (s. 35). Det fremgår av figuren at utbyttet på O2-mediet tilsatt cyanobakterier var høyere enn på O2-mediet uten slik tilsetning.

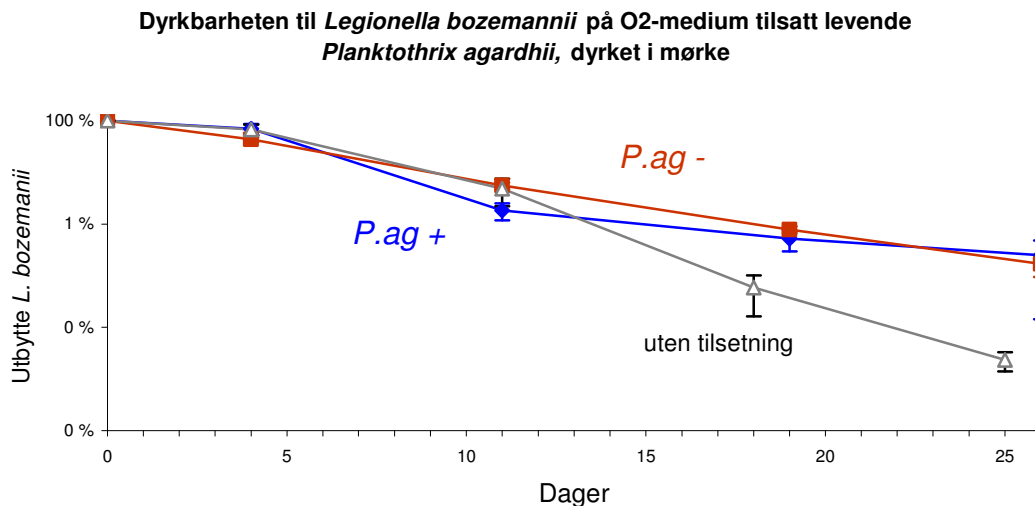
For å avgjøre hvorvidt tilsetningen av cyanobakterier var av signifikant betydning for verdien av utbyttet, ble "Student's T-test" utført i Sigmaplot 11.0. Hypotesen ( $H_0$ ) som ble testet var at tilsetning av cyanobakterier var uten virkning på dyrkbarheten til *L. bozemanii*. Den alternative hypotesen ( $H_A$ ) har vært at tilsetning har ført til endret dyrkbarhet. Verdiene som ble sammenlignet kom som hovedregel fra prøver som var tatt samtidig, men i noen få tilfeller er det sammenlignet verdier fra prøver som var tatt 2 påfølgende dager. I disse tilfellene ble prøver med antatt lavest utbytte, tatt dagen før andre prøver. Dette førte til at verdiene som ble sammenlignet ble noe likere hverandre enn de ellers ville vært.

Tabell 3.2 (s. 36-37) viser verdiene for de enkelte prøvene. Resultater med  $P > 0,1$  er oppgitt som ingen signifikant endring i dyrkbarhet, i motsatt fall er P-verdien oppgitt. I hovedsak viste det seg at tilsetning av *P. agardhii* gav signifikant høyere utbytte dag 14 til 20.

Skålene med prøver av *L. bozemanii* dyrket på O2-medium tilsatt *P. agardhii* NIVA CYA 34, hadde tilstrekkelig vekst av forurensende bakterier på skålene til at dette kan ha påvirket resultatet.



**Fig 3.4a** Dyrkbarheten til *L. bozemanii* ved 25 °C i mørket, dyrket på O2 medium med og uten tilsetning av cyanobakterien *P. agardhii*:  $\triangle$  uten tilsetning av cyanobakterier,  $\blacklozenge$  tilsetning av *P. agardhii* NIVA CYA 34 (*P.ag +*) som kan produsere mikrocyстин,  $\blacksquare$  tilsetning av *P. agardhii* NIVA CYA 116 (*P.ag -*) som ikke produserer mikrocyстин. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer. Positiv kontroll av *L. bozemanii* på ACES-medium viste vekst for bare 1 av 3 paralleller. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble bestemt ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) – agarskåler. Utbyttet ble beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. Tilsetning av *P. ag +* førte til vekst av forurensende bakterier på skålene, og dette kan ha påvirket resultatet.



**3.4b** En gjentagelse av forsøket i fig a. Den positive kontrollen på ACES-medium hadde vekst i alle 3 paralleller.

**Fig 3.4a og b:** Resultatene i de to gjentatte forsøkene viste at utbyttet av *L. bozemanii* på O2-medium var høyere med tilsetning av levende *P. agardhii*.

	Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O <sub>2</sub> - mediet:	Konsentrasjonen av <i>L. bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant påvirkning?
			Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
Forsøk 1	5	Ingen	8,9E+04	2,1E+04	23,30 %		
	5	<i>P. ag +</i>	1,0E+05	3,5E+04	34,10 %	P = 0,238	Nei
	5	<i>P. ag -</i>	1,1E+05	2,9E+04	26,19 %	P = 0,543	Nei
	10	Ingen	8,9E+04	1,3E+04	14,2 %		
	10	<i>P. ag +</i>	1,0E+05	5,0E+03	4,8 %	P = 0,026	Signifikant dårligere
	10	<i>P. ag -</i>	1,1E+05	1,5E+04	13,6 %	P = 0,839	Nei
Forsøk 2	4	Ingen	2,1E+05	1,4E+05	67,0 %		
	4	<i>P. ag +</i>	2,0E+05	1,4E+05	69,2 %	P = 0,874	Nei
	4	<i>P. ag -</i>	2,7E+05	1,1E+05	42,9 %	P = 0,061	Nei
	11	Ingen	2,1E+05	1,0E+04	4,8 %		
	11	<i>P. ag +</i>	2,0E+05	3,6E+03	1,8 %	P = 0,129	Nei
	11	<i>P. ag -</i>	2,7E+05	1,5E+04	5,5 %	P = 0,680	Nei

**Tab 3.2a** Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* ved 25 °C i mørket de første 11 dagene forsøket pågikk (de neste dagene er vist i tabell b). *L. bozemanii* ble dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium. Dyrkningsmediet ble tilsatt to ulike stammer av cyanobakterien *Planktothrix agardhii*. *P. agardhii* NIVA CYA 34 (*P. ag +*) produserer mikrocystin. *P. agardhii* NIVA CYA 116 (*P. ag -*) produserer ikke mikrocystin. Hypotesen (H<sub>0</sub>) som ble testet var at tilsetning av cyanobakterier ikke endret dyrkbarheten til *L. bozemanii*. Den alternative hypotesen (H<sub>A</sub>) var at tilsetning av cyanobakterier førte til endret dyrkbarhet. Virkningen av cyanobakterier er ansett som ikke signifikant for P ≥ 0,1. Tabellen viser at tilsetning av cyanobakterier hadde liten virkning på dyrkbarheten til *L. bozemanii* frem til dag 11. Tilsetning av *P. ag +* medførte vekst av forurensende bakterier på skålene, og dette kan ha påvirket resultatet.\* Testet med Mann-Whitney Rank Sum test og ikke T-test på grunn av høy varians.



	Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O2- mediet:	Konsentrasjoenen av <i>Legionella bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant påvirkning?
			Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
Forsøk 1	14	Ingen	8,9E+04	1,4E+02	0,2 %		
	14	<i>P. ag +</i>	1,0E+05	6,0E+03	5,8 %	P = 0,036	Ja
	14	<i>P. ag -</i>	1,1E+05	9,8E+03	9,0 %	P = 0,01	Ja
	20	Ingen	8,9E+04	1,3E+02	0,1 %		
	20	<i>P. ag +</i>	1,0E+05	3,2E+03	3,1 %	P = 0,051	Ja
	20	<i>P. ag -</i>	1,1E+05	4,4E+03	4,1 %	P = 0,007	Ja
	26	Ingen	8,9E+04	2,2E+01	0,03 %		
	26	<i>P. ag +</i>	1,0E+05	2,5E+03	2,4 %	P = 0,031	Ja
	26	<i>P. ag -</i>	1,1E+05	1,7E+03	1,6 %	P = 0,003	Ja
Forsøk 2	18	Ingen	2,1E+05	1,2E+02	0,1 %		
	19	<i>P. ag +</i>	2,0E+05	1,0E+03	0,5 %	P = 0,100 <sup>*</sup>	Ja
	19	<i>P. ag -</i>	2,7E+05	2,1E+03	0,8 %	P ≤ 0,001	Ja
	25	Ingen	2,1E+05	5,0E+00	0,0 %		
	26	<i>P. ag +</i>	2,0E+05	4,9E+02	0,2 %	P = 0,143	Ikke signifikant
	26	<i>P. ag -</i>	2,7E+05	4,5E+02	0,2 %	P = 0,100 <sup>*</sup>	Ja

**Tab 3.2b.** Dette er en fortsettelse av tabell a og viser siste halvdel av forsøkene, dvs dag 14 til 26. T-testen er i noen tilfeller utført ved sammenligning av prøver fra 2 påfølgende dager. Dette fører til at verdiene som sammenlignes er likere hverandre enn de ellers ville hvert. Virkningen fra cyanobakterier er oppgitt som ikke signifikant for  $P \geq 0,1$ . Etter tilsetning av levende cyanobakterier, ble dyrkbarheten til *L. bozemanii* signifikant høyere enn uten slik tilsetning for dag 14 til 20. \* Testet med Mann-Whitney Rank Sum test og ikke T-test på grunn av høy varians.



---

## 4. Diskusjon

### 4.1 Drøfting av metode

#### 4.1.1 Positiv kontroll av evne til vekst for *L. bozemanii*.

For i størst mulig grad å etterligne lokale forhold, ble forsøkene utført ved 25 °C som er regnet som den nedre temperaturgrensen for vekst av *Legionella*. Det viste seg imidlertid at veksten av organismen var varierende ved denne temperaturen. Dette ble avdekket når organismen ble dyrket på næringsrikt ACES-medium ved 25 °C, som positiv kontroll.

Ved 37 °C vokste imidlertid organismen som forventet til et utbytte på minimum 10<sup>7</sup> cfu/ml. Vanskelighetene oppstod når cellen ble dyrket ved 25 °C. Da viste den positive kontrollen vekst i bare halvparten av kolbene. Andre vekstforsøk utført med *L. pneumophila* ved 25 °C, er publisert uten at dette problemet er nevnt (Soderberg *et al.*, 2004). For *L. bozemanii* finnes det imidlertid ikke dokumentert vekstforsøk ved 25 °C. Varierende vekst av organismen på ACES-medium ved 25 °C, kan muligens skyldes at arten oppfører seg annerledes enn *L. pneumophila*.

Før lignende forsøk kan igangsettes ved 25 °C, vil det være avgjørende og viktig å finne frem til en bakteriestamme med stabil vekst ved denne temperaturen. I vårt tilfelle gjorde tidsbegrensning at forsøkene ble gjennomført med den tilgjengelige stammen.

Vekst av *L. pneumophila* ved 25 °C var i det tidligere nevnte forsøket til Söderberg beregnet ut fra OD-målinger (Soderberg *et al.*, 2004), og evnen til kolonidannelse ble ikke bestemt. Dersom forsøket med *L. bozemanii* også hadde omfattet OD-måling, ville det vært enkelt å sammenligne veksten i de to artene. Så lenge *L. bozemanii* dyrkes på ACES-medium og ikke sammen med cyanobakterier er dette en enkel

måling å gjøre. Det kan derfor være hensiktsmessig å utføre slike målinger hvis forsøket gjentas

#### **4.1.2 Forurensing ved dyrking på ACES-medium**

Når organismen ble dyrket på ACES-medium, måtte enkelte kolber forkastes på grunn av forurensning. Prøvetaking fra alle kolbene i forsøket ble utført på laboratoriebank og ikke i avtrekkskap. Dette ble gjort av praktiske hensyn. Hvis et lignende arbeid skal iverksettes, vil det være å anbefale at arbeidet planlegges slik at i alle fall prøver fra kulturene med ACES-medium tas i avtrekkskap.

#### **4.1.3 Bestemmelse av dyrkbarheten til *L. bozemanii***

Det ble gjort forsøk for å bestemme veksten av *L. bozemanii* ved OD-målinger. Et problem i den forbindelse var imidlertid at både cyanobakteriene og pigmenter fra *L. bozemanii* påvirket målingen. Å bestemme vekst ved hjelp av OD var derfor ikke mulig.

Dyrkbarheten av *L. bozemanii* ble målt ved utsåing av prøver på BCYE-skåler. Når vekst blir målt ved metoder uten utsåing, som for eksempel RT-PCR, er utbyttet som påvises høyere enn ved dyrking av kolonier på BCYE-skåler. Dette skyldes både at måleverdien generelt er høyere for metoder som er uavhengige av dyrking, og at det er hemmende vekst av andre bakterier på skålene, samt at *Legionella* kan gå inn i en inaktiv tilstand (Hussong *et al.*, 1987; Wellinghausen *et al.*, 2001). For *L. pneumophila* er det vist at dyrkbarhet i næringsfattig miljø og overgang til en inaktiv tilstand blant annet har en sammenheng med innholdet av reservestoff (James *et al.*, 1999). I tillegg er det vist av *L. pneumophila* kan reaktiveres fra inaktiv tilstand ved hjelp av *Acanthamoeba castellanii* (Steinert *et al.*, 1997). Det kan derfor synes som det ved omtale av *Legionella* er spesielt viktigere å skille mellom begrepene dyrkbarhet, konsentrasjon og overlevelse. Metoden var ikke egnet til å bestemme overlevelse, og derfor ble bare dyrkbarheten til organismen bestemt.

---

Utsåing av prøver for å bestemme dyrkbarhet var tidkrevende. I utgangspunktet ble *L. bozemanii* dyrket i 24 ulike kolber i forbindelse med hvert forsøk. Forsøkene måtte senere gjentas. For hver kolbe ble det på prøvedagene som hovedregel tatt bare en prøve. Prøven ble deretter fortynnet etter behov. Sett i sammenheng med at cellene kan gå inn i tilstander som ikke danner kolonier på BCYE-skål, kan det være grunn til å vurdere andre metoder som supplement eller i stedet for utsåing.

#### 4.1.4 Påvirkning av heterotrofe bakterier.

Cyanobakteriene som ble benyttet i arbeidet var ikke renkulturer. Av den grunn ble det oppvekst av en del heterotrofe bakterier på skålene med det næringsrike BCYE-mediet. Dette kan ha hatt noe innvirkning på resultatet. Hvis forsøket utføres med cyanobakterier som er i renkultur, eller med cyanobakterier der de medfølgende heterotrofe bakteriene ikke vokser som forurensninger på BCYE, kan metoden brukes til å sammenligne virkningen av ulike cyanobakterier. Tidsrammen for oppgaven ga dessverre ikke rom til å finne frem til slike kulturer. Forsøkene som ble utført med vekst på skåler, var derfor bare egnet til å avdekke om ulike vekstforhold førte til endret dyrkbarhet.

Figur 3.4 (s. 35) viser at det var en liten økning i dyrkbarheten til *L. bozemanii* etter tilsetning av cyanobakterier til det næringsfattig mediet. Fordi kulturene med cyanobakterier også inneholdt en rekke heterotrofe bakterier, kunne disse også ha betydning for resultatet uten at dette er undersøkt. Det er tidligere vist et eksempel på at en heterotrof bakterie har stimulert vekst av *L. pneumophila*. Et kjennetegn på *Legionellaceae* er at de ikke vokser på laboratoriemedier uten tilsetning av L-cystein. Det er imidlertid vist at *L. pneumophila* kan vokse på medium uten tilsatt L-cystein i nærvær av *Flavobacterium breve* (Wadowsky *et al.*, 1983). Analyse av 16S rRNA viste at *F. breve* ikke var blant de heterotrofe bakteriene i mine forsøk. Det kan likevel være at andre heterotrofe bakterier har hatt betydning uten at dette har blitt undersøkt. I verste fall kan dette ha narret oss til å anta at cyanobakterier hadde betydning uten at dette er tilfelle ("lurking variable"). Som figur 3.4 (s. 35) viser, var

det imidlertid bare en liten økning i dyrkbarheten til *L. bozemanii* ved tilsetning av cyanobakteriekulturene til det næringsfattige mediet. Fordi den samlede virkningen av både cyanobakterier og heterotrofe bakterier var liten, ble ikke betydningen av heterotrofe bakteriene undersøkt. Slike undersøkelser lot seg heller ikke gjennomføre innenfor rammene for denne oppgaven

## 4.2 Overlevelsen av *L. bozemanii*

Resultatene viste en gradvis reduksjon av dyrkbarhet på næringsfattig medium, se figur 3.3 og 3.4 (s. 33 og 35). Det er tidligere vist at *L. pneumophila* dyrket i næringsfattige omgivelser, kan gå inn i en inaktiv tilstand hvor cellen ikke vokser på BCYE-skåler (Steinert *et al.*, 1997). Dette kan være årsaken til nedgangen i dyrkbarhet. Cellene kan således ha vært levende, men ikke kolonidannende. De utførte undersøkelsene av fargede *L. bozemanii* i mikroskop tyder på dette. Ytterlige undersøkelser i mikroskop eller celledeller ville gitt mer informasjon om organismens tilstand. Undersøkelser med tilsetning av amøben *Acanthamoeba castellanii* til inaktive celler av *L. pneumophila*, har vist at inaktive celler kan reaktiveres (Steinert *et al.*, 1997). Tilsetning av *A. castellanii* kunne vært forsøkt for å undersøke om organismen lot seg reaktivere. Tidsrammen tillot imidlertid ikke bestemmelse av organismens overlevelse.

## 4.3 Drøfting av resultater

### 4.3.1 Ingen vekst av *L. bozemanii*

Det er tidligere vist at *L. pneumophila* kan formere seg ved intracellulær vekst i protozoer (Declerck *et al.*, 2007; Fields, 1996; Rowbotham, 1980). Med bakgrunn i *L. pneumophila* sin tilpasning til protozoer beskrev Fields i 1996 at bakterien i naturen formerte seg så å si utelukkende i protozoer (Fields, 1996). Denne artikkelen tok det for gitt at *L. pneumophila* var avhengig av intracellulær vekst for å formere seg i

---

naturen uten å ta i betraktning resultatene i Tison sin artikkel (Tison *et al.*, 1980). Bøker, artikler og nettressurser har etter dette i all hovedsak betraktet intracellulær formering som det naturlige for *Legionella*, og eksempler på dette er gitt i følgende referanser (Foundation for Water Research, 2001; Hoffman *et al.*, 2007; Isberg *et al.*, 2009; Molmeret *et al.*, 2007; Molmeret *et al.*, 2004)

Forsøkene i mitt arbeid viste ingen vekst av *L. bozemanii* når cyanobakterier ble tilsatt det næringsfattige O<sub>2</sub>-mediet. Det var utelukkende prokaryote celler som ble tilsatt, verken protozoer eller andre eukaryote celler. Undersøkelsene var således bare egnet til å avdekke ekstracellulær vekst av *L. bozemanii*. Med unntak av Tison sitt forsøk med cyanobakterier (Tison *et al.*, 1980), er det ikke rapportert om ekstracellulær vekst av *Legionella* under forhold som minner om det vi kan finne i naturen. Fra laboratorieforsøk er *Legionella* kjent for å ha strenge næringskrav. Organismen vokser i renkultur bare på næringsrike laboratoriemedier (Barker *et al.*, 1986).

Det kan trekkes frem en rekke argumenter for at *Legionella* påvirkes av protozoer: Det er vist at *L. pneumophila* kan reaktiveres fra innaktiv tilstand ved hjelp av *Acanthamoeba castellanii* (Steinert *et al.*, 1997) Ved utbrudd av Legionærsyken er amøber og *Legionella* isolert fra samme infeksjonskilde. Under vanskelige forhold, dvs. høy temperatur, lav pH, høy osmolaritet, UV-bestråling, behandling med biocider eller antibiotika eller ved gjentatt frost og tining, er det vist at protozoer gir beskyttelse til *Legionella* (Borella *et al.*, 2005; Molmeret *et al.*, 2007).

Det er ikke kjente vekstforsøk med dyrking av *Legionella*, cyanobakterier og protozoer i samme kultur: Både *Legionella* og rester av cyanobakterier er imidlertid påvist intracellulært i amøber fra slektene *Acanthamoeba* og *Naegleria*, men ikke samtidig eller i samme forsøk (Fields, 2007; Wright *et al.*, 1981; Xinyao *et al.*, 2006)

Dersom *L. bozemanii* i naturen er avhengig av protozoer for å vokse, forklarer dette den manglende veksten. Tilsetning av protozoer kunne derfor muligens påvirket resultatet.

Hvis *L. bozemanii* er avhengig av protozoer for vekst i naturen, kan det tilsynelatende virke problematisk å forklare resultatene i Tison sitt forsøk (Tison *et al.*, 1980). Forsøket til Tison ble imidlertid utført med andre bakteriearter og ved andre vekstforhold, enn det som ble benyttet i arbeidet med denne oppgaven. Hos Tison ble cyanobakterien *Fisherella* isolert fra samme område som *Legionella pneumophila*. Dette området var oppvarmet av kjølevann fra kjernefysisk industri. Både den termofile *Fisherella* og *L. pneumophila* tåler forholdsvis høye temperaturer. Tison kunne derfor dyrket forsøket ved 45 °C. Således er forsøket med *Fisherella* uegnet for å si noe om forhold som tilsvarer de vi kan finne i norsk natur. Resultatene i denne mastergradsoppgaven er derfor heller ikke egnet til å så tvil om resultatene fra Tison sitt arbeid. Det kan muligens likevel være på sin plass å nevne at forurensning kan ha hatt innvirkning på resultatene til Tison. Bakteriene som han benyttet, var isolert fra et område som hadde vært benyttet til produksjon kjernefysisk våpen og atomkraft i mer enn 30 år (United States Department of energy, 2010a)

#### **4.3.2 Høyere dyrkbarhet av *L. bozemanii* ved tilsetning av cyanobakterier til næringsfattig medium.**

Resultatene fra dyrking i mørket viste at tilsetning av cyanobakterier påvirket dyrkbarhet for *L. bozemanii*, se fig 3.4 (s. 35). Riktignok var veksten upåvirket av cyanobakteriene i den første fasen av forsøket, men etter omkring 14 dager resulterte cyanobakteriene i økt dyrkbarhet for *L. bozemanii*. I næringsfattige omgivelser danner *L. pneumophila* reservestoffet poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, og redusert nivå av dette lipidet henger sammen med redusert dyrkbarhet (James *et al.*, 1999). Ved oppstart av forsøk ble *L. bozemanii* overført direkte fra ACES-mediet til det næringsfattige O2-mediet, uten å bli sultet. Tilgjengelige næringsstoffer fra cyanobakteriene, kan ha ført til redusert forbruk av lagret reservestoff, og dette kan være forklaringen på den registrerte innvirkningen fra cyanobakteriene, vist i fig. 3.4.



---

### 4.3.3 Høyere dyrkbarhet av *L. bozemanii* i mørke

Resultatet viste at lys hadde større betydning enn tilsetning av cyanobakterier, se figur 3.2 (s. 30). Det virket derfor som om påvirkningen fra lyset ikke var en følge av fotosyntesen hos cyanobakteriene, men i stedet virket direkte på organismen.

Allerede i 1906 viste Wheeler at *Salmonella typhi* overlevde lenger i laboratorieforsøk i mørke enn i lyset (Wheeler, 1906). Wheeler utførte sitt forsøk i det han kalte ”diffused daylight”, og bakteriene var ikke utsatt for direkte sollys. Fujioka viste senere at tarmbakterier i sjøvann reduseres av den synlige delen av lyset, men denne effekten avtok når bakteriene ble dyrket i ferskvann (Fujioka *et al.*, 1981). Saltkonsentrasjon i O<sub>2</sub>-mediet var mindre enn 1 %, mot 3,5 % for sjøvann. Undersøkelse av *Escherichia coli* i ferskvann har imidlertid vist at lys reduserte dyrkbarheten (Whitman *et al.*, 2004).

*L. pneumophila* danner legiolysin som beskyttelse mot lys. Dette er et protein som forårsaker at kulturene med *L. bozemanii* blir brune i slutten av stasjonærfasen og som også gjør koloniene fluoriserende (Wintermeyer *et al.*, 1991). Celler med fungerende gen for dette proteinet (Lly<sup>+</sup>) virker tilnærmet upåvirket av lys ved dyrking på et medium kalt GC-FC kraft (Steinert *et al.*, 1995; Wintermeyer *et al.*, 1991). Det er mulig at syntesen av legiolysin kan kreve stoffer som cellen ikke har tilgang til i næringsfattige omgivelser. Som tidligere nevnt er det i næringsfattige omgivelser sammenheng mellom nivået av reservestoff og dyrkbarhet for *L. pneumophila* (James *et al.*, 1999) Det er derfor mulig at beskyttelsen mot lys, medfører forbruk av reservestoff som igjen fører til ulik dyrkbarhet.

## 4.4 Konklusjon

Cyanobakterien *Planktothrix agardhii* hadde ikke virkning på vekst av *L. bozemanii*, men i mørket førte tilsetning av *P. agardhii* til økt dyrkbarhet for *L. bozemanii*, sammenlignet med dyrkbarheten uten denne tilsetningen. Dette er vist i fig 3.4.

En av hensiktene med arbeidet har vært å undersøke hvordan *Legionella* vokser under forhold som gjenspeiler forholdene lokalt i Norge. Den rådende oppfatning er at *Legionella* er avhengig av protozoer for å vokse i naturlige omgivelser. Det er ingenting i resultatene som strider mot dette. Oppgaven har imidlertid ikke omfattet undersøkelse av vekst i eller i nærvær av protozoer. På bakgrunn av undersøkelser fra andre land, er det likevel rimelig å anta at *Legionella* vokser som intracellulær parasitt i protozoer også under norske forhold.

## 4.5 Videre undersøkelser

Det ville være interessant å gjenta noen av forsøkene med tilsatte protozoer. Slike forsøk kan da avdekke hvorvidt oppblomstring av cyanobakterier (vannblomst) påvirker konsentrasjonen av *Legionella* i vannet.

Pågående undersøkelser ved FHI tyder på at roere som trener i norske innsjøer, blant annet Årungen, har et forhøyet nivå av antistoffer mot *Legionella* (Hans Utkilen, muntlig overlevering). FHI tar månedlige vannprøver i Årungen og kontrollerer disse for *Legionella* ved dyrkningsforsøk. Samtidig overvåkes innsjøen for oppblomstring av cyanobakterier. En oppblomstring av cyanobakterier kan medføre økt antall protozoer, som beskrevet blant annet i boken *Freshwater Microbiology* (Sigeo, 2009). Økt konsentrasjon av protozoer kan i sin tur bedre mulighetene for vekst av *Legionella* (Fields, 2007) Dersom de pågående undersøkelsene utvides slik at man også kontrollerer vekst av protozoer i innsjøen, kan eventuelle sammenhenger mellom påvist *Legionella*, oppblomstringer av cyanobakterier og vekst av protozoer analyseres. Det ville også være interessant å undersøke om det er en sammenheng mellom nivået av antistoffer mot *Legionella* hos roere, og konsentrasjonen av protozoer i innsjøer der de trener.

Fordi *Legionella* kan opptre i tilstander som ikke er kolonidannende, ville det være interessant å utvide undersøkelsene. Hvis de utvides til å omfatte både metoder som innebærer utsåing og kolonidannelse på skål samt ikke-dyrkbare metoder, kan slike

---

undersøkelsene avdekke om innsjøen inneholder et reservoar av ikke dyrkbare *Legionellaceae* i tillegg til de som kan avdekkes ved dyrkning. Metoder som kan benyttes for å avdekke et slikt reservoar er for eksempel RT-PCR (Real-time Polymerase chain reaction) og DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis).

Resultatene i oppgaven viste at *L. bozemanii* hadde høyere dyrkbarhet i mørke sammenlignet med lyset, se figur 3.2 (s. 30). En foreløpig undersøkelse antydte som nevnt i avsnitt 3.2, at organismen hadde samme overlevelse i lys og mørke.

Menneskelagede installasjoner er hovedårsaken til smitte av legionellose. Det er som regel mørkt inne i installasjonene. På bakgrunn av dette vil det være nyttig å gjøre nærmere undersøkelser av ulike egenskaper for *L. bozemanii* og andre *Legionellaceae* i lys og mørke.

## Kildeliste

Forekomst av giftige cyanobakterier i vannkilder i Sør-Norge (1999). *FHI* [On-line].

Tilgjengelig:

[http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft\\_5583&MainArea\\_5661=5583:0:15,1362:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5583=5603:41467:::1:5699:26:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5583&MainArea_5661=5583:0:15,1362:1:0:0:::0:0&MainLeft_5583=5603:41467:::1:5699:26:::0:0)

*Legionella* in the environment (2001). *Foundation for Water Research* [On-line].

Tilgjengelig: <http://www.fwr.org/legionla.pdf>

Giftalger i ferskvann: Et globalt og voksende problem (2008). *NIVA* [On-line].

Tilgjengelig:

[http://www.niva.no/symfoni/infoportal/publikasjon.nsf/89d21b1e3c11a1c241256ac600612f0d/c8e355401f2e4f43c1257524003ec350/\\$FILE/Festskrift-NIVA-web.pdf](http://www.niva.no/symfoni/infoportal/publikasjon.nsf/89d21b1e3c11a1c241256ac600612f0d/c8e355401f2e4f43c1257524003ec350/$FILE/Festskrift-NIVA-web.pdf)

Historical highlights of the Savannah River Site (2010a). *United States Department of energy* [On-line]. Tilgjengelig: <http://www.srs.gov/general/about/history1.htm>

Microbial Genomes Resources (2010). *NCBI* [On-line]. Tilgjengelig:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial\\_taxtree.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html)

National Environmental Research Park (2010b). *United States Department of energy* [On-line]. Tilgjengelig: <http://www.nerp.ornl.gov/history.html>

Abu, K. Y., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C. og Harb, O. S. (1998).

Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3127-3133.

Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M. og Fields, B. (1996). *Legionella*-like amebal pathogens phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases*, 2, 225-230.

---

Alli, O. A., Gao, L. Y., Pedersen, L. L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M. og Abu, K. Y. (2000). Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. ***Infection and Immunity***, 68, 6431-6440.

Andrea Carter (2009). The Hunt for Microbial 'Trojan Horses'. ***Oceanus Magazine*** [On-line]. Tilgjengelig: <http://www.who.edu/oceanus/viewArticle.do?id=59746>

Barker, J., Farrell, I. D. og Hutchison, J. G. (1986). Factors affecting growth of *Legionella pneumophila* in liquid media. ***Journal of Medical Microbiology***, 22, 97-100.

Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. og Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. ***Biotechnology Annual Review***, 11, 355-380.

Byrne, B. og Swanson, M. S. (1998). Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions. ***Infection and Immunity***, 66, 3029-3034.

Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. og Ollevier, F. (2007). Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. ***Water Research***, 41, 3159-3167.

Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J. og Jarraud, S. (2004). Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. ***Journal of Clinical Microbiology***, 42, 458-460.

Drozanski, W., Madra, L., Chmielewski, T., Schlecht, S. og Golecki, J. (1990). Evidence for the presence of N-unsubstituted glucosamine residues in the peptidoglycan *Sarcobium cytolyticum*—an intracellular bacterial parasite of amoebae. ***Systematic and Applied Microbiology***, 13, 220-226.

Ericsson, Maria (11-1-2005). Image of a single *Legionella pneumophila* bacterium of the strain LPO2. *University of California (Berkeley)* [On-line]. Tilgjengelig:

<http://mcb.berkeley.edu/labs/vance/legionellaphotocredit.html>

Faafeng, B. og Rohrlack, T. (2007). Mye giftproduserende alger i Årungen og søndre del av Bunnefjorden . *NIVA* [On-line]. Tilgjengelig:

<http://www.niva.no/symfoni/infoportal/publikasjon.nsf/URLInter/EB5D1CA5E003A507C1257339004B4BEB?openDocument&Highlight=årungen>

Fields, B. S. (1996). The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends in Microbiology*, 4, 286-290.

Fields, B. S. (2007). *Legionella* in the Environment. I boken: *Legionella Pneumophila, Infectious Agents and Pathogenesis* (s. 85-94). Springer Link.

Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L. og Pope, D. H. (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 9-16.

Franco, I. S., Shuman, H. A. og Charpentier, X. (2009). The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cellular Microbiology*, 11, 1435-1443.

Fraser, D. W. (2005). The challenges were legion. *The Lancet Infectious Diseases*, 5, 237-241.

Fujioka, R. S., Hashimoto, H. H., Siwak, E. B. og Young, R. H. (1981). Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 690-696.

Garcia-Pichel, F. (2009). Cyanobacteria. I boken: *Encyclopedia of Microbiology* (s. 107-124). Oxford: Academic Press.

---

Gomez-Valero, L., Rusniok, C. og Buchrieser, C. (2009). *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. ***Infection, Genetics and Evolution***, 9, 727-739.

Heller, A. (2009). Revealing the Identities and Functions of Microbes. 19-21. Lawrence Livermore National Laboratory. ***Science & Technology Review*** .

Heuner, K. (2001). Electron microscopic image of flagellated *Legionella pneumophila* Corby bacteria. ***Robert Koch Institut*** [On-line]. Tilgjengelig: [http://www.rki.de/EN/Content/Institute/DepartmentsUnits/ProjectGroups/P26/P26.html?\\_nnn=true](http://www.rki.de/EN/Content/Institute/DepartmentsUnits/ProjectGroups/P26/P26.html?_nnn=true)

Hoffman, P., Friedman, H., Bendinelli, M. og Garduño, R. A. (2007). Life Cycle, Growth Cycles and Developmental Cycle of *Legionella pneumophila*. I boken: ***Legionella pneumophila, Infectious Agent and Pathogenesis*** (s. 65-84). Springer Link.

Hussong, D., Colwell, R. R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A. D., Weiner, R. M. og Burge, W. D. (1987). Viable *Legionella pneumophila* Not Detectable by Culture on Agar Media. ***Nature Biotechnology***, 5, 947-950.

Isberg, R. R., O'Connor, T. J. og Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. ***Nature Reviews Microbiology***, 7, 13-24.

ISO 11731 Water quality - Detection and enumeration of *Legionella*, 1998

James, B. W., Mauchline, W. S., Dennis, P. J., Keevil, C. W. og Wait, R. (1999). Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. ***Applied and Environmental Microbiology***, 65, 822-827.

Kozak, N. A., Buss, M., Lucas, C. E., Frace, M., Govil, D., Travis, T., Olsen-Rasmussen, M., Benson, R. F. og Fields, B. S. (2010). Virulence factors encoded by

*Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. ***Journal of Bacteriology***, 192, 1030-1044.

Kuiper, M. W., Wullings, B. A., Akkermans, A. D., Beumer, R. R. og van der Kooij, D. (2004). Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. ***Applied and Environmental Microbiology***, 70, 6826-6833.

Lupton, F. S. og Marshall, K. C. (1981). Specific Adhesion of Bacteria to Heterocysts of *Anabaena* spp. and Its Ecological Significance. ***Applied and Environmental Microbiology***, 42, 1085-1092.

Mauchline, W. S., James, B. W., Fitzgeorge, R. B., Dennis, P. J. og Keevil, C. W. (1994). Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*. ***Infection and Immunity***, 62, 2995-2997.

Merhej, V., Royer-Carenzi, M., Pontarotti, P. og Raoult, D. (2009). Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria. ***Biology Direct***, 4, 13.

Moliner, C., Fournier, P. E. og Raoult, D. (2010). Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. ***FEMS Microbiology Reviews***.

Molmeret, M., Jones, S., Santic, M., Habyarimana, F., Garcia Esteban, M. T. og Abu, K. Y. (2009). Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. ***Environmental Microbiology***.

Molmeret, M. I., Santic, M. og Kwaik, Y. A. (2007). Interaction of *Legionella pneumophila* with Amoeba. I boken: ***Legionella pneumophila, Infectious Agent and Pathogenesis*** (s. 185-202). Springer Link.



---

Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L. og Kwaik, Y. A. (2004). Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. ***Microbes and Infection***, 6, 129-139.

Moss, C. W., Karr, D. E. og Dees, S. B. (1981). Cellular fatty acid composition of *Legionella longbeachae* sp. nov. ***Journal of Clinical Microbiology***, 14, 692-694.

Moss, C. W., Weaver, R. E., Dees, S. B. og Cherry, W. B. (1977). Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease. ***Journal of Clinical Microbiology***, 6, 140-143.

Mur, L. R., Skulberg, O. M. og Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment. I boken: ***Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*** WHO.

Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S. og Donlan, R. M. (2001). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. ***Microbiology***, 147, 3121-3126.

Nygård, K., Werner Johansen, Ø., Rønsen, S., Caugant, D. A., Simonsen, Ø., Kanestrøm, A., Ask, E., Ringstad, J., Ødegård, R., Jensen, T., Krogh, T., Høiby, E. A., Ragnhildstveit, E., Aaberge, I. S. og Aavitsland, P. (2008). An Outbreak of Legionnaires Disease Caused by Long-Distance Spread from an Industrial Air Scrubber in Sarpsborg, Norway. ***Clinical Infectious Diseases***, 46, 61-69.

Paerl, H. W., Fulton, R. S., III, Moisander, P. H. og Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. ***Scientific World Journal***, 1, 76-113.

Paerl, H. W. og Pinckney, J. L. (1996). A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. ***Microbial Ecology***, 31, 225-247.

Palusinska-Szyszk, M., Kalitynski, R., Russa, R., Dawidowicz, A. L. og Drozanski, W. J. (2008). Cellular envelope phospholipids from *Legionella lytica*. **FEMS Microbiology Letters**, 283, 239-246.

Park, M., Yun, S. T., Kim, M. S., Chun, J. og Ahn, T. I. (2004). Phylogenetic characterization of *Legionella*-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for '*Candidatus Legionella jeonii*' sp. nov. **Environmental Microbiology**, 6, 1252-1263.

Rechnitxer, C., Williams, A., Wright, B., Dowsett, A. B., Milman, N. og Fitzgeorge, R. B. (1992). Demonstration of the intracellular production of tissue-destructive protease by *Legionella pneumophila* multiplying within guinea-pig and human alveolar macrophages. **Journal of General Microbiology**, 138, 1671-1677.

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. og Keevil, C. W. (1994). 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. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 1585-1592.

Romarheim, A. T. (2009). Erfaring med overvåkning og forvaltning av cyanobakterier i Årungen. På konferansen: *Fagmøte i Norsk vannforening*.

Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **Journal of Clinical Pathology**, 33, 1179-1183.

Rudi, K., Skulberg, O. M., Skulberg, R. og Jakobsen, K. S. (2000). Application of Sequence-Specific Labeled 16S rRNA Gene Oligonucleotide Probes for Genetic Profiling of Cyanobacterial Abundance and Diversity by Array Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 4004-4011.

Sauer, J. D., Bachman, M. A. og Swanson, M. S. (2005). The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella*

---

*pneumophila* in macrophages. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 102, 9924-9929.

Scola, B. L., Birtles, R. J., Greub, G., Harrison, T. J., Ratcliff, R. M. og Raoult, D. (2004). *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 54, 699-703.

Sharrar, R. G., Streiff, E, and Parkin, W. E (24-1-1997). From the January 18, 1977, special issue of Epidemiologic Notes and Reports Follow-up on Respiratory Illness in Philadelphia . ***Morbidity and Mortality Weekly Report*** [On-line]. Tilgjengelig: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00045731.htm>

Sigee, D. C. (2009). Epiphytic associations of bacteria with phytoplankton. I boken: ***Freshwater Microbiology*** (s. 333-338). Wiley.

Soderberg, M. A., Rossier, O. og Cianciotto, N. P. (2004). The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. ***Journal of Bacteriology***, 186, 3712-3720.

Steinert, M., Emody, L., Amann, R. og Hacker, J. (1997). Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. ***Applied and Environmental Microbiology***, 63, 2047-2053.

Steinert, M., Engelhard, H., Flugel, M., Wintermeyer, E. og Hacker, J. (1995). The Lly protein protects *Legionella pneumophila* from light but does not directly influence its intracellular survival in *Hartmannella vermiformis*. ***Applied and Environmental Microbiology***, 61, 2428-2430.

Stevenson, B. S. og Waterbury, J. B. (2006). Isolation and Identification of an Epibiotic Bacterium Associated with Heterocystous *Anabaena* Cells. ***The Biological Bulletin***, 210, 73-77.

Taylor, M., Ross, K. og Bentham, R. (2009). *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. ***Microbial ecology***, 58, 538-547.

Tison, D. L., Pope, D. H., Cherry, W. B. og Fliermans, C. B. (1980). Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 456-459.

Venkataraman, C., Haack, B. J., Bondada, S. og Kwaik, Y. A. (1997). Identification of a Gal/GalNAc Lectin in the Protozoan *Hartmannella vermiformis* as a Potential Receptor for Attachment and Invasion by the Legionnaires' Disease Bacterium. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 537-547.

Wadowsky, R. M. og Yee, R. B. (1983). Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 1447-1449.

Wellinghausen, N., Frost, C. og Marre, R. (2001). Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3985-3993.

Wheeler, J. M. (1906). The Viability of *Bacillus typhosus* under various Conditions. *The Journal of Medical Research*, 15, 269-299.

Whitman, R. L., Nevers, M. B., Korinek, G. C. og Byappanahalli, M. N. (2004). Solar and Temporal Effects on *Escherichia coli* Concentration at a Lake Michigan Swimming Beach. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4276-4285.

Widmer, A., Hohl, P., Dirnhofer, S., Bassetti, S., Marsch, S. og Frei, R. (2007). *Legionella bozemanii*, an Elusive Agent of Fatal Cavitory Pneumonia. *Infection*, 35, 180-181.

Wintermeyer, E., Rdest, U., Ludwig, B., Debes, A. og Hacker, J. (1991). Characterization of legiolysin (Ily), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*, 5, 1135-1143.

---

Wright, S. J. L., Redhead, K. og Maudsley, H. (1981). *Acanthamoeba castellanii*, a Predator of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 125, 293-300.

Xinyao, L., Miao, S., Yonghong, L., Yin, G., Zhongkai, Z., Donghui, W., Weizhong, W. og Chencai, A. (2006). Feeding Characteristics of an Amoeba (*Lobosea Naegleria*) Grazing Upon Cyanobacteria: Food Selection, Ingestion and Digestion Progress. *Microbial Ecology*, 51, 315-325.

Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C. M., Paterson, D. L. og Cheresky, A. (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *The Journal of Infectious Diseases*, 186, 127-128.



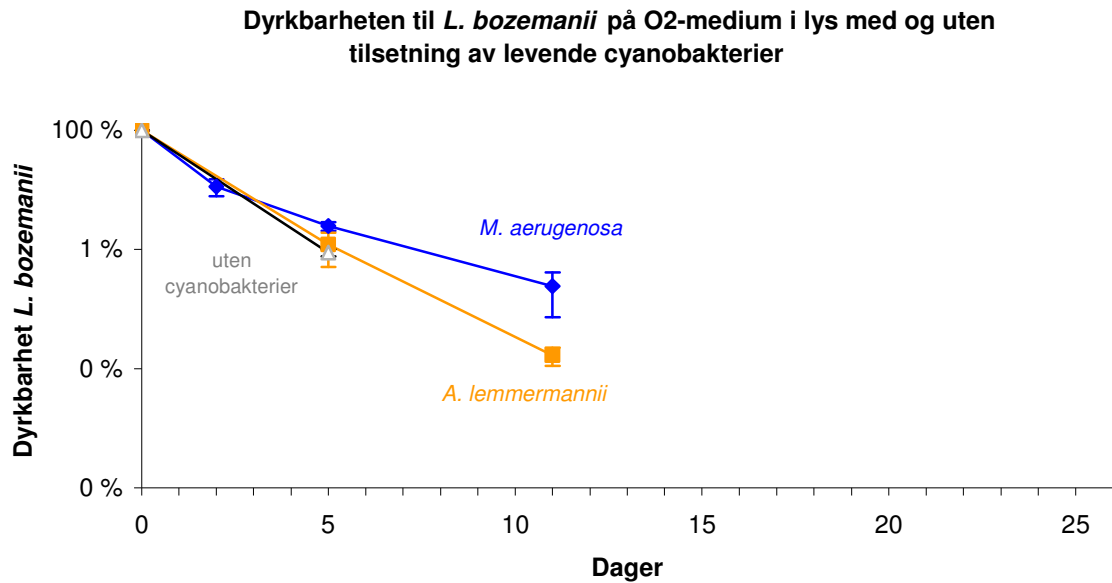
## 5. Vedlegg

### Vedlegg 1

#### 5.1.1 Virkning av tilsetning av levende cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket i lys

Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O <sub>2</sub> -mediet:	Konsentrasjonen av <i>L. bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant påvirkning?
		Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
5	<i>A. lem</i> -	9,9E+04	1,2E+03	1 %	P > 0,1	Nei
5	<i>M. aeru</i> -	9,9E+04	2,4E+03	2 %	P = 0,003	Ja
5	Ingen	1,6E+05	1,0E+03	1 %		
11	<i>A. lem</i> -	9,9E+04	1,7E+01	0 %		
11	<i>M. aeru</i> -	9,9E+04	2,3E+02	0 %		
10	Ingen	1,6E+05	1,0E+00	0 %		

**Tab V1** Legionella bozemanii dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium ved 25 °C i lys. Forsøket er tilsatt levende celler av cyanobakteriene Anabaena lemmermannii NIVA CYA 298 (*A. lem* -) og Microcystis aeruginosa NIVA CYA 228/1 (*M. aeru* -). Ingen av disse cyanobakteriene produserer mikrocyстин. Tilsetning av cyanobakteriene førte til økt dyrkbarhet for *L. bozemanii* ved tilsetning av *M. aeruginosa*. Forsøket ble ikke gjentatt da kulturene med cyanobakterier døde ut. Selv om *M. aeruginosa* NIVA CYA 228/1 viste seg å påvirke dyrkbarheten til *L. bozemanii*, er ikke dette forsøket alene nok til å avgjøre *M. aeruginosa* sin betydning. Det ble også forøkt å dyrke *L. bozemanii* på O<sub>2</sub>-medium tilsatt *Anabaena lemmermannii* NIVA CYA 438, men skålene var uten vekst av *L. bozemanii* og overgrodd av forurensende bakterier.



**Fig V1** Grafisk fremstilling av verdiene i tabell V1.

Dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket ved 25 °C i lys på O<sub>2</sub> medium med og uten tilsetning av cyanobakterier. —▲— uten tilsetning, —◆— tilsetning av *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 228/1 som kan produsere mikrocyстин, —■— tilsetning av *Anabaena lemmermannii* NIVA CYA 298 som ikke produserer mikrocyстин. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble beregnet ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) -agarskåler, og dyrkbarhet beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer. Forsøket ble ikke gjentatt da kulturene med cyanobakterier døde ut. Det ble også forøkt å dyrke *L. bozemanii* på O<sub>2</sub>-medium tilsatt *Anabaena lemmermannii* NIVA CYA 438, men skålene var uten vekst av *L. bozemanii* og overgrodd av forurensende bakterier.

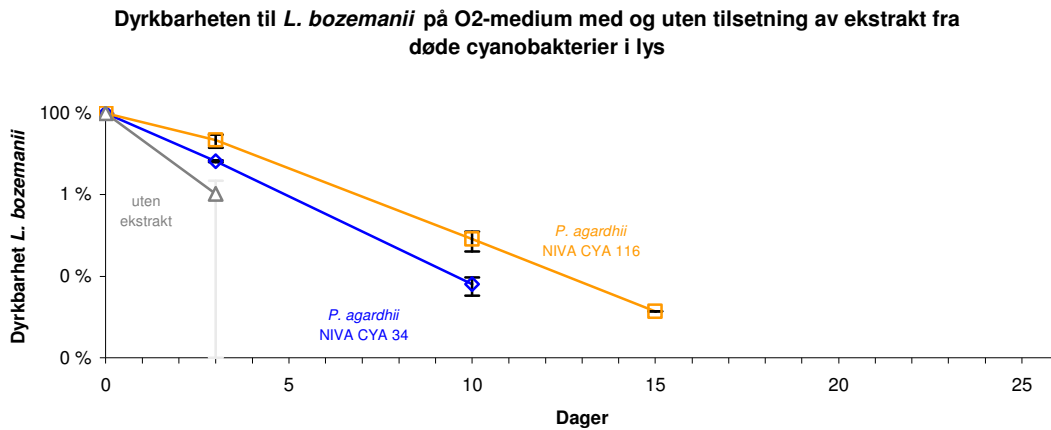


## Vedlegg 2

### 5.1.2 Virkning av tilsetning av ekstrakter av døde cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket i lys

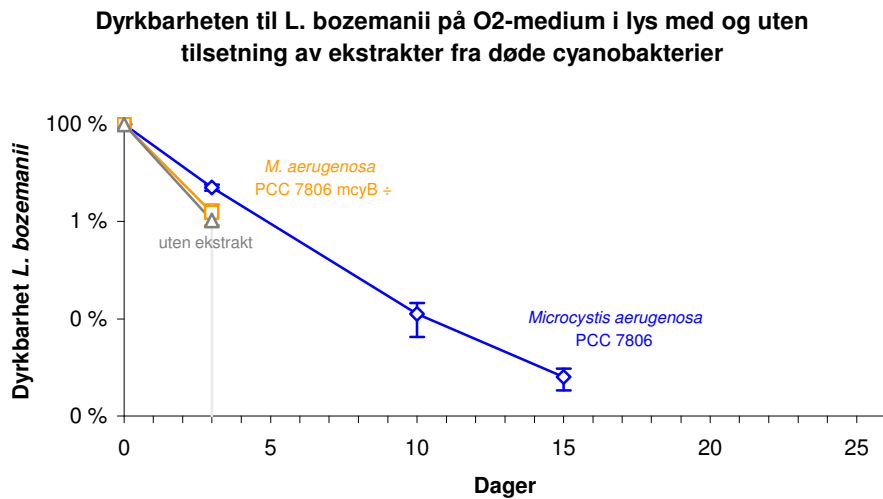
Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O <sub>2</sub> -mediet:	Konsentrasjoenen av <i>L. bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant påvirkning?
		Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
3	<i>M. aeru</i> +	2,4E+05	1,2E+04	5 %	P = 0,007	Ja
3	<i>M. aeru</i> -	3,6E+05	5,6E+03	2 %	P > 0,1	Nei
3	<i>P. ag</i> -	2,2E+05	4,8E+04	22 %	P = 0,011	Ja
3	<i>P. ag</i> +	2,3E+05	1,5E+04	7 %	P = 0,001	Ja
3	Ingen	2,1E+05	2,2E+03	1 %		
10	<i>M. aeru</i> +	2,4E+05	3,0E+01	0 %		
10	<i>M. aeru</i> -	3,6E+05	2,0E+03	1 %		
10	<i>P. ag</i> -	2,2E+05	1,8E+02	0 %		
10	<i>P. ag</i> +	2,3E+05	1,5E+01	0 %		
10	Ingen	2,1E+05	1,0E+00	0 %		

**Tab V2** *Legionella bozemanii* dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium ved 25 °C i lys. Forsøket er tilsatt ekstrakter av døde celler fra cyanobakterier. Det ble benyttet ekstrakt av *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (*M. aeru* +), *M. aeruginosa* PCC 7806 mcyB ÷ (*M. aeru* -), Ekstrakt av *Planktothrix agardhii* NIVA CYA 116 (*P. ag* -) og *P. agardhii* NIVA CYA 34 (*P. ag* +) Cyanobakterier merket med '+' kan produsere microcystin. Cyanobakterier merket med '-' produserer ikke microcystin. Tilsetning av cyanobakteriene førte til økt dyrkbarhet for *L. bozemanii* ved tilsetning av *P. agardhii* samt ved tilsetning av den microcystinproduserende stammen til *M. aeruginosa*. Forsøk 2 var dessverre forurenset og gav ikke resultat.



**Fig. V2a** Grafisk fremstilling av verdiene i tabell V2

Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* i lys ved 25 °C på O<sub>2</sub>-medium med og uten tilsetning av ekstrakter av døde *Planktothrix agardhii*: —△— uten tilsetning, —◇— tilsetning av *P. agardhii* NIVA CYA 34 som kan produsere mikrocyстин, —□— tilsetning av *P. agardhii* NIVA CYA 116 som ikke produserer mikrocyстин. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble beregnet ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) -agarskåler, og dyrkbarhet beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer.



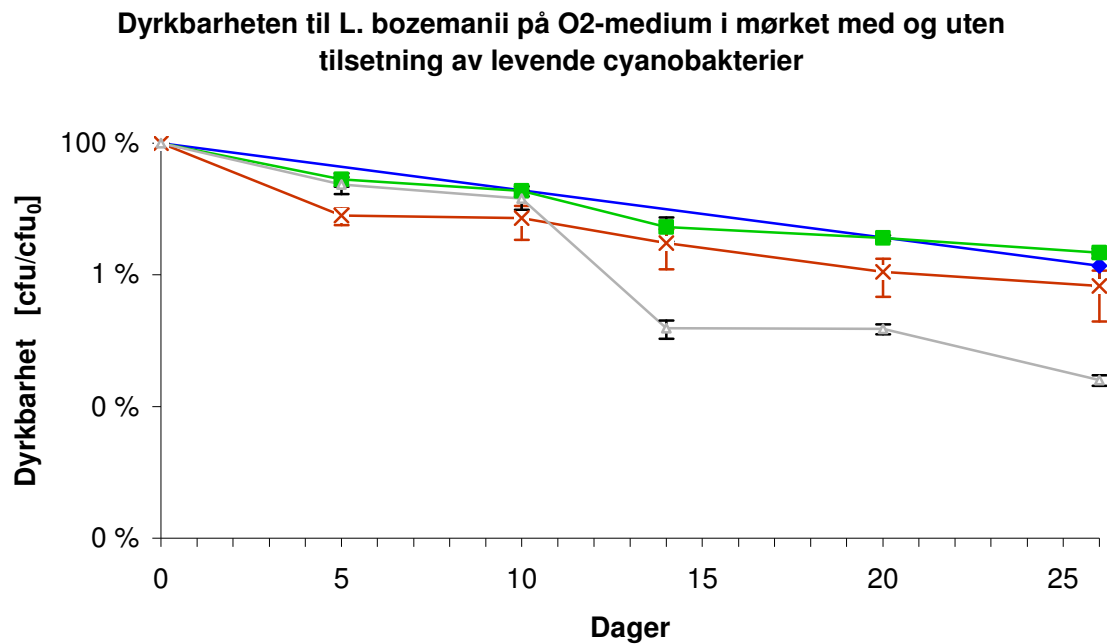
**Fig. V2b** Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* i lys ved 25 °C på O<sub>2</sub>-medium med og uten tilsetning av ekstrakter av *Microcystis aeruginosa*: —△— uten tilsetning, —◇— tilsetning av *M. aeruginosa* PCC 7806 som kan produsere mikrocyстин, —□— tilsetning av *M. aeruginosa* PCC 7806 mcyB+ som ikke produserer mikrocyстин. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble beregnet ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) -agarskåler, og dyrkbarhet beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer.

## Vedlegg 3

### 5.1.3 Virkning av tilsetning av levende cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket i mørke

Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O <sub>2</sub> -mediet:	Konsentrasjonen av <i>L. bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant påvirkning?
		Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
5	<i>A. lem</i> -	1,2E+05	1,1E+04	9 %	P > 0,1	Nei
5	<i>M. aeru</i> -	9,2E+04	2,6E+04	28 %	P > 0,1	Nei
5	Ingen	8,9E+04	2,1E+04	23 %		
10	<i>A. lem</i> -	1,2E+05	8,0E+03	7 %	P > 0,1	Nei
10	<i>M. aeru</i> -	9,2E+04	1,7E+04	19 %	P > 0,1	Nei
10	Ingen	8,9E+04	1,3E+04	14 %		
14	<i>A. lem</i> -	1,2E+05	3,3E+03	3 %	P = 0,1	Ja
14	<i>M. aeru</i> -	9,2E+04	5,0E+03	5 %	P = 0,013	Ja
14	Ingen	8,9E+04	1,4E+02	0 %		
20	<i>A. lem</i> -	1,2E+05	1,2E+03	1 %	P = 0,062	Ja
20	<i>M. aeru</i> -	9,2E+04	3,3E+03	4 %	P = 0,1*	Ja
20	Ingen	8,9E+04	1,3E+02	0 %		
26	<i>A. lem</i> -	1,2E+05	7,3E+02	1 %	P = 0,079	Ja
26	<i>M. aeru</i> -	9,2E+04	2,0E+03	2 %	P = 0,1*	Ja
26	Ingen	8,9E+04	2,2E+01	0 %		

**Tab V3** *Legionella bozemanii* dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium ved 25 °C i mørke. Forsøket er tilsatt levende celler av cyanobakteriene *Anabaena lemmermannii* NIVA CYA 298 (*A. lem* -) og *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 228/1 (*M. aeru* -). Ingen av disse cyanobakteriene produserer mikrocytin. Tilsetning av cyanobakteriene førte til økt dyrkbarhet for *L. bozemanii* fra dag 14. Forsøket ble ikke gjentatt da kulturene med cyanobakterier døde ut.



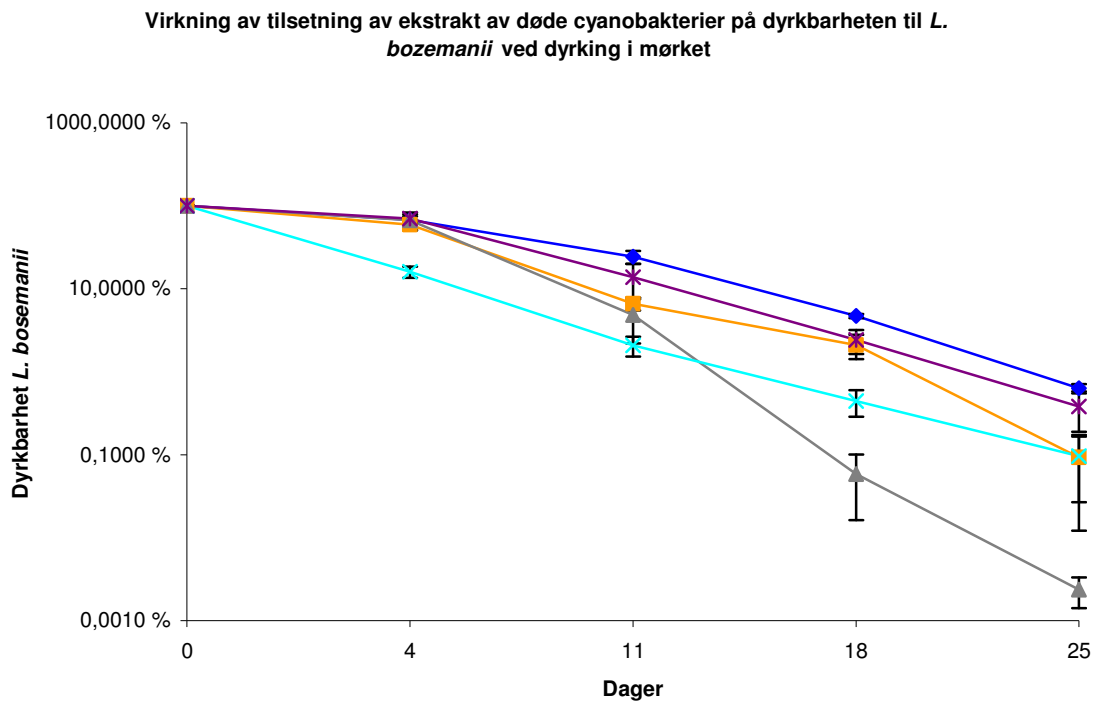
**Fig 3.3.2** Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* ved 25 °C i mørket, dyrket på O2-medium med og uten tilsetning av cyanobakterier: —△— uten tilsetning, —◆— tilsetning av *Anabaena lemmermannii* NIVA CYA 34 som kan produsere mikrocystin, —■— tilsetning av *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 288/1 som ikke produserer mikrocystin, —×— tilsetning av *Anabaena lemmermannii* NIVA CYA 298 som ikke produserer mikrocystin.

## Vedlegg 4

### 5.1.4 Virkning av tilsetning av ekstrakter av døde cyanobakterier på dyrkbarheten til *L. bozemanii* dyrket i mørke

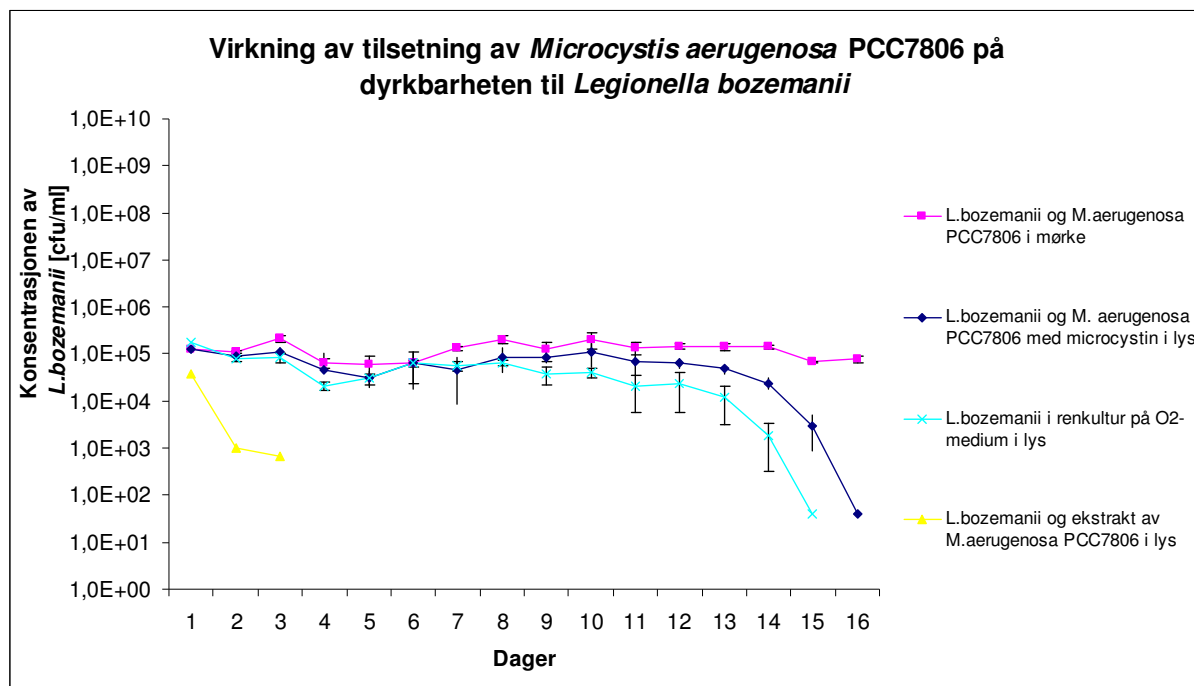
Dag <sub>x</sub>	Tilsetning til O <sub>2</sub> -mediet:	Konsentrasjonen av <i>L. bozemanii</i> [cfu/ml]		Utbytte	T-test	Signifikant påvirkning?
		Dag <sub>0</sub>	Dag <sub>x</sub>			
4	<i>M. aeru</i> +	2,4E+05	1,6E+05	67 %	P > 0,1	Nei
4	<i>M. aeru</i> -	3,6E+05	5,8E+04	16 %	P = 0,005	Ja
4	<i>P. ag</i> -	2,2E+05	1,5E+05	70 %	P > 0,1	Nei
4	<i>P. ag</i> +	2,3E+05	1,4E+05	59 %	P > 0,1	Nei
4	Ingen	2,1E+05	1,4E+05	67 %		
11	<i>M. aeru</i> +	2,4E+05	5,7E+04	24 %	P = 0,003	Ja
11	<i>M. aeru</i> -	3,6E+05	7,6E+03	2 %	P > 0,1	Nei
11	<i>P. ag</i> -	2,2E+05	3,0E+04	14 %	P = 0,078	Ja
11	<i>P. ag</i> +	2,3E+05	1,6E+04	7 %		
11	Ingen	2,1E+05	1,0E+04	5 %		
18	<i>M. aeru</i> +	2,4E+05	1,1E+04	5 %	P ≤ 0,001	Ja
18	<i>M. aeru</i> -	3,6E+05	1,6E+03	0 %	P = 0,014	Ja
18	<i>P. ag</i> -	2,2E+05	5,3E+03	2 %	P = 0,1*	Ja
18	<i>P. ag</i> +	2,3E+05	4,9E+03	2 %	P = 0,007	Ja
18	Ingen	2,1E+05	1,2E+02	0 %		
25	<i>M. aeru</i> +	2,4E+05	1,5E+03	1 %	P ≤ 0,001	Ja
25	<i>M. aeru</i> -	3,6E+05	3,5E+02	0 %	P = 0,079	Ja
25	<i>P. ag</i> -	2,2E+05	8,4E+02	0 %	P = 0,027	Ja
25	<i>P. ag</i> +	2,3E+05	2,2E+02	0 %	P > 0,1	Nei
25	Ingen	2,1E+05	5,0E+00	0 %		

**Tab V4** *Legionella bozemanii* dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium ved 25 °C i mørke. Forsøket er tilsatt ekstrakter av døde celler fra cyanobakterier. Det ble benyttet ekstrakt av *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (*M. aeru* +), *M. aeruginosa* PCC 7806 mcyB ÷ (*M. aeru* -), Ekstrakt av *Planktothrix agardhii* NIVA CYA 116 (*P. ag* -) og *P. agardhii* NIVA CYA 34 (*P. ag* +)



**Fig. V2b** Dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* i mørke ved 25 °C på O2-medium med og uten tilsetning av ekstrakter av døde cyanobakterier: ♦ tilsatt ekstrakt av *Microcystis aerugenosa* PCC 7806, ■ tilsatt ekstrakt av *Planktothrix agardhii* NIVA CYA 34, ▲ ingen tilsetning til O2-mediet, \* tilsatt ekstrakt av *Microcystis aerugenosa* PCC 7806 mcyB<sup>-</sup>, \* tilsatt ekstrakt av *Planktothrix agardhii* NIVA CYA 116. Konsentrasjonen av *L. bozemanii* ble beregnet ved telling av kolonier på BCYE (Buffered charcoal yeast extract) –agarskåler. Dyrkbarhet ble beregnet som prosent av utgangskonsentrasjonen i den enkelte kolbe. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer.

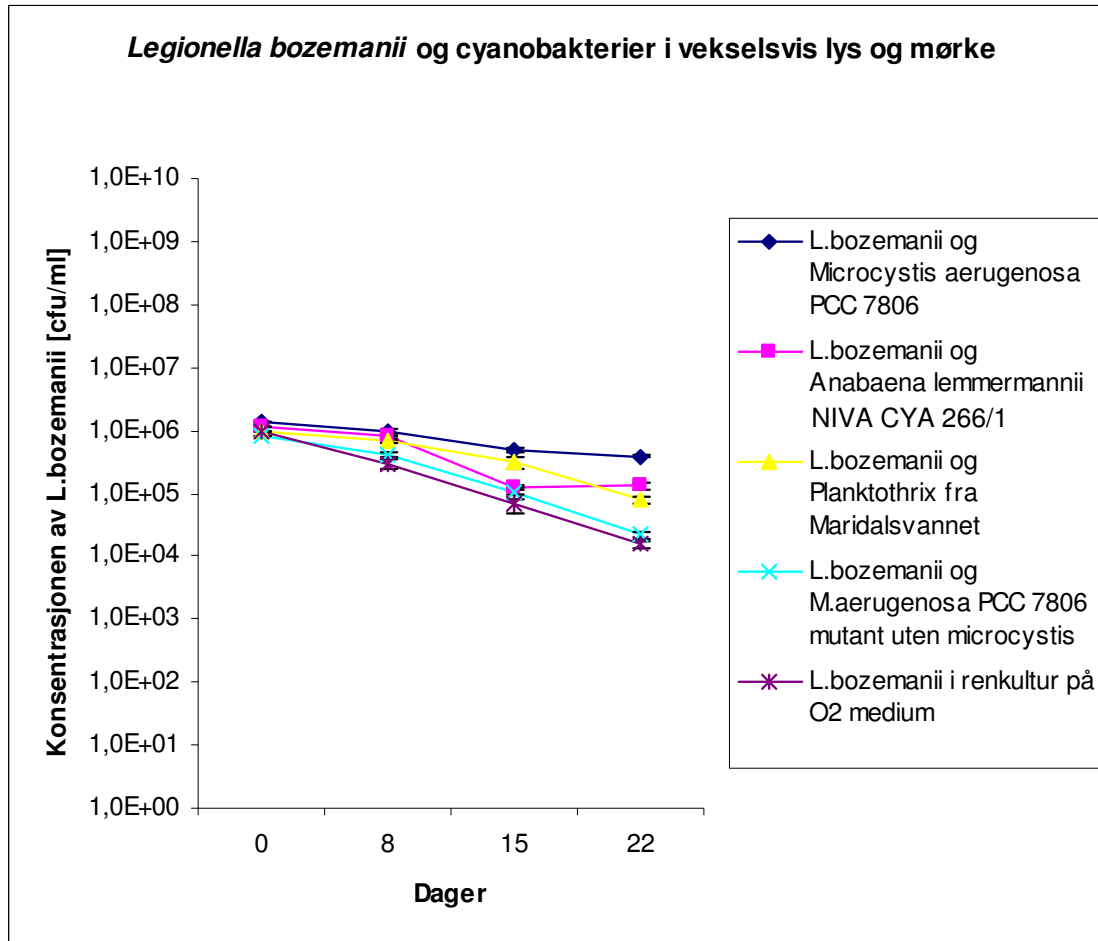
## Vedlegg 5

5.1.5 Virkning av tilsetning levende cyanobakterier på dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* ved dyrking på 20 °C

**Fig V5** Forsøket ble utført ved 20 °C. *Legionella bozemanii* ble dyrket på næringsfattig O2-medium ved 20 °C. Noen av kolbene i forsøket ble dyrket i lys andre i mørke. Forsøket er utført både med og uten tilsetning av cyanobakterien *Microcystis aeruginosa* PCC7806 som kan produsere microcystin. Lysforhold og eventuell tilsetning er angitt i tegnforklaringen til høyre i diagrammet. Resultatene viste at *L. bozemanii* hadde høyere dyrkbarhet i mørke enn i lys. I tillegg viste det seg at tilsetning av *M. aeruginosa* førte til noe høyere dyrkbarhet for *L. bozemanii*. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med lodrette linjer.

## Vedlegg 6

### 5.1.6 Virkning av tilsetning levende cyanobakterier på dyrkbarheten til *Legionella bozemanii* ved dyrking på 20 °C



**Fig V6.** *L. bozemanii* ble dyrket på næringsfattig O<sub>2</sub>-medium ved 20 °C. Lysforholdene i forsøket vekslet mellom 12 timer lys og 12 timer mørke. Tilsetning av cyanobakterier førte til noe høyere dyrkbarhet for *L. bozemanii*. Hver linje i figuren representerer 3 paralleller, og standardavviket er vist med loddrette linjer.

### 5.1.7 Sammenligning av Figur V5 og V6

Sammenligning av resultatene fra disse to forsøkene, viste at dyrkbarheten til *L. bozemanii* ble redusert av lys. Dyrkbarheten var høyest ved dyrking i mørke. Dyrkbarheten var lavest ved dyrking i lys. Ved veksling mellom 12 timer lys og 12 timer mørke var dyrkbarheten høyere enn i lys, men lavere enn i mørke. Tilsetning av cyanobakterier økte dyrkbarheten noe under alle lysforhold.





---