

Zmienność bakterii *Legionella* spp. w środowiskach antropogenicznych - analiza genomowa izolatów z budynków użyteczności publicznej



Piotr Koper, Kamil Żebracki, Jakub Wysokiński, Marta Palusińska-Szys, Andrzej Mazur
Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-031 Lublin

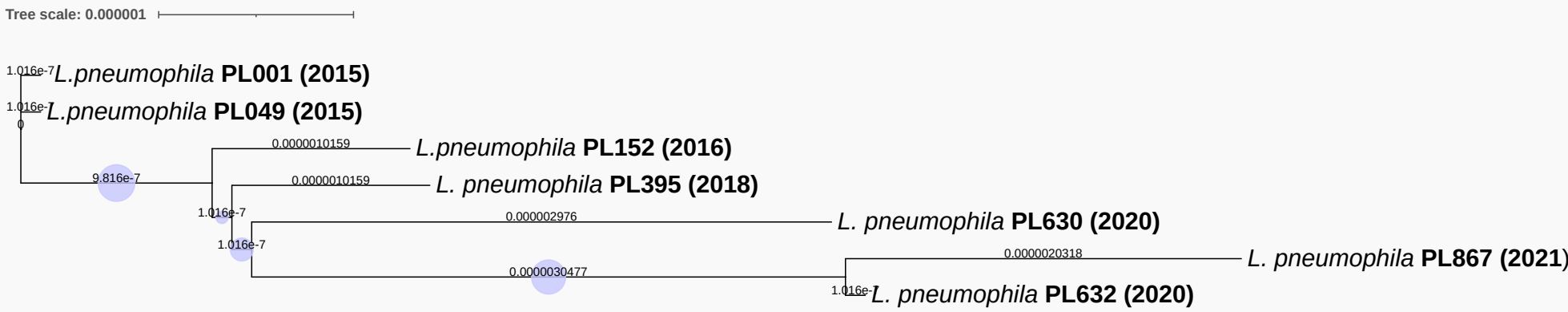
Cel pracy

Celem badania była analiza zmienności genomowej szczepów *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* wyizolowanych z systemu wodnego jednego budynku użyteczności publicznej, w celu określenia zakresu mikroewolucji tych bakterii w środowisku antropogenicznym.

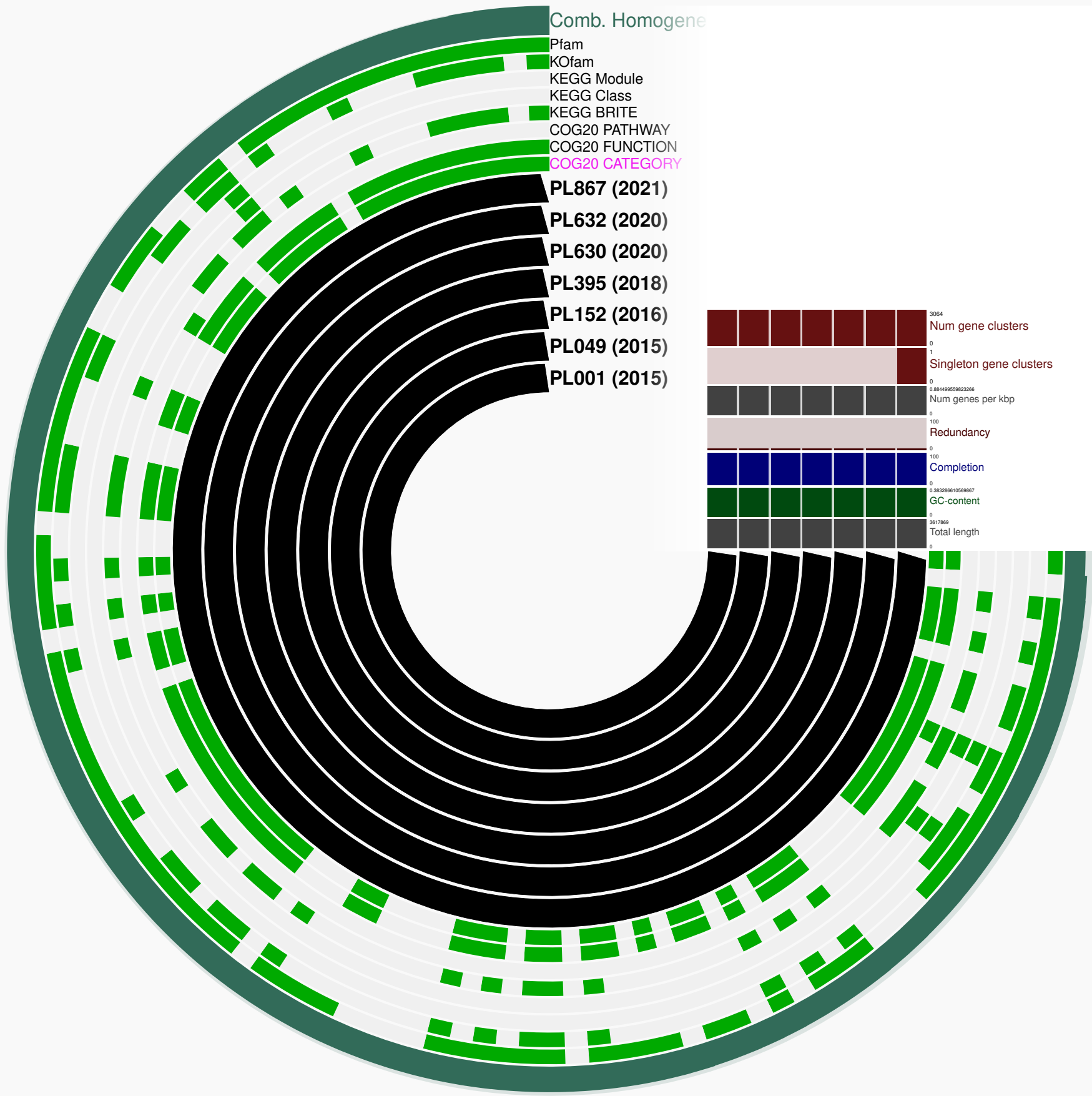
Wstęp

Legionella pneumophila to oportunistyczny patogen środowiskowy, naturalnie pasożytujący w komórkach słodkowodnych pierwotniaków (ameb). Bakterie są również często izolowane z systemów wodnych budynków, w których tworzą biofilmy i po przekształceniu w aerozol mogą być wraz z nim wdychane przez ludzi, kolonizując ich makrofagi płucne i prowadząc do rozwoju *legionellozy* – potencjalnie ciężkiego zapalenia płuc. Zdolność do przeżywania i namnażania się w komórkach gospodarza oraz długotrwałego utrzymywania się w środowisku jest możliwa dzięki licznym czynnikom wirulencji, takim jak systemy sekrecji, białka powierzchniowe oraz enzymy degradujące. Bakterie mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, zwłaszcza w budynkach użyteczności publicznej. Zrozumienie dynamiki ewolucyjnej w obrębie pojedynczych instalacji wodnych może przyczynić się do lepszego zarządzania ryzykiem występowania zakażeń.

A.



B.



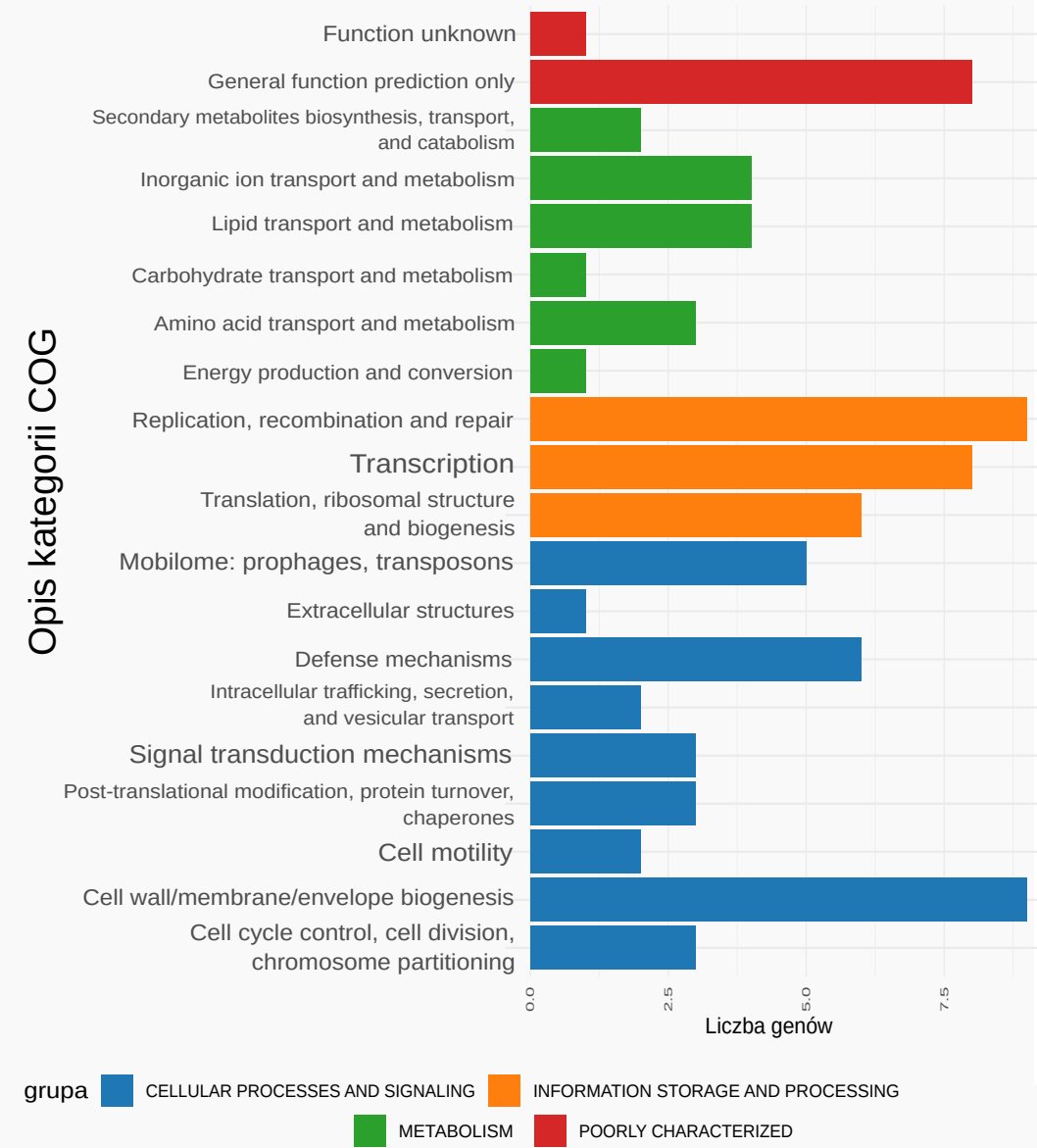
Ryc. 1 Analiza filogenetyczna i obecności wybranych klastrów genów w genomach *Legionella pneumophila* wyizolowanych z jednej instalacji wodnej.
A. Drzewo filogenetyczne wygenerowane metodą największej wiarygodności (maximum likelihood, ML) na podstawie zestawu rdzeniowych genów białkowych (single-copy core genes, SCGs). Analiza została przeprowadzona w programie IQ-TREE z wykorzystaniem empirycznego modelu substytucji aminokwasów WAG oraz 1000 replikacji bootstrap (UFBoot).
B. Macierz obecności/braku wybranych klastrów genów, które różnicują analizowane izolaty. Zielone pole na zewnętrznym okręgu oznacza obecność danego klastra, białe – jego brak. Kolejne okręgi symbolizują zakres uzyskanej adnotacji funkcjonalnej. Przedstawione klastry stanowią wyselekcjonowany podzbiór całkowitego pangenu, ograniczony do genów zmiennych pomiędzy szczepami. Po prawej stronie przedstawiono podstawowe parametry genomów: liczbę klastrów genów, udział singletonów, liczbę genów na 1 kpz, długość genomu, zawartość GC oraz wskaźnik kompletności i redundancji.

Badanie finansowane w ramach projektu NCN SONATA nr 2022/47/D/NZ8/00258.

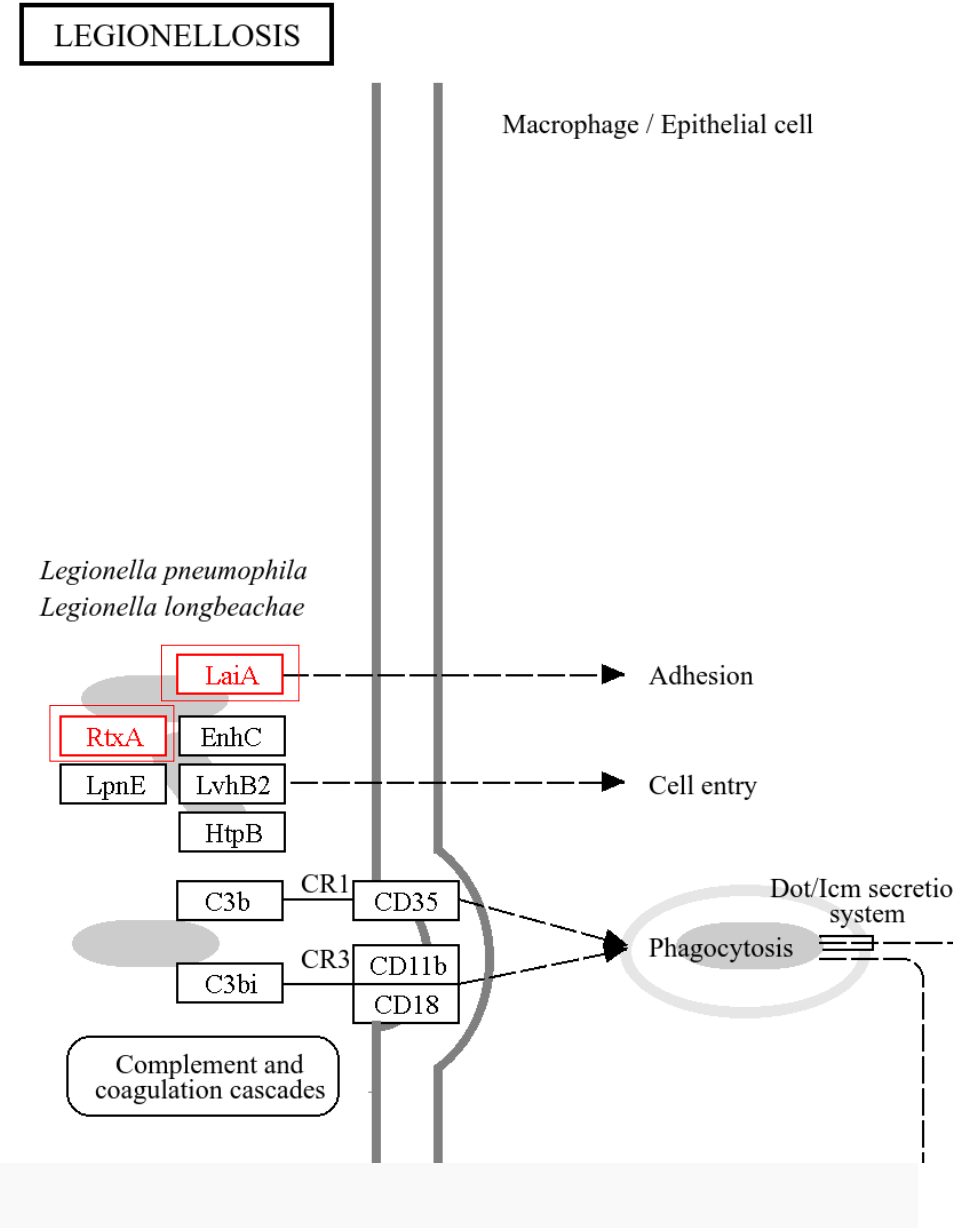
Metody

Przeanalizowano siedem izolatów *L. pneumophila* pochodzących z zamkniętego systemu wodnego budynku uniwersyteckiego w Perugii (Włochy), wyizolowanych w latach 2015 (2), 2016, 2018, 2020 (2) i 2021. Zastosowano sekwencjonowanie długimi odczytami (Oxford Nanopore) w celu uzyskania kompletnej struktury genomowej każdego szczepu, obejmującej chromosom bakteryjny oraz plazmid (~128 kb). Genomy zostały poddane adnotacji funkcjonalnej za pomocą narzędzia Bakta, a następnie przeanalizowane przy użyciu środowiska Anvi'o. Rekonstrukcja pangenu umożliwiła wydzielenie genomu rdzeniowego i zmiennego. Adnotacje funkcjonalne wykonano dodatkowo względem baz danych COG i KEGG, z uwzględnieniem klasyfikacji genów według ich funkcji biologicznych.

A.



B.



Ryc. 2 Charakterystyka funkcjonalna genów zmiennych pomiędzy izolatami *Legionella pneumophila*.
A. Kategoryzacja funkcjonalna genów różnicujących analizowane izolaty na podstawie adnotacji COG. Przedstawione słupki pokazują liczebność genów przypisanych do wybranych kategorii funkcjonalnych.
B. Mapa szlaku KEGG związanego z zakażeniem *Legionella* spp. (pathway: legionellosis), wskazująca pozycje białek zidentyfikowanych w zestawie genów zmiennych. Zaznaczone na czerwono białka (m.in. RtxA, LaiA) zostały zidentyfikowane w analizie jako elementy różnicujące poszczególne izolaty.

Wyniki

Na podstawie rdzeniowego genomu utworzono drzewo filogenetyczne (ryc. 1A), którego układ wykazywał zgodność z chronologią izolacji: najstarsze szczepy (2015) tworzyły kład bazalny, a kolejne izolaty tworzyły rozgałęzienia dendrogramu ułożone zgodnie z czasem izolacji, co sugeruje *lokalną ewolucję w obrębie instalacji wodnej*.

Analiza pangenu wykazała obecność **101 genów** różnicujących szczepy (ryc. 1B), zlokalizowanych zarówno na chromosomie, jak i w plazmidzie. Kategorie funkcjonalne **COG** wskazały dominację genów związanych z **metabolizmem** (aminokwasy, koenzymy, lipidy) oraz z **procesami komórkowymi i sygnalizacyjnymi** (ryc. 2A).

Wszystkie geny zaklasyfikowane do kategorii COG S („Function unknown”) i X („mobilome, prophages, transposons”) pochodziły z plazmidu i były opisane jako białka hipotetyczne – świadczy to o *dużej zmienności i potencjalnej roli adaptacyjnej plazmidu* (ryc. 2A).

Szczególną uwagę zwrócono na geny zmapowane do ścieżek KEGG, m.in. do mapy „Legionellosis” (map05134) (ryc. 2B):

- **rtxA** – koduje adhezynę błonową, wpływającą na przeżywalność wewnątrzkomórkową w amebach.
- **laiA** – koduje kolagenopodobne białko wpływające na wirulencję.

Zmienność dotyczyła również globalnego regulatora translacyjnego **csrA**, który uczestniczy w przełączaniu metabolizmu bakterii między aminokwasami, lipidami i glukozą – co może stanowić adaptację do warunków w instalacji.

Łącznie geny przypisano do 36 unikalnych szlaków metabolicznych KEGG.

Wnioski

Wyniki wskazują, że bakterie *L. pneumophila*, **izolowane z pojedynczego systemu wodnego mogą ulegać lokalnej mikroewolucji w czasie**, co przejawia się w różnicach sekwencji kodujących genów związanych z metabolizmem, przeżywalnością i wirulencją.

Zmienność plazmidu, zawierającego geny *bez precyzyjnej adnotacji funkcjonalnej, jak i mobilne elementy genetyczne*, może odgrywać istotną rolę w **adaptacji bakterii do warunków środowiskowych w instalacjach wodnych**.

Zaproponowane podejście może stanowić model do badania mikroewolucji patogenów środowiskowych w funkcji czasu i służyć jako wsparcie w monitoringu zagrożeń sanitarnych.