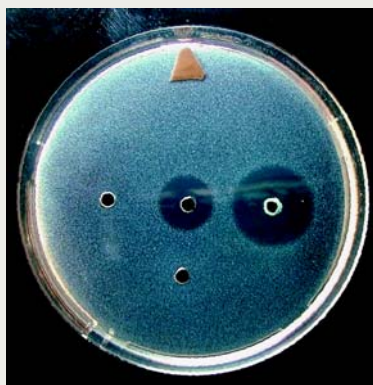


Probiotika i akvakultur – kan gode bakterier bekæmpe dårlige?

Fisk er i stigende grad blevet husdyr, der opdrættes i dambrug. Sygdomme hos fisk kan forebygges ved at tilsætte probiotiske bakteriekulturer til vandet, men probiotika skal udvælges, så de passer til både fisk og patogen

Af Lone Gram, Afdeling for Fiskeindustriel Forskning, Danmarks Fiskeriundersøgelser



Figur 1. Hæmning af vækst af bakterien *Vibrio anguillarum*, der giver sygdommen vibriose hos fisk. *V. anguillarum* er indstøbt i en næringsholdig agar, og bakterier (probiotika) isoleret fra fiskens overflade er anbragt i brønde i agaren. De klare zoner viser områder, hvor *V. anguillarum* ikke har kunnet vokse.

Fisk er blevet husdyr, der opdrættes og holdes i fersk- eller havvandsanlæg. I dag kommer ca. 1/3 af de fisk, vi spiser fra opdræt. Fiskeopdrætssektoren er i vækst, især i Sydøstasien, og samtidig er mængden af fisk fanget fra vilde bestande stagnere de sidste 10 år.

Fisk kan i lighed med alle andre organismer blive syge og rammes af bakterie-, virus- og parasitinfektioner. Som hos andre husdyr og dyrkede planter giver det store problemer, og fiskeopdrættere kæmper på samme måde som landmænd og gartnere for at kontrollere de mange forskellige sygdomme.

Bakteriesygdomme har været bekæmpet med antibiotika, men er i stigende grad bragt under kontrol vha. vaccinationsprogrammer. Man er i alle led af kæden fra »hav-til-mav« interesseret i at nedbringe brugen af antibiotika.

Antibiotika, der bruges i opdræt og husdyrbrug, kan spredes i miljøet. Derved kan nogle af de bakterier, der findes på fisken og i vandet, blive resistente over for antibiotika. Efterfølgende kan antibiotikaresistens overføres til andre bakterier. Hvis fisken efterfølgende bliver inficeret med en resistent bakterie,

kan sygdommen ikke behandles, hvilket har betydelige økonomiske konsekvenser for dambrugsejeren.

Antibiotikaresistens kan få meget alvorlige konsekvenser, hvis den overføres til bakterier, der kan forårsage sygdom hos mennesker. Det kan betyde, at et normalt ukompliceret sygdomsforløb hos mennesker pludselig ikke kan behandles.

Kan fiskens naturlige mikroflora bruges?

Fisken er et koldblodet dyr, der gennemgår mange udviklingstrin: Fra æg til små larver, der fodres med levende foder (små hjuldyr og skaldyr), til yngel og endelig til voksne fisk. Fiskens immunsystem er i de tidlige stadier meget dårligt udviklet. Vaccination kræver, at et immunforsvar kan stimuleres og »huske« til senere forsvar. Det er derfor svært at vaccinere larver og meget små fisk, og især i disse stadier interesserer man sig derfor for andre sygdomsforebyggende strategier.

Alle organismer, mennesker, dyr, planter - og fisk - har en naturlig mikroflora. Disse bakterier og andre mikroorganismer findes på hud, skind og i tarmsystemet og lever med os i »fredelig sameksistens«. Inden for mange områder har man længe haft den teori, at en del af disse mikroorganismer er til gavn - at de hjælper med at holde sygdomsfremkaldende mikroorganismer væk.

Inden for plantesektoren, dyrehold og til menneskebrug har man i adskillige år eksperimenteret med bakteriekulturer, der skulle gavne helbredstilstanden og forebygge sygdom. Sådanne levende bakteriekulturer, der forventes at øge modstanddygtigheden mod sygdom, kaldes probiotika [1].

Ved Danmarks Fiskeriundersøgelser har vi i en årrække arbejdet på projekter, hvor det vurderes, om sygdomme hos fisk kan forebygges ved at tilsætte levende ikke-sygdomsfremkaldende bakteriekulturer til vandet. Vi vælger de formodentlig gavnlige bakterier fra fiskens egen mikroflora, og nogle af dis-

Figur 2.

a) Marin agarplade hvor prøve fra pighvaropdræt er udsået. Udvoksede bakteriekolonier ses som hvide pletter. b) Replika-plade af a) overført til næringssubstrat med *Vibrio anguillarum*. Bakteriekolonier, der hæmmer vækst, giver opklaringszoner i agaren, der er turbid pga. vækst af den fiskepatogene bakterie [4].





Figur 3. Fisk syge af vibriose. *Vibrio anguillarum* inficerer ca. 80 forskellige marine fiskearter og giver sårddannelser og blodinfektion.

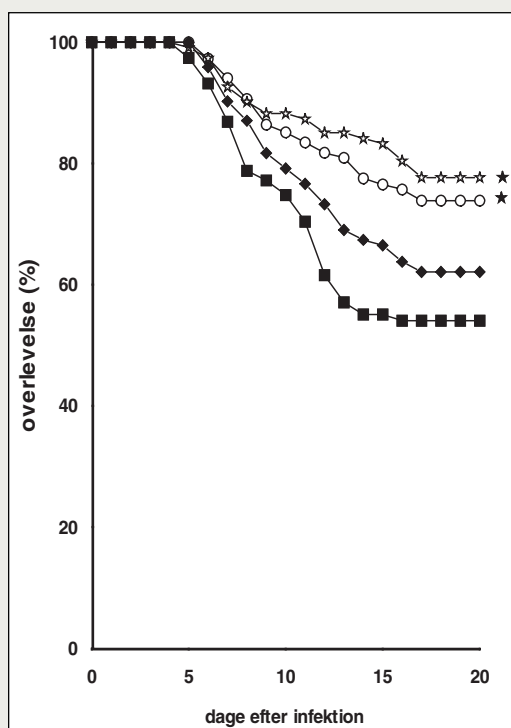
Foto:
H. Slierendrecht,
BioMar A/S.

se har i laboratorieforsøg vist sig at kunne hæmme vækst af de bakterier, der forårsager sygdom hos fisk. Ved at forebygge sygdom kan brugen af antibiotika til sygdomsbekæmpelse mindskes og risikoen for udvikling af antibiotikaresistens reduceres.

Probiotika til fisk?

Levende kulturer af mikroorganismer, der kan gavne helbredet hos værten, kaldes for probiotiske (pro = for; bios = liv) kulturer. Til varmblodede dyr og mennesker har man typisk brugt mælkesyrebakterier, der indtages med kosten for at stabilisere tarmfloraen. I begyndelsen af 1900-tallet observerede den russisk fødte professor Ilja Iljitsh Mechnikov (<http://www.nobel.se/medicine/laureates/1908/mechnikov-bio.html>), at nogle befolkningsgrupper i Bulgarien levede væsentlig længere end andre. Hans undersøgelser ledte til den konklusion, at det var indtagelsen af kefir - og med den levende kulturer af mælkesyrebakterier - der var årsag til den forbedrede sundhedstilstand.

Hos fisk er det ikke kun tarmkanalen, der er vigtig for inficerende - og gavnlige - bakterier. Fisken svømmer i vand, der meget nemt kan overføre bakterier, og dens skindside og gæller er konstant eksponeret for de mikroorganismer, der er i vandet. Derfor kan det være lige så vigtig at beskytte skindside hos fisk som tarmkanalen. Der er således flere eksempler på, at probiotika i akvakultur har virket ved, at de gavnlige bakteriekulturer bliver tilsat det vand, fisken svømmer i.



Figur 4. Overlevelse af regnbueørred efter smitte med den fiskepatogene bakterie, *Vibrio anguillarum*. De probiotiske kulturer blev tilsat under og efter infektion. *Pseudomonas*-stammerne A76 (♦), E156 (M), E142 (O) og AH2 (M) blev undersøgt for probiotisk effekt. (□) er kontrolkødet. v markerer bakteriekulturer, der har givet så markant en øget overlevelse, at det er statistisk signifikant ($P < 0.05$) [7].

Hvordan vælges fiskeprobiotika?

Man ved ikke præcis hvilke egenskaber, der er vigtige, for at en bakterie kan virke som probiotika. Den må naturligvis ikke kunne forårsage sygdom hos hverken fisk eller mennesker. Men, er det f.eks. vigtigt, at den kan sætte sig fast på fiskeceller - eller er det nok, at den svømmer rundt i vandet? Hvis den skal virke i tarmsystemet, er det formodentlig vigtigt, at den kan overleve galdesalte og mavens lave pH-værdi. Det er muligvis vigtigt at vælge en bakterie, der »passer til« sit virkningssted - altså enten adapteret til skind, gæller eller tarmsystem [2,3].

Da probiotiske bakteriekulturer skal bekæmpe patogene bakterier, har man, meget naturligt, ledet efter bakterier, der kan hæmme væksten af patogene bakterier. Bakterierne undersøges indledningsvis i petriskåle, hvor den patogene bakterie støbes ind i en næringsrig agar, og den potentielle probiotiske bakterie placeres i afmærkede områder. Efter inkubering kan opklaringszoner vise, om den patogene bakterie er blevet hæmmet (figur 1). Normalt finder man, at kun 1-4% af de bakterier, der er isolerede fra f.eks. fisk, kan hæmme fiskepatogene bakterier [4,5]. Det kan derfor være meget tidskrævende at finde og udvælge de rigtige bakterier. Selv om 1-4% ikke lyder af meget, kan det dreje sig om millioner af bakterier - og det kan være rigeligt til at holde de sygdomsfremkaldende bakterier i skak. Vi har for nylig undersøgt prøver fra en pighvaropdrætter i Spanien - her har vi sæt prøver ud på næringsagar, og efter bakteriernes fremvækst har vi vha. af et filterpapir overført et aftryk af bakterierne til en ny agarplade med fiskepatogene bakterier. Efter endnu en inkubering kan vi - uden at behøve at isolere alle bakterierne - se hvilke, der hæmmer de fiskepatogene bakterier. Vi kan nu målrettet isolere dem, der har potentiale (figur 2).

Virker det?

Vi har i samarbejde med BioMar A/S udført forsøg [5,6], hvor ørreder under kontrollerede betingelser inficeres med bakterien *Vibrio anguillarum*, der giver sygdommen vibriose (figur 3). Efterfølgende behandles nogle af fiskene med probiotiske bakterier; i dette tilfælde *Pseudomonas*-bakterier, der flere gange dagligt tilsættes tank-vandet. I figur 4 ses et infektionsforløb, hvor 5 bakteriestammer er blevet testet i model-infektionssystemet. Det viste sig, at de fleste af de tilsatte »gavnlige« bakterier forbedrer overlevelsen, og at især 2 bakteriestammer var meget virksomme. Af hensyn til dyrevelfærden er det naturligvis vigtigt at begrænse disse forsøg mest muligt - omvendt er de nødvendige i enhver afprøvning af sygdomsforebyggende foranstaltninger.

Hvordan virker det?

De *Pseudomonas*-bakterier, der i ørredforsøg har været sygdomsreducerende, danner nogle stoffer, såkaldte siderophorer, der kelerer jern. Jern er central for bakterier (og mange andre), men er sjældent let tilgængeligt. Fe (III) er oxiderende og er i høj koncentration ødelæggende for levende væv. Derfor findes jern i komplekse forbindelser, og bakterier har udviklet en højt specialiseret strategi for at få fat på det nødvendige næringsstof. En af pseudomonaernes siderophorer ses i figur 5 [8]. Vi har også vist [9], at *Vibrio anguillarum* udtrykker gener, der induceres af jern-sult, når den udsættes for den probiotiske bakterie.

Andre probiotiske bakterier virker på andre måder. F.eks. arbejder vi i øjeblikket med en marin, fototrof bakterie: *Roseobacter*, der er isoleret fra pighvaropdræt [4]. Denne bakterie danner et extracellulært stof, der dræber fiskelarve-patogene bakterier. Stoffet er lavmolekylært og kan ikke ekstraheres i ethylacetat eller chloroform - men vi ved endnu ikke, hvad det

er. Sådant viden er meget vigtig i forbindelse med brugen af probiotiske bakterier - de skulle nemlig bare være små antibiotika-producerende enheder - det vil ikke løse problemerne med antibiotikaresistens.

Praktisk anvendelse af probiotika i akvakultur

Fiskeprobiotika undersøges mange steder i verden, og forskningsgrupper i Norge, Frankrig, Skotland, Australien og Danmark forsøger at udvikle princippet [10]. Praktisk anvendelse af probiotika finder i dag bl.a. sted i rejseindustrien i Sydøstasien, hvor filippinske opdræt har været ramt af resistente sygdomsfremkaldende bakterier. Det har medført økonomisk krise og kollaps af produktionen i flere områder, men tilsætning af probiotiske *Bacillus*-kulturer til vandet har vist sig effektivt at kunne forebygge bakteriesygdom.

Dvs. princippet fungerer »i det virkelige liv«. Men, det bliver ikke den magiske »golden bullet«, der løser alle problemer. Probiotika til fisk skal udvælges, så det passer til både fisk og patogen.

Forfatteren vil gerne takke en lang række medarbejdere og kolleger for samarbejde. Det drejer sig om Bettina Spanggaard, Jette Melchiorson, Janne Nielsen og Mette Hjelm (nuværende og tidligere ansatte) ved DFU; Ingrid Huber, Kim Holmstrøm og Lone Rossen fra Bioteknologisk Institut; Torben Nielsen og Helma Slierendrecht fra BioMar A/S; Uffe Anthoni, Per H. Nielsen og Carsten Christophersen fra Kemisk Lab II, KU samt Ana Rianza fra Stolt SeaFarms i Santiago, Spanien.

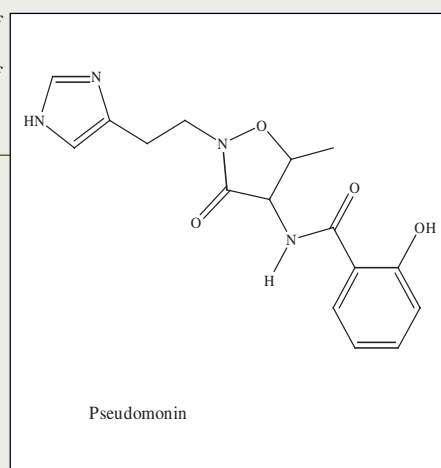
E-mail-adresse:

Lone Gram: gram@dfu.min.dk

Referencer:

1. FAO/WHO 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization expert consultation report. FAO, Rome, Italy.
2. Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K.F. and Gram, L. (1999) The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* **182**:1-15.
3. Huber, I., B. Spanggaard, J. Nielsen, K.F. Appel, T.F. Nielsen and L. Gram 2003. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the

Figur 5. Struktur af siderophor (jernbærer) produceret af *Pseudomonas fluorescens*-stamme AH2 [8].



intestinal microbial community of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* (accepted)

4. Hjelm, M., Ø. Bergh, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, A. Rianza, P. Ahrens, H. Birkbeck and L. Gram 2003. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology* (accepted)
5. Spanggaard, B., I. Huber, J. Nielsen, E.B. Sick, C. B. Pipper, T. Martinussen, W.J. Slierendrecht and L. Gram 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* **3**:755-765
6. Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I. and Nielsen T. (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by a siderophore producing *Pseudomonas fluorescens* - a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:969-973.
7. Spanggaard, B. og L. Gram 2001. Fiskeprobiotika. *Fisk og Hav* **52**:44-48
8. Anthoni, U., C. Christophersen, P.H. Nielsen, L. Gram and B.O. Petersen 1995. Pseudomonine, an isoxazole with siderophoric activity from *Pseudomonas fluorescens*, AH2 isolated from Lake Victorian Nile perch. *Journal of Natural Products* **58**:1786-1789
9. Holmstrøm, K. and L. Gram 2003. Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to *Pseudomonas fluorescens* AH2-supernatant exposure using RNA-arbitrarily primed PCR. *Journal of Bacteriology* **185**:831-842.
10. Gram, L. and E. Ringø 2003. Prospects of fish probiotics. In: Holzapfel, W. and P. Naughton (eds) *Microbial ecology of the growing animal*. Elsevier. (in press)

Nyt om...

...fyrretræer og UV-lys

Pertti Hari, der er ansat ved Helsinki Universitet, har meddelt, at fyrretræer afgiver nitrogenoxider, når træerne udsættes for ultraviolet lys.

På bjerge er der meget UV-lys, og han skriver, at der i bjergskove kan være så meget nitrogenoxid, at emissionen påvirker det globale nitrogenoxidregnskab. Mængderne er så store, at de er sammenlignelige med mængderne fra trafik og industri.

Bos

2003: UV triggers NO_x emissions from pine trees. *Chemical & Engineering News*. 17. marts: 32

On-line Spektrometri

... med ATR sensor – se kemien reagere!

SPECTRA-PROBE
REAL TIME ANALYSIS

Procesinstrument til overvågning og kontrol af f.eks.:
Krystallisation • Fermentering
Destillation • Reaktionsforløb

Kompakt bærbart instrument
velegnet til bl.a.:

- Kvalitetskontrol af råvarer
- QA afdelinger

CONTECH Instrumentering ApS · Hans Edvard Teglers Vej 5
DK-2920 Charlottenlund · Tlf. +45 39 903 905 · Fax +45 39 903 915
Homepage: www.contech.dk · e-mail: contech@contech.dk