



Roseobacter

En stjerne blandt bakterier

Bruhn, Jesper Bartholin; Gram, Lone

Published in:
Fisk og hav

Publication date:
2005

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Bruhn, J. B., & Gram, L. (2005). Roseobacter: En stjerne blandt bakterier. *Fisk og hav*, (59), 46-53.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Roseobacter: En stjerne blandt bakterier

JESPER BARTHOLIN
BRUHN
(jbb@dfu.min.dk)

LONE GRAM
(gram@dfu.min.dk)

.....
**Danmarks
Fiskeriundersøgelser**
Afdeling for Fiskeindu-
striel Forskning

Bakterieinfektioner er et problem i moderne akvakultur og er en begrænsende faktor for udvidelse af produktionen. Bakterieinfektioner kan bekæmpes med antibiotika, men for ikke at udbrede resistens mod antibiotika ønsker man at minimere dette forbrug. Andre metoder må derfor udvikles, og her er anvendelse af probiotiske bakterier en mulighed. Probiotiske bakterier er bakterier der gavner værtsens helbred – i dette tilfælde mindsker de bakterieinfektion hos fiskelarver. En marin bakterie, *Roseobacter*, har vist sig at være en oplagt kandidat. *Roseobacter* er blevet fundet i en pighvar-produktion i Spanien og hæmmer under nogle helt særlige forhold væksten af bakterier der fremkalder sygdom hos fisk.

.....
Fisk har traditionelt været fanget i havet, men gennem de seneste 10 år er en stadig stigende andel af de fisk vi spiser blevet produceret i akvakultur. Denne produktionsform leverer i dag ca. 30% af fisk til human konsum. Produktionen af fisk i akvakultur vil formodentligt stige yderligere de kommende år og omfatte stadig flere fiske- og skaldyrs-arter. Et af de problemer akvakultur kæmper med, er sygdom som skal kunne kontrolleres hvis vi ønsker at udviklingen skal forsætte.

Produktionen af fisk i akvakultur er meget intens, og fiskene går meget tæt. Dette betyder at hvis sygdomme bliver introduceret i produktionen, kan de spredes hurtigt i produktionsanlæggene fordi fiskene nemt smitter hinanden. Sygdomme medfører store økonomiske tab for producenterne og der forskes derfor i at forebygge dem.

Antibiotika har været og bliver stadig anvendt til at kurere og nogle gange forbygge bakteriesygdomme. Sådan behandling kan have negative konsekvenser hvis de fiskepa-

togene bakterier (bakterier som fremkalder sygdom hos fisk) udvikler resistens over for de anvendte stoffer. Udviklingen af resistens vil medføre at behandlingen med et givet antibiotikum ikke længere virker.

Desuden kan resistens udviklet i de fiskepatogene bakterier måske spredes til humane patogene bakterier. Dette vil medføre at vores muligheder for at behandle infektioner hos mennesker bliver forringet. Anvendelsen af antibiotika skal derfor minimeres, og andre metoder til at forhindre bakteriesygdomme må udvikles og anvendes.

At vaccinere fiskene har vist sig som et godt alternativ til anvendelse af antibiotika. Ligesom vacciner anvendes i stor udstrækning til mennesker for at forhindre sygdomme, kan de også anvendes til at forhindre sygdomme hos fisk i akvakultur.

For at behandlingen med en vaccine skal virke skal fisken have et udviklet immunforsvar, da vacciner "koder" immunforsvaret til at bekæmpe sygdomme. Dette gør at vac-

FOTO: JESPER BARTHOLIN BRUHN



Figur 1

STOLT SEA FARM

Stolt Sea Farm producerer pighvar i akvakultur. Produktionen går fra klækning af æg til den udvoksede pighvar. Her ses en af Stolt Sea Farms produktionsanlæg langs den Galliciske kyst i Spanien.

ciner er vanskelige at anvende på fiskelarver, da disse ikke har udviklet et immunforsvar. Derfor er det også på larvestadiet at alternative metoder til antibiotikabehandling er mest ønsket. En af de alternative metoder der forskes i, er anvendelse af probiotiske bakterier.

Hvad er en probiotisk bakterie?

Nogle bakterier kan forbedre sundheden og forbygge sygdomme hos mennesker og dyr når de "tilsættes" i levende form. Sådanne bakterier der gavner helbredet hos en vært, kaldes probiotiske (pro = for; biotisk = liv) bakterier.

Probiotiske bakterier kan blandt andet findes i syrnede mælkeprodukter, som kan afhjælpe maveonde. Dette skyldes at de mælkesyrebakterier der syrner mælken, kan hæmme de bakterier der giver tarmsystemet problemer. Når vi indtager syrnede mælkeprodukter, vil vi tilføre vores tarmsystem disse gavnlige bakterier, der så kan forhindre uønskede bakterier i at etablere sig og forvolde mave-tarminfektion.

Der forskes i dag intenst i om dette princip, hvor man tilfører "gode" bakterier til at be-

kæmpe "onde" bakterier, kan anvendes til at forhindre bakteriesygdomme i akvakultur og andre intensive produktioner. Resultaterne ser lovende ud, og der er flere steder blevet isoleret - dvs. fundet - bakterier der kan forhindre bakteriesygdomme hos fisk. Arter af bakterien *Bacillus* kan f.eks. begrænse udbredelsen af *Vibrio*-infektioner under produktionen af kæmperejer.

Isolering af probiotiske bakterier

Hvis man ønsker at anvende en probiotisk bakterie i en akvakulturproduktion, er det en god ide at overveje dens oprindelse. Det kan være en fordel hvis bakterien kan isoleres fra selve produktionsstedet, da man så ikke senere tilfører bakterier fra andre miljøer. Det første sted man begynder at lede efter probiotiske kulturer, kan derfor være den produktion hvor man ønsker at anvende den.

Med sine 2.500 tons om året er Stolt Sea Farm (Figur 1) i Galicien (Spanien) en af verdens største producenter af pighvar (*Scophthalmus maximus*) i akvakultur. Pighvar er en meget yndet spise i den varme del af Europa, men en meget dyr spisefisk, og der er derfor økonomi i at producere pighvar.

Figur 2

DE FØRSTE PRØVER

Man udvælger probiotiske bakteriekulturer ved at teste om de kan hæmme uønskede bakterier f.eks. *Vibrio anguillarum*. På billedet ses en agarplade med *Vibrio* indstøbt. De klare zoner omkring nogle af bakteriekolonierne (de hvide pletter) skyldes at *Vibrio* er blevet hæmmet i sin vækst.



FOTO: METTE HJELM

Selve opdrættet går fra klækning af æg, over fiskeyngel frem til den helt udvoksede pighvar. Det er en meget avanceret produktion da pighvarlarverne kun kan spise levende føde. Denne føde består først af små hjuldyr (*Brachionus plicatilis*) og siden hen af små krebsdyr (*Artemia*). Denne føde lever af alger, og alle led i denne fødekæde produceres på Stolt Sea Farm. Når fiskene når en vis størrelse, kan de fodres med tørfoder.

Produktionen har på fiskeyngelstadiet store problemer med bakterieinfektioner, især i det stadium hvor larverne går fra at føde på hjuldyr til krebsdyr. Problemerne skyldes primært infektioner med *Vibrio*-arter. Udbrud af vibriose medfører at hele batch af fiskeyngel til tider dør. For at opnå en mere stabil produktion skal der derfor findes metoder til at undgå infektioner med fiskepatogene bakterier.

For at undersøge om der på produktionsstedet kunne isoleres (dvs. findes) probioti-

ske bakterier, tog vi prøver forskellige steder, blandt andet fra tankene med fiskeynglen. Prøverne blev undersøgt for forekomsten af bakterier ved at udså dem på agarplader. De bakterier der var tilstede i prøven, voksede op og dannede kolonier på agarpladen. Bakteriekolonierne blev derefter kopieret vha. et filterpapir over på en agarplade hvori den fiskepatogene *Vibrio anguillarum* var indstøbt. De bakterier der hæmmede *Vibrio anguillarum*, blev så isoleret ved at kigge efter klaringszone omkring bakteriekolonien efter en dags inkubation (Figur 2).

Bakterier der kunne hæmme *Vibrio anguillarum*, blev isoleret og yderligere undersøgt for deres evne til at hæmme andre fiskepatogene bakterier. De bakteriekulturer der vedblivende kunne hæmme fiskepatogene bakterier, blev efterfølgende undersøgt for om de kunne skade fiskelarverne.

Den probiotiske Roseobacter-bakter

Vi fandt hovedsagelig én bakterie med

probiotiske egenskaber. Den kaldes *Roseobacter* og viste sig at kunne hæmme væksten af både *Vibrio splendidus* og *Vibrio anguillarum* samt en lang række af andre bakterier. Yderligere viste det sig at *Roseobacter* ikke i sig selv inficerede fiskeyngel.

Roseobacter og lignende bakterier er en vigtig del af det marine miljø. Disse bakterier udgør op til 40% af de bakterier der isoleres fra vores oceaner. *Roseobacter* forekommer ofte i forbindelse med forekomsten af alger. *Roseobacter* og alger påvirker hinandens metabolisme, især i forhold til omsætningen af svovl i oceanerne. Alger producerer store mængder af det svovlholdige stof dimethylsulfoniopropionate (DMSP), og dette stof nedbrydes af *Roseobacter* til dimethyl-sulfid (DMS), som går op i atmosfæren. Det har været forslået at dannelsen af DMS i oceanerne vil påvirke de klimaforandringer der menes at komme.

De fleste *Roseobacter*-isolater der blev isoleret fra Stolt Sea Farm, kom oprindeligt fra overflader på produktionsstedet. For at undersøge om *Roseobacter* blev konstant tilført produktionen eller om den sad fast på overflader under produktionen, isolerede vi bakterier med probiotiske egenskaber over en et-års periode.

Roseobacter blev fundet gennem hele tidsperioden og den blev igen hovedsagligt isoleret fra tankvægge. For at være sikker på at det var den samme stamme af *Roseobacter* der blev fundet hver gang, undersøgte vi alle de isolerede bakterier med en DNA-typningsmetode.

Resultaterne viste at det var den samme stamme af *Roseobacter* der blev fundet gennem hele perioden, og som havde koloniseret produktionsanlægget.

Kan *Roseobacter* forbedre overlevelsen af fiskelarver?

Før en probiotisk bakterie anvendes i praksis, skal det undersøges om dens tilstedeværelse rent faktisk kan forbedre overlevelsen af pighvarlarver.

I samarbejde med forskere fra Havforskningsinstituttet i Bergen udsatte vi derfor pighvarlarver for forskellige koncentrationer af *Roseobacter*. Antallet af døde larver blev talt over en 5-dages periode, og i Figur 3 er den akkumulerede dødelighed opgjort.

Fiskelarver hvor *Roseobacter* ikke blev tilsat (kontrolgrupperne), havde en højere akkumuleret dødelighed i 2 ud af 3 forsøg sammenlignet med grupper af larver hvor *Roseobacter* var tilsat.

Resultaterne indikerer at *Roseobacter* kan forbedre overlevelsen af fiskelarver. For at se om denne effekt kan forbedres skal *Roseobacters* evne til at hæmme de fiskepatogene bakterier undersøges yderligere.

Hvornår og hvordan virker *Roseobacter*?

Før en bakterie med probiotiske egenskaber anvendes i en akvakulturproduktion, er det vigtigt at undersøge under hvilke forhold de ønskede hæmmende egenskaber bliver udtrykt.

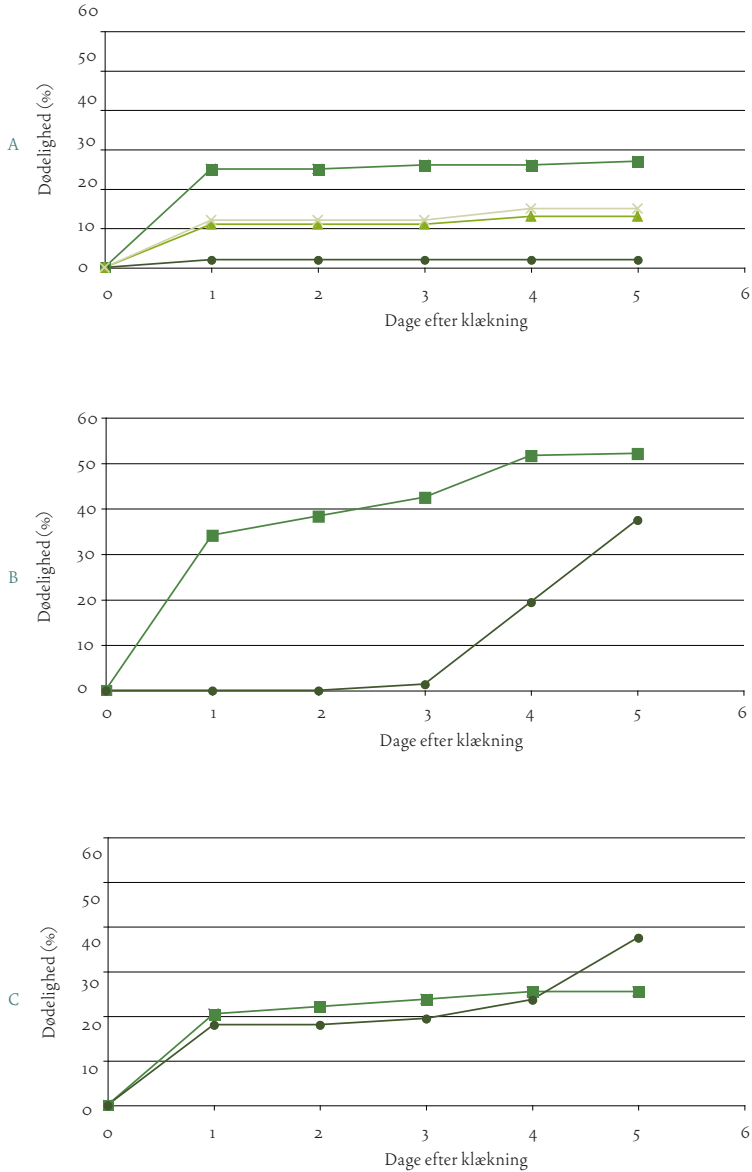
Når en bakterie hæmmer en anden, kan det skyldes mange forskellige faktorer. Det kan være konkurrence om den tilgængelige næring, eller det kunne være at den probiotiske bakterie producerede et eller flere stoffer som aktivt hæmmede eller dræbte uønskede bakterier.

For at undersøge disse ting tilsatte vi *Vibrio anguillarum* til henholdsvis en kultur af *Ro-*

Figur 3

GAVNLIG EFFEKT PÅ
PIGHVAR-LARVER

Dødeligheden af pig-hvar-larver mindskes ved tilsætning af Roseobacter. Den probiotiske Roseobacter er tilsat i forskellige koncentrationer (●, 10^7 cfu per ml; ▲, 10^5 cfu per ml; ×, 10^3 cfu per ml) og sammenlignet med en kontrol (■) der ikke har fået Roseobacter. Forsøg A, B og C er tre uafhængige forsøg (Fra Hjelm et al. 2004).



FRA HJELM ET AL., 2004

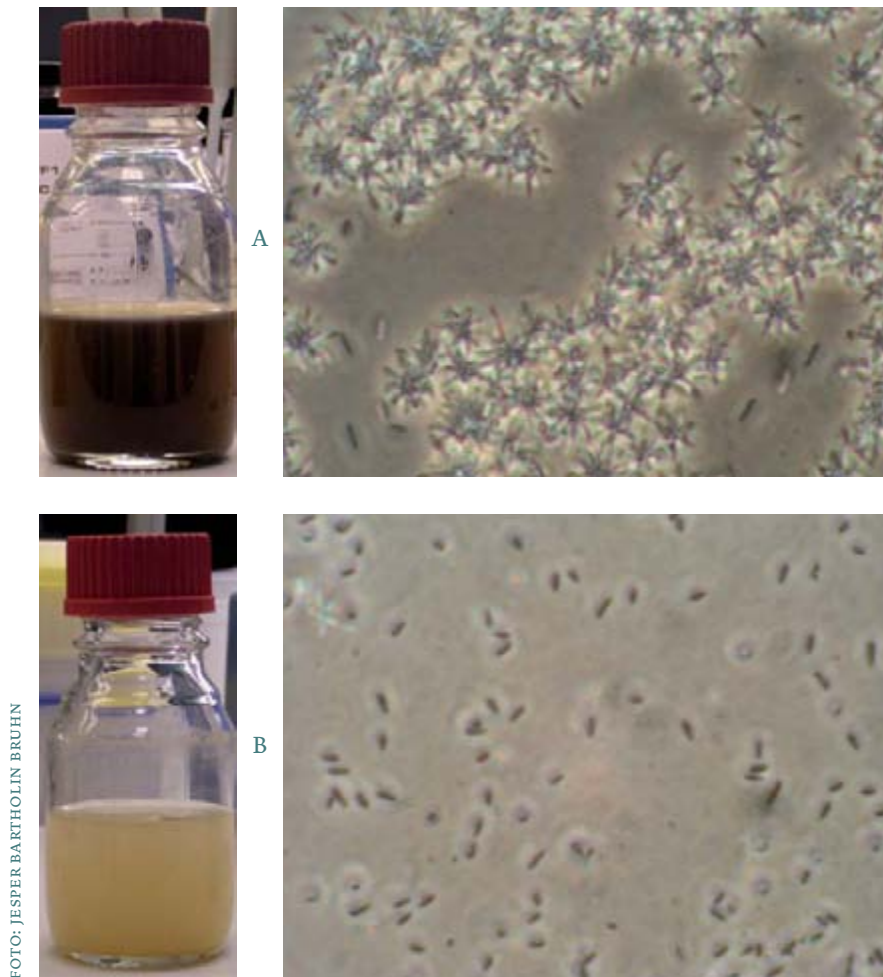


FOTO: JESPER BARTHOLIN BRUHN

Figur 4

MÅ IKKE OMRYSTES

Vækst af *Roseobacter* under statiske og rystede forhold. A: Vækst under statiske forhold giver dannelse af et brunt pigment og et antibakterielt stof bliver produceret. Yderligere ses at bakterien vokser i en stjerneform der sætter sig sammen. B: Vækst under omrystning giver ikke produktion af antibakterielle stoffer eller brunt pigment, og bakterien vokser som enkelte celler. For at undersøge under hvilke forhold *Roseobacter* producerede det antibakterielle stof behøvede vi altså blot at se efter om vores *Roseobacter*-kultur blev brun.

seobacter og et sterilfiltrat (en *Roseobacter*-kultur hvor bakteriecellerne er fjernet). Både selve *Roseobacter*-kulturen og sterilfiltratet hæmmede *Vibrio anguillarum* i samme udstrækning. Der er derfor sandsynligt at *Roseobacter*'s evne til at hæmme *Vibrio anguillarum* skyldes at den producerer stoffer der hæmmer eller dræber *Vibrio anguillarum*.

Ved yderligere undersøgelser viste det sig at hæmningen af andre bakterier skyldes

et specifikt svovlholdigt antibakterielt stof. Når *Roseobacter* producerer dette antibakterielle stof, danner den samtidig et brunt pigment. For at undersøge under hvilke forhold *Roseobacter* producerede det antibakterielle stof kunne vi derfor blot vurdere om vores *Roseobacter*-kultur blev brun.

Det viste sig hurtigt at omrystning havde en stor påvirkning på produktionen af det antibakterielle stof. Figur 4 viser *Roseobac-*

Figur 5
STJERNEBILLEDER

I elektronmikroskop kan man tydeligt se den stjernelignende struktur af *Roseobacter* efter vækst under statiske forhold. Det ses at strukturen består af ca. 9 *Roseobacter*-celler.

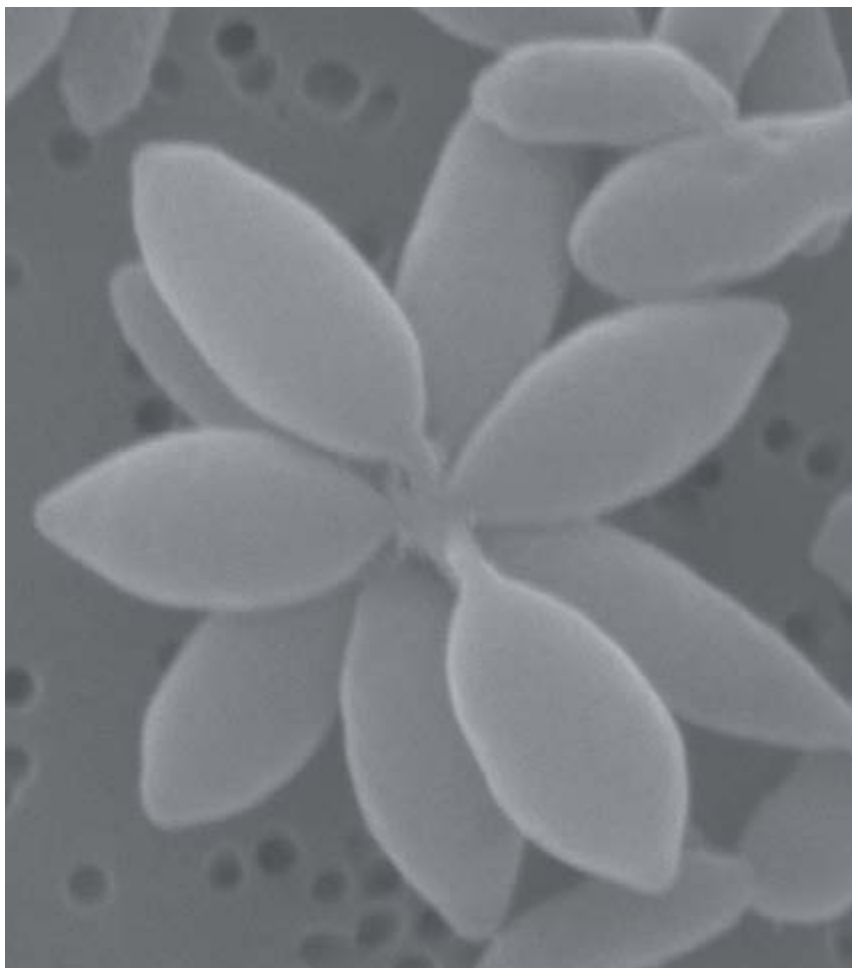


FOTO: MICHAEL HANSEN OG JOSÉ BRESCIANI

ter vokset op med og uden omrystning, og det ses tydeligt at kun i kulturen der ikke er blevet omrystet (Figur 4A), er der dannet pigment, og det var også kun i denne kultur vi fandt produktion af det antibakterielle stof.

Når *Roseobacter* ikke blev omrystet, delte bakteriecellerne sig ikke som enkelte celler, men som små stjerner. Disse stjerner klæbede sig til hinanden, hvilket resulterede i en tyk hinde af bakterier (en biofilm) på

overfladen af dyrkningsvæsken (Figur 4A). Til sammenligning kan det ses at der ikke er stjerner i en rystet kultur, og bakteriecellerne ligger enkeltvis (Figur 4B).

Med et elektronmikroskop kan man forstørre cellerne yderligere, og hvis man kigger på stjernedannelsen hos *Roseobacter*, kan man i figur 5 se at der er ca. 9 celler der ligger sammen og danner en 3-dimensionel stjerne. På nuværende tidspunkt ved vi ikke om denne stjernedannelse påvirker dannel-

sen af det antibakterielle stof, men vi ved at under de forhold hvor bakterien danner stjerner producerer den sit antibakterielle stof.

Praktisk anvendelse

Roseobacter har vist sig som en oplagt probiotisk bakterie i pighvarlarvekulturer. Det har dog ligeledes vist sig at vækstforholdene påvirker den meget, og at den kun under særlige forhold producerer det antibakterielle stof som virker hæmmende på de fiskepatogene bakterier. Der er derfor vigtigt at undersøge om man kan etablere *Roseobacter* under ikke-rystede forhold i selve produktionen. *Roseobacter* havde hovedsagligt etableret sig på overflader på produktionsstedet. Denne viden kan udnyttes ved at tilsætte *Roseobacter*-bakterier

til tankvægge de steder i produktionen hvor bakterieinfektioner er et problem. Man kunne herigennem forsøge at få den etableret og danne biofilm på disse overflader. En etablering af bakterien ville måske kunne forhindre eller mindske infektioner med fiskepatogene bakterier. Da Stolt Sea Farm er en meget stor produktion, ville dette kræve at der blev produceret store mængder af *Roseobacter*-bakterien.

Vi har til dato ikke undersøgt hvordan store mængder af denne bakterie kan produceres og stabiliseres, og om det kan lade sig gøre at tilføre tankoverflader *Roseobacter* i tilstrækkelige mængder til at forhindre fiske sygdomme. Nogle af disse forhold vil blive undersøgt i den sidste del af Jespers ph.d.-studium.

Projektet har i perioden 1. januar-2000 til 31. maj-2003 været en del af et større EU- projekt (PROBE) koordineret af University of Glasgow. Fra 1. januar 2004 har projektet været en del af Jesper Bartholin Bruhns ph.d.-studium, der er en del af forskerskolen SCOFDA, under FISHNET.

LITTERATUR

Bruhn, J. B., Nielsen F. N., Hjelm H., Hansen M., Bresciani J., Schulz S. og Gram L. 2005. Ecology, inhibitory activity and morphogenesis of a marine antaognistic bacteria belonging to the *Roseobacter* clade. Accepteret til trykning i *Applied and Environmental Microbiology*.

Hjelm, M., Bergh, Ø., Nielsen, J., Melchiorsen, J., Jensen, S., Duncan, H., Riaza, A., Ahrens, P., Birkbeck H. og Gram L. 2004. Selection and identification of autochthonous Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 360-371.

Schmidt A. S. og Bruun M. S. 2001. Antibiotikaresistens hos bakterier fra danske ferskvandsdambrug. *Fisk og Hav* nr 52 p 36-43.

Spanggaard B. og Gram L. 2001. Probiotika i akvakultur -en strategi til forebyggelse af fisesygdom. *Fisk og Hav* nr 52 p 44-48.
