

Projektbeskrivelse

Undersøgelse af *Enterococcus faecium* og *Bifidobacterium longum*s evne til at bekæmpe *Escherichia coli*

I dag anvendes der store mængder antibiotika til både behandling af mennesker og i fødevarereproduktionen, hvor der især anvendes store mængder inden for svineproduktionen. Anvendelsen af antibiotika inden for svineproduktionen har tidligere været i mediernes søgelys, da den primære årsag ved anvendelsen af dette er at optimere produktionen og få leveret så billigt svinekød som muligt. Dette sker uden at tage hensyn til nogle ubehagelige følgevirkninger, hvor bakterierne udvikler resistens over for antibiotika, som i værste fald kan spredes til mennesker hvilket medfører, at sundhedsvæsenet ikke kan kurere selv simple dagligdagssygdomme og infektioner, som bliver livsfarlige uden effektive antibiotika. (Statens Serum Institut, 2012) Derfor er det meget relevant at undersøge andre alternativer til antibiotika, eksempelvis probiotika. Probiotiske bakterier er eksempelvis mælkesyrebakterier, der menes at have en sundhedsfremmende effekt. I forhold til at kunne erstatte antibiotika med disse forskes der umiddelbart i de probiotiske bakteriers konkurrenceevne i forhold til patogene skadelige bakterier. Der ses på om de probiotiske bakterier enten helt udkonkurrerer eller blot begrænse væksten af de skadelige bakterier opnås en forebyggende effekt, hvorved behovet for antibiotika begrænses. (Kristoffersen, 2013)

Formålet med projektet

I dette projekt vil effekten af nogle enkelte nøje udvalgte probiotiske bakterier undersøges med henblik på at studere om de kan udkonkurrere skadelige patogene bakterier. Specifikt arbejdes der med de to probiotiske bakterier *E. faecium* og *B. longum*, samt den skadelige bakterie *E. coli*, der benyttes som modelorganisme for generelle patogene bakterier der findes i svinestalden. Formålet med undersøgelsen er at finde svar på om det er muligt at anvende probiotika inden for svineproduktion således forbruget af antibiotika kan nedbringes.

Baggrunden for projektet

Anvendelsen af probiotiske bakterier er ikke udbredt inden for svineproduktionen endnu, men i Holland har en enkelt landmand, Eric van den Heulen, haft stor succes med nedbringelse af antibiotikaforbruget ved at anvende probiotiske bakterier. Han vasker grisene og staldene i probiotiske bakterier og bruger nu kun 5 % af den tidligere mængde antibiotika og har en væsentlig lavere dødelighed blandt grisene. (Kristoffersen, 2013)

Dette viser at der muligvis er et stort potentiale for probiotika, men erhvervsorganisationen Landbrug og Fødevarer vil dog ikke anbefale anvendelse af probiotiske bakterier til danske landmænd da der mangler viden om deres effekt og der ikke er nogle dokumenterede resultater. (21Søndag, 2013)

Hypotese til forsøget

På baggrund af Erik van den Heulens opnåede resultater forventes det, at de probiotiske bakterier muligvis kan udkonkurrere eller i det mindste begrænse væksten af *E. coli*. Denne teori understøttes af det faktum af de probiotiske bakterier ligeledes producerer bakteriocin der hæmmer væksten af netop *E. coli* og andre patogene bakterier. (Kang & Lee, 2005)

Men *E. coli* er dog stadig en yderst konkurrencedygtig bakterie hvorfor det forventes at mængden af de probiotiske bakterier skal overskride mængden af *E. coli* adskillige gange, og de probiotiske bakterier skal eventuelt også have mulighed for at tilvænne sig miljøet inden de udsættes for *E. coli* for at de overhovedet vil kunne have en begrænsende effekt over for *E. coli*. (Madigan & Martinko, 2006, s. 353)

Metode til udførelse og analyse af forsøget

Under kontrollerede forsøg i en lille skala undersøges de probiotiske bakterier, *E. faecium* og *B. longum*s, effekt på væksten af den skadelige *E. coli*. Ved at regulere på forholdene mellem de tre bakterier, og forsøge at simulere nogle af forholdene i Eric van den Heulens stald undersøges det om de probiotiske bakterier under de rette forhold kan holde *E. coli* nede på et minimum, hvorved dens skadelige effekter undgås. Dette gøres i praksis ved at udføre flere forskellige forsøg på PCA-plader hvor der både laves dybdeudsæd og overfladepodning af bakterierne.

I praksis kan det være svært at se forskel på bakterierne ud fra deres morfologi så derfor udvikles og bekræftes en metode hvor der anvendes en pH-indikatorer til at skelne mellem bakterierne, da de probiotiske bakterier producerer sure metabolitter, mens *E. coli* over tid producerer en overvejende mængde af basiske metabolitter. Dette er i en række forsøg blevet anvendt som analysemetode til at vurdere hvilke bakterier der vokser bedst under de givne forhold. Den anvendte pH-

indikator, bromthymolblåt, er grøn ved pH mellem 6 og 8, mens den er gul ved lavere pH og blå ved højere. På nedenstående billede (illustration 1) kan det tydeligt ses hvordan metoden fungerer, idet billedet viser PCA-plader med bromthymolblåt hvorpå der er dyrket bakterier i dybdeudsæd. Til venstre er der dyrket *E. coli*, hvilket giver en blå farve på grund af at der dannes en overvejende mængde af basiske metabolitter over tid i forhold til sure metabolitter. I midten er det en kontrolplade, der har den grønne farve som alle tre plader startede med og til højre ses en plade hvorpå der er dyrket de to probiotiske bakterier, hvilket giver en gul farve eftersom disse kun kan danner sure metabolitter som følge af de ikke kan omsætte proteiner som *E. coli*.



Illustration 1: Viser farveudviklingen af PCA-mediet, tilført 0,24 g/L bromthymolblåt, efter 72 timers inkubation med bakterierne *E. coli* (venstre), *E. faecium* og *B. longum* (højre) samt kontrol (midt).

På baggrund af dette er det således muligt at se hvilke bakteriers metabolitter der dominerende på PCA-pladerne over tid, når der tages forbehold for at *E. coli* også i starten af vækstfasen og danner sure metabolitter, men efter 24-48 timer vil have dannet væsentlig flere basiske metabolitter. Der ses en video af farveudviklingen på linket:

http://www.youtube.com/watch?v=wu6IXe5CA_8&feature=youtu.be

Resultater

Af de opnåede resultater ses der en tydelig tendens til at de probiotiske bakterier har en hæmmende effekt på væksten af *E. coli*, forudsat mængden af de probiotiske bakterier er overvejende større end mængden af *E. coli*. Helt konkret ses det i tilfælde hvor mængden af *E. coli* og de probiotiske bakterier er tilstede i forholdet 1:100 og 1:200 at de probiotiske bakterier hæmmer væksten af *E. coli*, idet dens metabolitter ikke kommer til udtryk på enkelte af pladerne. Ligeledes ses det af resultaterne hvor de probiotiske bakterier har tilvænnet sig miljøet inden der tilsættes *E. coli*, at *E. coli* har væsentlig svære ved at vokse og komme til udtryk på vækstmediet end den under normale omstændigheder vil have.

Diskussion og konklusion

På baggrund af resultaterne ses der altså en tendens til at de probiotiske bakterier begrænser væksten af *E. coli*, og som følge af at *E. coli* netop er så konkurrencedygtig som den er, virker det rimeligt at antage at de probiotiske bakterier har et potentiale i forhold til at begrænse mængden af de generelle patogene bakterier i svinestalde. Dog kan det kun direkte konkluderes at de probiotiske bakterier har en hæmmende effekt under de undersøgte forhold. Det vil sige at de nødvendigvis ikke vil have samme effekt i stalden hvor andre faktorer der ikke har været undersøgt muligvis vil kunne ændre resultatet. Resultaterne er altså begrænset af dets skala. Ligeledes er det kun de to bakteriers metabolitter der analyseres ud fra, det vil sige at analysemetoden ikke giver et billede af hvad forholdet er mellem de to bakterier, men kun hvilken bakteries metabolitter der umiddelbart er dominerende i vækstmediet. Desuden vil det formentlig kræve endnu flere gentagelser og anden understøttende analyse for direkte at påvise de probiotiske bakteriers effekt mere endegyldigt, men der er dog påvist et vist potentiale i forhold til at de probiotiske bakterier tilsyneladende begrænser *E. coli*'s vækst.

Litteraturliste

21Søndag. (4. 14 2013). *Youtube*. Hentet fra http://www.youtube.com/watch?v=cihZCKK_A4o

Abas, S., & Abead, A. (2012). *Iraq academic Scientific Journals*. Hentet fra www.iasj.net: <http://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&ald=55271>

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & et al. (2002). *Biochemistry, 5. udgave*. New York: W. H. Freeman and Company, by Lubert Stryer.

Kang, J. H., & Lee, M. S. (2005). *US National Liberty of Medicine, National Institutes of Health*. Hentet fra www.ncbi.nlm.nih.gov: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836487>

Kolmos, H. J. (16. August 2012). *Videnskab*. Hentet fra [Videnskab.dk](http://videnskab.dk): <http://videnskab.dk/miljo-naturvidenskab/antibiotika-til-husdyr-billigt-landbruget-dyrt-sundhedsvaesenet>

Kristoffersen, F. (15. April 2013). *Danmarks Radio*. Hentet fra www.dr.dk: <http://www.dr.dk/Nyheder/Politik/2013/04/14/233708.htm>

Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms, udgave 11*. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.

Statens Serum Institut. (17. December 2012). Hentet fra www.ssi.dk:

<http://www.ssi.dk/Service/Sygdomsleksikon/M/Methicillin%20resistente%20Staphylococcus%20aureus.aspx>