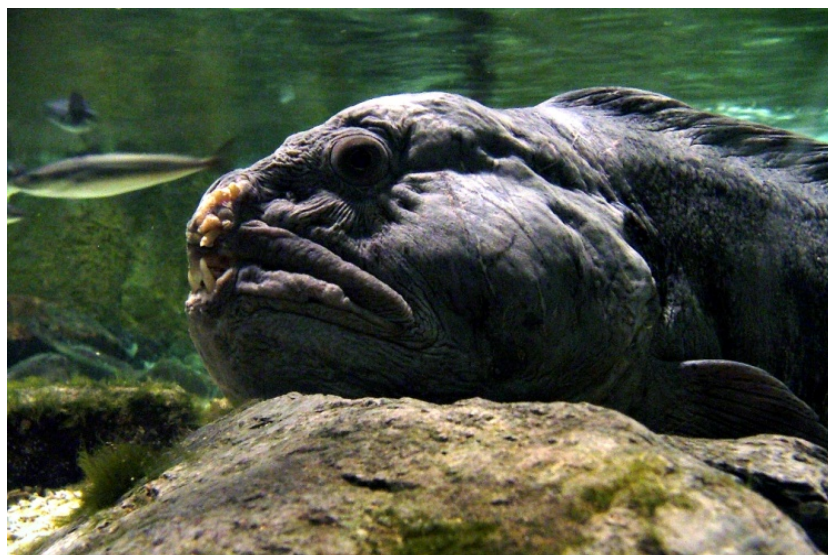


Antimikrobiell aktivitet i skinn hos fisk

av

Janitha Ormøy Singdahlsen



Mastergradsoppgave i fiskehelse (30 stp)



Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

Mai 2008

Sammendrag:

Dagens samfunn er i stadig utvikling, og det oppstår stadig nye utfordringer, både i form av sykdommer, samt i form av måter å finne nye medikamenter på. Dette har resultert i at man må gå nye veier for å finne kilder for nye farmaka.

Her er det marine miljøet mest sannsynlig en stor kilde, og det er uante muligheter der for å finne akkurat det som trengs.

En måte å utvinne disse nye stoffene på, er å ekstrahere dem fra marine organismer. Det har blitt gjort i denne oppgaven, og resultatet viste de fleste ekstraktene og eluatene fra en ekstrahering og eluering med acetonitril. Ekstraktene kom fra skinn hos steinbit, torsk, laks og uer, og disse ble testet for antimikrobiell aktivitet mot ti bakteriestammer og to soppstammer.

INNHOLDSFORTEGNELSE

INNHOLDSFORTEGNELSE	3
1. INNLEDNING	5
1.1 Det medfødte immunforsvaret hos fisk	5
1.1.1 Antimikrobielle peptider	6
1.1.2 Antimikrobielle peptider i marine organismer	8
1.2 Det adaptive immunsystemet hos fisk	9
1.3. Generelt om fiskeartene brukt i dette forsøket	10
1.3 Mikroorganismer benyttet i dette forsøket	11
1.3.1 Beskrivelse av de ulike mikroorganismene benyttet i dette forsøket	11
1.4 Hensikt/Problemstilling	15
2. MATERIAL OG METODE	16
2.1 Brukte kjemikalier og produsent	16
2.2 Utstyrliste:	16
2.3 Forberedelser av materialet	17
2.4 Ekstraksjonsprosessen	17
2.5 Fast fase ekstraksjon	18
2.6 Proteinkonsentrasjonsmålinger ved hjelp av BCA - metoden:	18
2.7 Bakterie- og soppdyrking:	19
2.8. Antimikrobiell testing	21
2.8 Gel-filtrering (SEC; Size Exclusion Chromatography)	22
3. RESULTAT	24
3.1 Forberedelser av materialet	24
3.2 Ekstrahering av ekstrakter	24
3.3 Testing ekstrakter for antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismer	25
3.3 Proteinkonsentrasjonsmålinger av ekstrakter	28

3.4 Gel-filtrering.....	31
4. DISKUSJON.....	33
5. Konklusjon	39
6. Referanser:	40

1. INNLEDNING

Fisk lever i nær kontakt med sitt miljø, og konsentrasjonene av bakterier og virus kan være høye i dette miljøet. Virus og bakterier som fisk møter på, kan være av forskjellige slag, noen er patogene, mens andre ikke er det. På grunn av dette høye smittepresset i havet, har fisk utviklet spesielle forsvarsmekanismer for å bekjempe mikrober av forskjellige slag. Immunsystemet hos fisk består av to deler, det medfødte (innate) og det adaptive systemet.

1.1 Det medfødte immunforsvaret hos fisk

Det innate immunforsvaret hos fisk har et begrenset spekter å spille på. Mulighetene for å gjenkjenne patogener er små, men til tross for dette er det et effektivt forsvar. Det reagerer raskt mot patogener, ofte i løpet av timer eller dager, i forhold til det spesifikke systemet som har en reaksjon, som ofte først kommer flere dager eller uker etter infeksjonen. I tillegg er det innate immunforsvaret relativt uavhengig av temperatur, noe det spesifikke immunforsvaret er sensitivt for. Det har også vist seg at det innate immunforsvaret spiller en viktig rolle i forbindelse med aktiveringen av det spesifikke immunforsvaret.

Hovedparametrene i det innate immunforsvaret er de fysiske barrierene, de aktive cellene og humorale parametre.

De fysiske parametrene består av fiske-skjell, mucus – laget på skinn og gjeller og epidermisen. Disse parametrene fungerer som den første barrieren patogenene må forsere ved infisering av en fisk. Parametrene fungerer ved at de fysisk hindrer patogenene i å feste seg og at utgjør et fysisk lag som patogenene må trenge gjennom, samt at de inneholder komponenter som utgjør en trussel for patogenene (Magnadottir, 2006). Disse komponentene kan være lektiner, lysozymer, komplement proteiner og antibakterielle peptider (Alexander and Ingram, 1992).

Det innate immunforsvaret reagerer på spesifikke deler av et patogen, sånn som lipopolysakkarider og peptidoglykaner i bakterieveggen. Reseptorene som binder molekyler på patogener kan være løselige, som komplement proteinet C3, lektiner og andre humorale innate komponenter, eller de kan være uttrykt som reseptorer på fagocytter eller andre celler i immunsystemet (Magnadottir, 2006).

De viktigste cellene i det innate immunsystemet er fagocytiske celler og ikke-spesifikke cytotoxiske celler, samt epitelceller og dendritiske celler.

Humorale parametrene i det innate immunforsvaret kan være transferrin, som hindrer bakterier å vokse ved å klatre jernet bakterien er avhengig av for å leve å vokse, samt at det kan aktivere makrofagene. En annen type forbindelser som er viktig i den humorale delen av det innate immunforsvaret er interferoner. Disse inducerer uttrykkningen av antivirale proteiner.

Lysozymer er viktige komponenter i immunforsvaret ved at de er bakteriocide, og dermed hydrolyserer bindingene i bakterie – veggens peptidoglykaner. Dette forårsaker lysering av bakterie – veggen.

1.1.1 Antimikrobielle peptider

Antimikrobielle stoffer er som sagt en del av det innate immunsystemet. Antimikrobielle peptider er en forsvarsmekanisme som evolusjonært sett har beholdt sin rolle i immunforsvaret (Zaslouff, 2002) . Det kan se ut som om de er viktige forsvars molekyler i alle levende organismer. I følge Scott & Hancock (2000) blir antimikrobielle peptider definert som positivt ladede peptider som består av 12-50 aminosyrer hvorav 50 % av aminosyrene er hydrofobiske

Ifølge Antimicrobial Sequences Database (<http://www.bbcm.unic.trieste.it/~tossi/search.htm>) er mer enn 900 forskjellige antimikrobielle peptider karakterisert fra forskjellige arter. De ble først isolert fra insekter, men har nå, som, også blitt isolert fra flere marine arter.

Antimikrobielle peptider har en molekylvekt som ligger fra 1 - 10 kDa, og er som regel kationiske. De viser ofte aktivitet mot mikroorganismer, og sammen med lav toksisitet for eukaryoter, er de viktige forbindelser i immunforsvaret. Det viser seg også at de har en rask og enkel syntese, og blir uttrykt i mange typer vev (Smith *et al.*, 2000).

Det finnes flere forskjellige antimikrobielle komponenter, og selv når man begrenser det til peptider vil man finne stor diversitet, og mange forskjellige strukturer. For å få en oversikt over de forskjellige strukturene hos antimikrobielle peptider, blir de delt inn i grupper.

- Lineære peptider som danner amfipatiske hydrofobe α -helikser
- Sykliske peptider og små proteiner som danner β -sheet strukturer

- Peptider med unike aminosyresammensetninger
- Sykliske peptider med thio-ester grupper i ringen
- Lipopeptider med amino alkohol
- Makrosykliske peptider

(Epanand and Vogel, 1999)

Virkemekanismene til disse gruppene er forskjellige, men generelt kan man si at et av målene for disse peptidene er lipid bilaget i membranen hos bakterier (Epanand and Vogel, 1999) Det har imidlertid vist seg at dette ikke gjelder alle antimikrobielle peptider. Hos Gram negative bakterier tror man at peptidet reagerer ved å krysse begge cellemembranene, og angripe flere anioniske mål samtidig. Det ser her ut som om peptidet går direkte på den anioniske LPS membranen og nøytraliserer denne ved å overta plassen for de divalente ionene-broene. Dette resulterer i at membranen ødelegges, og at peptidene kan trenge inn i membranen. Inne i membranen kan de se ut som om peptidet binder seg til fosfolipid laget, og danner supramolekylære kanaler. Disse kanalene kan være med på å hemme eller drepe cellen ved at membranen får permabilitetsproblemer. Disse kanalene er kun midlertidige, og når de kollapser kan peptidet som da befinner seg innenfor membranen virke videre på for eksempel DNA (Alexander and Ingram, 1992)

Det er mange hypoteser for virkningsmekanismer AMP (antimikrobielle peptider) bruker. Noen er nevnt i figur 1. Det finnes blant annet modeller som er tønnestavmodellen, som går ut på at peptider samles og danner kanaler eller porer i cellemembranen. Disse peptidene er amfipatiske, og er dermed både fett- og vannløselige, slik at de samler seg med den fettløselige delen ut av membranen mot den ytre siden, mens den vannløselige delen vil stikke inn mot det indre miljøet. På denne måten vil det være mulig for vannløselige stoffer å passere inn i cellen.

Teppemodellen har samme resultat, men her legger peptidene seg på cytoplasmamembranen med den fettløselige delen av peptidet stikkende ned i mellom fosfolipidene. Fosfolipidene vil skli fra hverandre, og peptidene vil da gå in mellom fosfolipidene. Dette vil til slutt resultere i at cellemembranen sprekker opp, og at det dannes porer inn i cellen som er dekket av peptider (Vorland, 2001).

Table 1 | **Membrane and intracellular models of antimicrobial peptide killing and lysis**

Model of antimicrobial activity	Synonym	Examples of peptides
Transmembrane pore-forming mechanisms		
Toroidal pore	Wormhole, disk	Magainin 2 ⁷⁰ , protegrin-1 ⁶² , melittin ^{55,81} , LL-37 ⁶⁶ and MSI-78 ⁹⁰
Carpet		DermaSeptin S ⁶⁵ , cecropin ^{156,157} , melittin ¹⁵⁸ , caerin 1.1 ¹⁵⁹ and ovispirin ⁶⁴
Barrel stave	Helical-bundle model	Alamethicin ^{61,81}
Modes of intracellular killing		
Flocculation of intracellular contents		Anionic peptides ³⁰
Alters cytoplasmic membrane septum formation		PR-39 ¹⁰³ , PR-26 ¹⁰⁹ , indolicidin ¹¹⁰ and microcin 25 ¹¹¹
Inhibits cell-wall synthesis		Mersacidin ¹¹²
Binds nucleic acids		Buforin II ¹¹³ and tachyplesin ¹¹⁴
Inhibits nucleic-acid synthesis		Pleurocidin ¹¹⁵ , dermaseptin ¹¹⁵ , PR-39 ⁷³ , HNP-1, -2 ⁴⁴ and indolicidin ¹¹⁰
Inhibits protein synthesis		Pleurocidin ¹¹⁵ , dermaseptin ¹¹⁵ , PR-39 ⁷³ , HNP-1, -2 ⁴⁴ and indolicidin ¹¹⁰
Inhibits enzymatic activity		Histatins ¹¹⁷ , pyrrolicocidin, drosocin and apidaecin ¹¹⁸

Figur 1: Hvordan antimikrobielle peptider virker når de lyseser og dreper celler (Brogden, 2005).

1.1.2 Antimikrobielle peptider i marine organismer

De første antimikrobielle peptider ble isolert fra insekter. Disse ble kalt cecropiner (Boman, 2003). Det har i ettertid blitt isolert antimikrobielle substanser fra flere organismer i både dyre- og planteriket. Det har, ikke blitt foretatt de store søkene i det marine miljø etter slike aktive komponenter. Først de siste ti år har forskningen begynt å dreie mot dette miljøet, og resultatene av denne forskningen har vært svært oppløftende. Mye av denne forskningen har foregått i de tropiske og tempererte farvann, som Asia og USA (Smith, 2008). Det er her funnet flere antimikrobielle forbindelser, noe som oppmuntrer til og utforske stadig nye arter. Det er ikke bare fisk som har blitt undersøkt for slike forbindelser, men blant annet mollusker, pigghuder og krepsdyr har vært aktuell for denne typen bioprospektering. Det har for eksempel vært gjort forsøk med o-skjell (*Modiolus modiolus*), hvor det ble detektert antimikrobielle forbindelser av proteinart (Haug *et al.*, 2004). Et annet eksempel er pyntekrabbe (*Hyas araneus*), hvor de ble lett etter antimikrobielle komponenter. Også i disse organismene ble resultatet positivt. De aktive komponentene var også der av proteinart, og de ble detektert i flere forskjellige organer i krabben (Haug *et al.*, 2002a).

Det er som sagt gjort mye forskning på fisk fra tropiske og tempererte strøk, og de fleste av de antimikrobielle forbindelsene som er funnet per i dag, er funnet hos arter som lever i de

overnevnte farvann. Noen av disse artene drives det oppdrett av i stor skala i Asia, og artene er derfor meget interessante i forbindelse med screening for antibakterielle forbindelser. Her kan det nevnes karpe (*Cyprinus carpio*), seabream (*Pagrus major*) og sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fra disse tre artene, samt mange flere, er det isolert aktive antimikrobielle peptider (Smith, 2008).

Det har de senere år blitt isolert antimikrobielle forbindelser også fra fisk som lever ved kaldere temperaturer, både fra tempererte og arktiske farvann. De artene som har vært fokusert på i denne sammenhengen er i all hovedsak laks (*Salmo salar*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), torsk (*Gadus morhua*) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus*).

I 2001 ble de første antimikrobielle forbindelsene isolert fra levra hos laks. Disse ble bestemt til å være histoner / histon-lignende peptider (Richards *et al.*, 2001).

Bergsson *et al.* publiserte i 2006 arbeider gjort på torsk, hvor det ble isolert antimikrobielle peptider fra skinn hos torsk. Disse peptidene ble identifisert til å være blant annet histoner. Bergsson *et al.* 2005 viser også gjennom sitt arbeid at det var flere uidentifiserte antimikrobielle forbindelser i skinn/mucus fra torsk (Bergsson *et al.*, 2005). Dette gjør torsk til en interessant art i forhold til videre leting etter nye antimikrobielle peptider.

I regnbueørret har det blitt påvist antimikrobiell aktivitet mot Gram-positive bakterier, men ikke mot Gram-negative i flere organer (Smith *et al.*, 2000). Det har blitt jobbet en del med skinn fra regnbueørret, og her har det blitt funnet og identifisert flere antimikrobielle peptider (Fernandes *et al.*, 2002).

Patrzykat *et al.* isolerte i 2002 det antimikrobielle peptidet pleurocidin fra skinn og epithel hos kveite (Patrzykat *et al.*, 2001), mens i 2003 og isolerte Birkemo *et al.* det antimikrobielle peptidet hipposin fra samme art (Birkemo *et al.*, 2003).

Dersom det skulle vise seg at peptider fra disse artene kan brukes i human medisin, ligger alt til rette for det. Det drives i dag oppdrett av artene, og dermed er de lett tilgjengelige.

1.2 Det adaptive immunsystemet hos fisk

Det adaptive immunsystemet er den delen av immunforsvaret som står for den spesifikke reaksjonen på mikrober. Denne delen inneholder også memory-delen av immunsystemet. Det adaptive immunsystemet består av to deler, den humorale og den cellulære delen.

Den humorale delen reagerer på mikrober ved hjelp av proteiner som kalles antistoffer. Disse antistoffene produseres av B-lymfocytter, som er celler som ved hjelp av antigenreseptorene de har på overflaten, gjenkjenner antigener hos mikrober. Når antigenreseptorene på B-lymfocytene registrerer og gjenkjenner mikrobens antigener, begynner B-lymfocytene å produsere og sekretere antistoffer ut i sirkulasjonen og de mucosale væskene. Der vil de nøytralisere og eliminere mikrober og mikrobielle toksiner som er tilstede i blodet og i lumen hos de mucosale organene. Antistoffer fra B-lymfocytter har ikke adgang til mikrober som lever og deler seg intracellulært (Abbas et al., 2001) Den cellulære delen av immunforsvaret er den delen som tar seg av intracellulære mikrober, og dette skjer ved hjelp av celler kalt T-lymfocytter. T-lymfocytene kan deles inn i to grupper, Tc-celler og Th-celler. Tc-celler er cytotoksiske T-celler som dreper celler som er infiserte virus eller andre intracellulære patogener.

Th-celler står for hjelpe T-celler, og det er disse T-cellene sekreterer cytokiner som ofte er molekylene som starter en immun prosess (Secombes *et al.*, 2005).

1.3. Generelt om fiskeartene brukt i dette forsøket

Steinbit (*Anarhichas lupus*), uer (*Sebastes marinus*), torsk (*Gadus morhua*) og laks (*Salmo salar*) er fiskearter som har sitt habitat i forskjellige deler av havet. Steinbit (*A. lupus*), uer (*S. marinus*), og torsk (*G. morhua*) er rene marine arter. Laks (*S. salar*) er en anadrom fisk, der den lever storparten av det voksne livet i det marine miljø, men vandrer til ferskvann (elver, innsjøer) for å gyte.

Steinbit er en bunnlevende fisk som trives best på tangbevokst steinbunn. Den finnes fra fjæra og helt ned til 500 m. dyp (Peton P.1998). Steinbit er for tiden aktuell for oppdrett da den er mer tolerant for høye tettheter, lavt oksygennivå og høye verdier av karbondioksid og ammoniakk enn mange andre oppdrettsarter (Falck – Pettersen I. B. 2005). Det er derimot oppdaget et problem innenfor oppdrett av denne arten. Det har vist seg at infeksjoner av bakterien atypisk *A. salmonicida* medfører store tap. Dette kan tyde på at steinbit er mer mottakelig for denne bakterien enn andre arter det i dag drives oppdratt av.

Uer lever normalt mesopelagisk, fra 100-500 meter. Dette er tradisjonelt en god matfisk, og det blir drevet økonomisk fiske etter arten (Peton P.1998).

Torsk er en fisk som trives stort sett over alt i havet, fra fjæra og ned til 500-600 meters dyp. Skinnen tar gjerne farge etter omgivelsene, dersom den lever i et miljø rikt på brunalger, blir

den ofte rødbrun i fargen, men er det sandbunn der hvor den lever blir skinnet ofte lyst grålig i fargen. Det har de siste årene blitt populært å drive oppdrett av torsk, men per i dag er det få oppdrettere som har hatt stor suksess, mye på grunn av sykdommer, samt stor dødelighet av yngel.

Habitatene for disse tre artene resulterer i at de blir utsatt for forskjellig belastninger, og at de møter forskjellige utfordringer i form av bakterier og andre sykdomsfremmende organismer.

1.3 Mikroorganismer benyttet i dette forsøket

Det ble i dette forsøket benyttet ti bakteriestammer og to sopparter

Bakterier kan bli delt in i to hovedgrupper, kalt Gram positive og Gram negative bakterier. Celleveggen hos de Gram negative bakteriene er en flerlaget struktur som har en kompleks oppbygning, mens celleveggen hos en Gram positiv bakterie består hovedsakelig av peptidoglykan og er ganske tykk.

Celleveggen hos bakterier består av en rigid peptidoglykanvegg som primært er ansvarlig for at veggen skal være sterk. Hos Gram negative bakterier er det to lag utenpå den cytoplasmiske membranen. Ett lag bestående av peptidoglykan og ett bestående av lipopolysakkarider.

Hos Gram positive bakterier finnes det også et annet stoff i celleveggen som kalles techoinsyre. Techoinsyre er et polysakkarid som er festet til celleveggen, og siden syren er negativt ladet er techoinsyren delvis ansvarlig for den negative ladningen til overflaten av celleveggen.

En viktig oppgave til den ytre membranen hos gram negative bakterier er at den er toksisk for dyr. Toksisiteten er knyttet til en del av dette lipopolysakkarid (LPS) laget, kalt lipid A eller endotoksin (Madigan MT et al., 9th ed.).

1.3.1 Beskrivelse av de ulike mikroorganismene benyttet i dette forsøket

I denne oppgaven ble det brukt ti bakteriestammer, hvorav åtte av stammene var Gram negative og to var Gram positive. Det ble også benyttet to sopper, *Candida albicans* og *Saccharomyces cerevisiae*.

Bakterienavn	Stamme	Gram – positiv / negativ	Isolert fra
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram - negativ	Klinisk isolat
<i>Vibrio anguillarum</i>	AL 104 Serotype O2a	Gram – negativ	Laks
<i>Vibrio anguillarum</i>	NCMB 6012 Serotype O1	Gram – negativ	Laks
<i>Vibrio anguillarum</i>	NCMB 2129	Gram – negativ	Laks
<i>Vibrio anguillarum</i>	NCMB 1275 Serotype O2a	Gram – negativ	Torsk
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4001	Gram – negativ	Laks
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4067	Gram – negativ	Steinbit
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4099	Gram – negativ	Torsk
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	Gram - positiv	Ukjent
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032 (CCUG 27702)	Gram - positiv	Kloakk
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Sopp	Human
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gave fra prof. Arne Tronsmo, UMB.	Sopp	Gjærsopp

Tabell1: Mikroorganismer og – stammer benyttet i den antimikrobielle testingen, hvilke stammer, Gram – positive / -negative og hvor de er isolert fra.

Escherichia coli (E.c.) er en Gram negativ stav bakterier som er naturlig forekommende i tarmfloraen i tykktarmen hos mennesker og andre varmblodige dyr. Den brukes ofte som en indikator bakterie på forurensing i for eksempel drikkevann. Bakteriens optimum temperatur er 37 °C (Madigan MT et al., 9th ed.).

Vibrio anguillarum (V.a.) (også kalt *Listonella anguillarum*) er også en Gram negativ bakterie. Dette er en marin patogen bakterie som har forårsaket flere problemer for oppdrettere av fisk opp gjennom tidene. I dag utgjør den ikke et stort problem for lakseoppdrettere, men det kan se ut som om den kan være et problem i oppdrett av marine arter. Den har en optimal temperatur som ligger rundt 15-18 °C.

Aeromonas salmonicida er en Gram - negativ bakterie i familien *Aeromonadaceae*. Det er beskrevet fem underarter (subspecies) av arten; subsp. *salmonicida*, subsp. *achromogenes*, subsp. *masoucida*, subsp. *smithia* og subsp. *pechtinolytica*. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* er bakterien som forårsaker den klassiske furunkulosen hos fisk, mens de andre underartene forårsaker fisesykdommen atypisk furunkulose. Med andre ord forårsakes atypisk furunkulose av alle andre stammer av *Aeromonas salmonicida* enn de som passer inn under beskrivelsen av *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* (Gudmundsdottir and Bjornsdottir, 2007).

De atypiske stammene av *Aeromonas salmonicida* er beskrevet som ikke-bevegelige, gram negative staver. Stammene er funnet hos fisk fra både ferskvann, brakkevann og sjøvann, og rapporter tyder på at de hovedsakelig infiserer i de tempererte områdene på den nordlige halvkule. Det vil si i Canada, USA, Japan og sentral og nord Europa. Det har imidlertid blitt isolert en atypisk stamme fra fisk i Australia. Samtidig har oppdrett av laks i sørlige deler av Chile også hatt problemer med infeksjoner av atypisk *Aeromonas salmonicida* (Bravo, 2000)

Corynebacterium glutamicum (C.g.) er en Gram positiv, ikke patogen bakterie. Den finnes naturlig i jord, og brukes i dag i industrien på grunn av sin aminosyre produserende egenskaper. Dens optimum temperatur ligger på rundt 30 °C

(<http://www.genetik.unibielefeld.de>)

Staphylococcus aureus (S.a.) er en Gram positiv bakterie som er vanlig på huden og i mucosaen hos mennesker. Den kan forårsake sykdom, da spesielt dersom den får mulighet til å trenge inn i kroppen (<http://www.hpa.org.uk>). Den har en optimal vekst ved ca 37 °C.

De antimikrobielle stoffene ble også testet mot to sopp stammer, *Candida albicans* (C. a.) og *Saccharomyces cerevisiae* (S. c.)

Candida albicans (C.a.) er en sopp som er naturlig forekommende i munnhulen, og fordøyelseskanalen hos mennesker. Den danner ofte soppinfeksjoner i munnhulen og skjeden hos kvinner, da spesielt i forbindelse med bruk av antibiotika som tar livet av den beskyttende bakteriefloraen som vanligvis holder soppen i sjakk. Den har en optimumtemperatur på 35-38 °C.

Saccharomyces cerevisiae (S.a.) er kjent som gjærsoppen som brukes i baking av gjærbakst og brygging av alkoholholdig drikke. Den har en optimal temperatur på 25-30 °C.

1.4 Hensikt/Problemstilling

Hensikten med dette forsøket/ denne oppgaven var å søke etter antibakterielle og antifungale forbindelser i skinn og mukus fra steinbit (*Anarhichas lupus*), uer (*Sebastes marinus*), torsk (*Gadus morhua*) og laks (*Salmo salar*). Dette er interessant område, da det allerede er påvist en rekke antimikrobielle forbindelser fra marina organismer fra før (Haug et al., 2002b, Haug et al., 2002a, Haug et al., 2004).

Det var også et ønske å se om ekstrakt fra skin / mukus hos spesielt steinbit, laks og torsk hadde antibakteriell aktivitet ovenfor patogene bakteriestammer (*V. anguillarum* og atypisk *A. salmonicida*) isolert fra de respektive fiskeartene.

Some en del av dette prosjektet måtte dyrkings- og testbetingelsene optimaliseres.

Og, dersom der var antimikrobiell aktivitet i ekstraktene, undersøke om der var en sammenheng mellom den antimikrobielle aktiviteten og proteininnholdet i SPE-eluatene og ekstraktene.

Det skulle også sees på om SPE-eluatene og ekstraktene viste noen forskjell i den antimikrobielle aktiviteten mot humane mikroorganismer og fiskepatogene oragnismer.

2. MATERIAL OG METODE

2.1 Brukte kjemikalier og produsent

- ❖ Acetonitril (LiChorsolv, Merck, Darmstad, Tyskland)
- ❖ Trifluoreddiksyre (Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits)
- ❖ Mueller- Hinton medium (Difco Laboratories, Detroit, USA)
- ❖ Potetdextrose medium (Difco, Laboratories, Detroit, USA)
- ❖ MilliQ-vann (Millipore Corp. USA)
- ❖ Cecropin P1 og B (syntetisert) (Kjuul *et al.*, 1999)

2.2 Utstysrliste:

- ❖ Frysetørker (Heto FD3, Heto Lab, Danmark)
- ❖ Frysetørker (VirTis Genesis, Wizard 2,0)
- ❖ Vakuumsentrifuge (MAXI Dry Lyo, Heto Lab, Danmark)
- ❖ Vakuumsentrifuge (ScanVac Coolsafe Scanspeed 40)
- ❖ Sep-pak® C₁₈ SPE-kolonner (10 gram kolonnemateriale) (Waters Associates, MA, USA)
- ❖ BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)
- ❖ SpectraMAX 190, Microplate Spectrophotometer (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)
- ❖ Waters Alliance HPLC system med fotodiode array (PDA) detektor
- ❖ Superdex® Peptide HR 10/30 (Pharmacia Biotech)
- ❖ FC 204 fraksjonssamler (Gilson Inc., Middleton, IL, USA)
- ❖ 100-brønners Honeycomb-plater (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)
- ❖ Microbiology Workstation Bioscreen C (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)
- ❖ Envision HTS Microplate reader (PerkinElmer®)

2.3 Forberedelser av materialet

Fersk (pre-rigor, oppbevart på is), usløyd uer (*Sebastes marinus*) (5 stk á 2-2,5 kg) ble kjøpt hos lokal fiskehandler (Dragøy, Tromsø). Fisken ble filetert, og skinnet ble separert fra fiskemuskelen og frosset ned ved -20 °C inntil videre analyser.

Levende gråsteinbit (6 stk á ca 3 kg) ble hentet fra Havbruksstasjonen i Tromsø A/S. Fisken ble avlivet med bedøvelse (Benzokain) og skinnet ble varsomt dissekert fra fiskemuskelen (for å unngå kontaminering av blod/ekskremitter) og videre frosset ned ved -20 °C.

Skinnet fra begge artene ble frysetørket i en Heto FD3 og prosessen tok ca. 3 døgn.

Laks (*Salmo salar*) og torsk (*Gadu morhua*) ble også levert av Havbrukstasjonen i Tromsø. Fisken var 3-4 kg, og ble avlivet ved slag i hodet. Den ble holdt på is under frakt, før den ble sløyd, og skinnet separert fra muskelen. Skinnene ble også her frosset ned ved - 20 °C.

Materialet fra disse to artene ble frysetørket i en VirTis Genesis frysetørker.

2.4 Ekstraksjonsprosessen

Om lag 50 gram frysetørket skinn fra hver art ble knust/klippet opp i små biter og tilsatt 10 volum (v/w tørrvekt) 60 % Acetonitril (ACN) inneholdende 0,1 % Trifluorsyre (TFA).

Materialet ble satt på omrøring, kjølig (+4°C) i 24 timer. Supernatanten ble helt av, og det ble på nytt tilsatt samme mengde løsemiddel, og dette sto kjølig (+ 4 °C) i nye 24 timer.

Supernatanten ble på dekantert av, samt at rest-materialet, samt at materialet ble sentrifugert ved 4000 rpm i 5 min slik at all væsken ble samlet. Den samlede væsken fra begge ekstraksjon-rundene ble satt på frys (- 20 °C) i 1-2 timer, noe som medførte at væsken delte seg i en organisk fase (øverste fase) og en vannfase med høyt saltinnhold (nederste fase).

Fasene ble separert, tørket inn ved hjelp av en vakuumsentrifuge og veid. Den organiske fasen oppbevart på - 20 °C for senere analyser. Vannfasen ble tilsatt 10 ml destillert vann per gram tørrstoff (100 mg/ml), og ble satt på omrøring ved + 4 °C til det var helt oppløst.

Vann fasen ble videre sentrifugert, før den ble tørket og kjørt fast fase ekstraksjon på.

Ved skillingen av vannfase og organisk fase fra uer, ble det dannet bobler midt i ekstraktet. Disse befant seg rett på over og på under siden av fase-skipet, og ved den fysiske delingen i en vannfase og en organisk fase havnet disse boblene i hver sin fase. Denne delen av materialet ville ikke tørke, men fikk en seig konsistens, samt at fargen var mørke-gul/brun.

2.5 Fast fase ekstraksjon

Fast fase er en metode som brukes for å fjerne salter fra en løsning. Det ble brukt Sep-pak® Vac 35cc (10 g) C18 SPE-kolonner til dette. Dette er en form for kromatografi, hvor hydrofobe (upolare) molekyler blir retardert i kolonnematerialet.

Kolonnematerialet ble kondisjonert med 30 ml 100 % Acetonitril, for så å bli ekvilibrert med 30 ml 0,05 % Trifluorsyre. Etter at prøve-materialet var satt på kolonna, ble den vasket med 50 ml 0,05 % TFA. Retardert materiale ble deretter eluert med økende konsentrasjon av ACN: 30 ml 10 % ACN + 0,05 % TFA, 30 ml 40 % ACN + 0,05 % TFA og 30 ml 80 % ACN + 0,05 % TFA. Eluatene ble samlet opp i forskjellige rør ut fra hvilken konsentrasjon av ACN som ble brukt, og etter fra disse elueringene sto man igjen med et 10 % SPE eluat, et 40 % SPE eluat og et 80 % SPE eluat.

Disse eluatene (10, 40 og 80 %) ble tørket i en MAXI dry lyo vakuumsentrifuge.

De tørkede eluatene, pluss de organiske ekstraktene ble veid og løst opp i vann til en konsentrasjon på 40 mg tørrstoff/ml vann.

Den delen av vannfasen (med boblene) som ikke ville tørke, heretter kalt fase I, ble også fast fase ekstrahert, tørket og løst opp til en konsentrasjon på 40 mg/ml.

2.6 Proteinkonsentrasjonsmålinger ved hjelp av BCA - metoden:

BCA - assay er en metode som er basert på bicinchoninic syre (BCA) for å få en colorimetrisk deteksjon og mengde bestemmelse av totalt protein i en prøve. Metoden går ut på å kombinere reduksjon av Cu^{+2} til Cu^{+1} vha protein i et alkalisk medium, med den sensitive og selektive colorimetriske detekteringen av kopper kationet (Cu^{+1}), ved å bruke en reagent som inneholder bicinchoninic syre. Den lilla fargen som er produktet i dette assayet blir dannet av en binding (kelatering) mellom to molekyler av BCA og ett kopper-ion.

Proteinkonsentrasjons-målingene ble gjort i samsvar med instruksjoneheftet som følger med assayet, og det ble brukt standarder med en konsentrasjon fra 0 til 1500 µg/ml.

Det ble brukt en BCA-working-reagent, og denne ble laget ved å mikse 50 deler BCATM Reagent A med 1 del BCATM Reagent B.

Et volum på 10µl av prøvene og standardene ble pipettert ut i et mikro-titer-plate. Platen ble inkubert i 30 min ved 37 °C, avkjølt til romtemperatur, og avlest i en SpectraMAX 190, mikroplate spektrofotometer ved bølgelengde 562 nm (Pierce Biotechnology)

2.7 Bakterie- og soppdyrking:

Eluatene ble som sagt testet mot ti bakteriestammer og 2 sopper. Bakteriene som ble brukt var *Escherchia coli*, *Vibrio anguillarum* (4 ulike stammer), *Aeromonas salmonicida* (3 ulike stammer en stamme isolert fra laks, en fra steinbit og en fra torsk) *Corynebacterium glutamicum* og *Staphylococcus aureus*, og de soppene som eluatene ble testet mot var *Candida albicans* og *Saccharomyces cerevicia*.

Dyrkingen av bakteriene ble gjort på forskjellig måte.

E. coli, *C. glutamicum* og *S. aureus* ble dyrket på følgende måte. Dette er en metode som også ble brukt i Haug et al. 2001, 2002, 2004 (Haug et al., 2002a, Haug et al., 2002b, Haug et al., 2004).

Bakterie - kolonier fra allerede utsådde og ferdig inkuberte Mueller Hinton (MH) plater ble dyrket i 5 ml MH-rør over natten. Neste dag ble det overført 20 µl fra rørene til nye 5 ml MH-rør, som ble satt på risting i 2-3 timer. OD₆₀₀ (optisk tetthet; optical density) ble målt før hver bakteriesuspensjon, og basert på OD-verdi (tabell1) ble det laget en standard-suspensjon med fast bakterietetthet.

Tabell 2: OD₆₀₀-verdier bestemmende for mengde bakterie-suspensjon som overføres til MH-medium

OD ₆₀₀ -verdier	Mengde bakterie-suspensjon i 10ml MH-medium
0,003-0,010	20µl
0,010-0,030	10µl
0,030-0,075	5µl
0,075-0,100	4µl
0,100-0,150	3µl

Dersom OD₆₀₀-verdien lå mellom 0,003-0,010 ble det overført 20µl bakteriesuspensjon i 10ml MH-medium osv. Dette sikret at man fikk en bakterietetthet på ca $2,5 - 3 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ i hvert rør som inneholdt 10 ml MH-medium.

For de tre atypisk *A. salmonicida* – stammene var det nødvendig å benytte en annen metode for å oppnå en optimal dyrking.

De atypiske *A. salmonicida* - stammene ble strøket ut fra frysekulturer på MH – skåler, BHI – skåler og blodagarskåler. Disse skålene ble inkubert ved 12 °C i 4 døgn, før kolonier ble overført fra blodskålene til 5 ml rør med BHI – medium (Brain Heart Infusion) med 0,5 % NaCl. Det ble ikke benyttet kolonier fra MH-platene eller BHI-platene da veksten var best på blodplatene.

BHI – rørene ble så inkubert over natt på risting ved 12 °C. OD₆₀₀ ble målt, og ut fra disse verdiene det ble gjort seks ti – folds fortyndinger av ON – kulturen (over natt – kulturen) før de tre laveste konsentrasjonene ble strøket ut på blodskåler for videre kimtallavlesning. Blodskålene ble inkubert i 4 døgn, og kimtall ble avlest.

Det ble videre foretatt beregninger ut fra OD₆₀₀ – verdier og kimtallavlesning, slik at bakterieantall per ml ble tilnærmet kjent.

Da det var ønskelig å ha en lik bakterietetthet av samtlige stammer ved start av testing for antimikrobiell aktivitet, var dette den mest gunstige metoden å bruke.

For antifungal testing ble soppstammene *Saccharomyces cerevisiae* og *Candida albicans* brukt som testorganismer. Soppen ble dyrket på potetdextrose agar med 2 % glucose. For den antifungale testingen ble soppen løst i potetdextrose medium (Difco), og cellekonsentrasjonen ble beregnet og justert ved hjelp av et Bürker tellekammer.

2.8. Antimikrobiell testing

Testingen for antimikrobiell aktivitet mot *E. coli* – stammen, *V. anguillarum* stamme AL 104, *C. glutamicum* og *S. aureus* ble utført i 100 brønners mikrotiterbrett, og det ble gjort to paralleller.

Tre eluater (10 %, 40 % og 80 %) og en organisk fase fra alle de fire fiskeartene ble testet mot de overnevnte fire bakteriestammene, samt de to soppene.

Med en utgangskonsentrasjon på 40 mg/ml ble 7 tofolds fortynningen testet for aktivitet.

Konsentrasjonene som ble testet var: 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,63 mg/ml, 0,31 mg/ml og 0,16 mg/ml.

Det ble så tilsatt 50µl bakteriesuspensjon i MH-medium i hver brønn. Dette vil si at det var 1250 – 1500 bakterier i hver brønn (50µl) ved starten av inkuberingen.

Det ble laget en negativ kontroll med bakteriesuspensjon og H₂O, og en positiv kontroll med bakteriesuspensjon og Cecropin (kjent syntetisert antibakterielt peptid).

Mikro-titer-brettene ble plassert i en Microbiology Workstation Bioscreen C (Labsystems Oy, Helsinki, Finland), og inkubert ved 20 °C. Platene ble avlest av et bredband-filter, med hensyn på turbiditet. Bioscreen C maskinen ble programmert til å lese av platene hver 2. time i 72 timer (3 døgn).

Ekstraktene fra de fire fiskeartene ble også testet for antimikrobiell aktivitet mot *V. anguillarum* - stammene NCMB 6012, NCMB 1275, NCMB 2129, samt de atypisk *A. salmonicida* – stammene 4001, 4067 og 4099 i 96 – brønners mikrotiterbrett.

Fremgangsmåten for testingen ble gjort på samme måte som ovenfor, men det ble i denne testingen brukt plateleser fra Envision. Temperaturen under inkubering var 12 °C, og platene ble ristet i 10 sekunder før avlesning, og bakteriene var suspensert i BHI – medium.

Testing av antimikrobiell aktivitet mot *V. anguillarum* – stammene NCMB 6012, NCMB 1275 og NCMB 2129, samt de atypiske *A. salmonicida* - stammene foregikk i 7 døgn, med avlesningsintervall på 2 timer (84 avlesninger).

Testing av antimikrobiell aktivitet mot soppstammene ble gjort ved at 50 µl soppsporer (konsentrasjon 2×10^4 sporer / ml) ble inokulert i mikrotiterplater sammen med 50 µl SPE-eluat / organisk ekstrakt løst i vann. Det ble her brukt samme testkonsentrasjonene av SPE-eluatene og de organiske ekstraktene som ved den antibakterielle testingen.

Mikrotiterplatene ble inkubert i et fuktkammer, *S. Cerevisiae* ved ca 22 °C, og *C. Albicans* ved 37 °C. Veksthemming ble undersøkt etter 24 timer og 48 timer. Da ved mikroskopering.

Antimikrobiell aktivitet i begge assayene ble påvist dersom veksten hos bakteriene og/eller soppen var mindre enn 50 % sammenlignet med den negative kontrollen, som kun inneholdt bakterier og dH₂O.

Minste inhiberende konsentrasjon (MIC) ble videre definert til å være den laveste konsentrasjonen av en prøve der bakterie- eller soppveksten var mindre enn 50 % av vekstkontrollen (bakterie/sopp + H₂O).

2.8 Gel-filtrering (SEC; Size Exclusion Chromatography)

Gel-filtrering er en kromatografisk metode som separerer på grunnlag av størrelse eller det hydrodynamiske volumet på molekylene som skal separeres. Metoden brukes vanligvis ved separering av makromolekyler som proteiner og polymerer, men kan også benyttes på peptider.

Den stasjonære fasen består enten av polyacrylamid, dextran, agarose, silika eller polystyren. Den mobile fasen blir presset gjennom kolonnen med den stasjonære fasen med lavt trykk.

Teorien bak metoden er at molekyler med forskjellig størrelse vil vandre gjennom den stasjonære fasen med forskjellig hastighet. Bakgrunnen for dette er at den stasjonære fasen består av polymerer med små porer i forskjellige størrelser. Prøvematerialet som blir ført gjennom den stasjonære fasen inneholder molekyler av forskjellig størrelse som vil legge seg

midlertidig i disse porene. Store molekyler vil ikke legge seg i porene, og gå rett gjennom kolonna, og vil dermed bruke kort tid. Jo mindre forbindelsene er, jo senere i prosessen vil de elueres ut av kolonna.

3. RESULTAT

3.1 Forberedelser av materialet

Fisk (steinbit, laks og torsk) ble levert av Havbruksstasjonen i Tromsø. Steinbiten ble avlivet ved sedatering, mens laksen og torsken ble avlivet med slag i hodet. Skinnen ble fryst ned ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uerskinnet ble skaffet fra Dragøy (lokal fiskehandler), og ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ på NFH.

Steinbit- og uerskinnet ble frysetørket i en Heto FD3 – frysetørker i tre døgn, mens laks- og torskeskinnet ble frysetørket i en VirTis Genesis – frysetørker i ett døgn.

3.2 Ekstrahering av ekstrakter

Det ble foretatt ekstrahering av skinn fra fire ulike fiskeslag; uer (*Sebastes marinus*), steinbit (*Anarhichas lupus*), torsk (*Gadus morhua*) og laks (*Salmo salar*). Ekstraheringen ble gjort ved først en grovekstrahering, for så å gjøre en fast fase ekstrahering (SPE). Grovekstraheringen innebar at skinn tilsatt 60 % acetonitril + 0,1 % trifluorsyre sto på røring i 48 timer, før skinnen ble fjernet og væsken ble satt kaldt ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Det dannet seg to faser i væsken, en vannfase og en organisk fase. Disse ble skilt, og det ble foretatt en fast fase ekstraksjon av vannfasen. Under fast fase ekstraksjonen ble det brukt Sep-pak® Vac 35cc (10 g) C18 SPE-kolonner og tre konsentrasjoner av acetonitril; 10 % 40 % og 80 %, alle konsentrasjonene tilsatt 0,05 % TFA. Eluatene fra fast fase ekstraksjonen ble vakuamtørket, for deretter å bli løst opp i dH₂O til en konsentrasjon på 40 mg tørket material per ml eluat. Den organiske fasen ble også tørket og løst opp i dH₂O til samme konsentrasjon.

Tabell 3: Tørrvekt av materialet etter forskjellige behandlinger. Tørrvekt 1 = etter tørking vha frysetørker; Tørrvekt 2 = Tørrvekt etter tørking av vannfase og organisk fase hver for seg i vakuumbørker; Tørrvekt eluat = tørrvekt av de forskjellige SPE-eluatene etter fast fase ekstrahering.

Materiale	Råmateriale	Tørrvekt		SPE-eluat		
		Organisk fase	Vann fase	10 %	40 %	80 %
Steinbit	52,08 g	3,42 g	5,9 g	0,23g	0,08 g	0,17 g
Uer	47,22 g	0,52 g	1,16 g	0,10g	0,22 g	0,34 g
Laks	56,70 g	1,03 g	3,43 g	0,17 g	1,66 g	0,05 g
Torsk	57.30 g	3,38 g	5,21 g	0,23 g	1,53 g	0,04g

Mengden stoff man satt igjen med etter de forskjellige ekstraksjonsmetodene er vist i tabell 3.. Det man kan merke seg i tabellen er mengden 80 % - eluat fra laks og torsk. Mengden av disse to eluatene var svært liten, mens mengden organisk ekstrakt etter tørking var relativ stor.

3.3 Testing ekstrakter for antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismer

Eluatene og de organiske fasene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot ti bakteriestammer (åtte Gram-negative stammer og to Gram-positive stammer) og to sopparter ved hjelp av mikrotiter plater som ble avlest i plateleser (bakteriene) eller manuelt i mikroskop (sopp).

Av de ti bakteriestammene ekstraktene ble testet mot, var tre humane bakteriestammer (E. c., C. g. og S. a.), mens de resterende var fiskepatogene stammer (V. a. og Atypisk A. s.). En av de to soppartene ekstraktene ble testet mot var human stamme (C. a.), mens den andre var en gjærsopp (S. c.).

TABELL 4 (neste side): Antimikrobiell aktivitet definert som 50 % veksthemming av mikroorganismen (bakterie / sopp). Fortynninger av ekstraktene som ble testet for antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismene var 20 mg/ml, 20 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,63 mg/ml, 0,32 mg/ml, 0,18 mg/ml. Antall pluss (+) betegner antall fortynninger av ekstraktene som viste antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismene. Minus (-) betyr ingen aktivitet. Mikroorganismene det ble testet om eluatene hadde antimikrobiell aktivitet mot var *Escherichia coli* (E.c), *Corynebacterium glutamicum* (C.g), *Staphylococcus aureus* (S.a), fire stammer *Vibrio anguillarum* (V.a) og tre stammer atypisk *Aeromonas salmonicida* (atypisk A.sal), samt de to soppene *Candida albicans* (C.a) og *Saccharomyces cerevisiae* (S.c).

Art	Type	E.c.	C.g.	S.a.	Atypisk A.s.			V.a. (L.a.)				C.a.		S.c.	
					4001	4067	4099	AL 104	1275 O2a	2129 – O1	6012 O1a	e/24t ^a	e/48t ^b	e/24t ^a	e/48t ^b
Uer	10%	++	+++++	+++	++	++	+	++++	+++	++++	+	+	+	++	++
	40%	++	+++	+++	++	++	++	+++	++++	++++	-	+	+	+++	++
	80%	-	-	-	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	-	++	+	-	-	-	-	-
	Org	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Steinbit	10%	+	+++	++	++++	++++	++++	+++	+++++	+++++	+++++	+	-	++	+
	40%	++++	+++++	+++	++++	++++	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	-	+++++	++
	80%	-	+	+	-	+	+	+	+++	-	-	-	-	+	-
	Org	+	+	++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	+++	-	-	-	-
Laks	10%	++	+++	++	+	+	+	++++	++	+++	++++	-	++	+++	++
	40%	++	+++++	++	++	++	++	++++	++++	++++	++++	+	+	++	++
	80%	+++	+++++	+	+++	++	+++	++++	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c
	Org	-	+	+	++++	+++	+++	-	+++	++	++	+	-	-	-
Torsk	10%	++	+++	+++	+++	++	++	++	++++	+++	+++	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c
	40%	+	++++	+++	+	+	++	+++	++++	++++	++++	++	-	-	-
	80%	+++	+	+	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	+++++	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c	I. T ^c
	Org	-	+	-	+++++	+++	++++	++	+++++	++++	+++++	-	-	-	-

^a = Platene ble inkubert i 24 timer. ^b = Platene ble inkubert i 48 timer. ^c = Ekstrakt ikke testet for antimikrobiell aktivitet.

3.3 Proteinkonsentrasjonsmålinger av ekstrakter

Det ble også gjort proteinmålinger av materialet som var oppløst til en konsentrasjon på 40 mg / ml tørt ekstrakt. Under denne proteinmålingen ble det benyttet et assay kalt BCA (bicinchoninic acid) fra Pierce Biotechnology. Ekstraktene ble fortynnet før måling for at målingene skulle være innenfor den allerede ferdiglagede standarden. Plater med standard og ukjent prøve ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter, før platene ble avlest i en plateleser (SpectraMAX 190, Microplate Spectrophotometer). Ut fra de målte OD – verdiene, ble de beregnet et proteinkonsentrasjons - gjennomsnitt for hvert ekstrakt. Det ble også beregnet % protein i hvert ekstrakt. Dette er vist i tabell 5.

Tabell 5: Gjennomsnittlig målte proteinkonsentrasjoner i materialet vha BCA-metoden, målt som µg / ml, samt beregnet prosent protein i materialet, før antimikrobiell testing.

Materiale	Protein (µg/ml)				% protein			
	10 %	40 %	80 %	Organisk fase	10 %	40 %	80 %	Organisk fase
Steinbit	821,7*	2221,7*	40,2	234,2*	2,1	5,5	0,1	0,6
Uer	1010,6*	1155,8*	0	0	2,5	2,9	0	0
Laks	991,2*	1145*	908,8*	497,4*	2,5	2,9	2,3	1,2
Torsk	1005*	2843,5*	2873,5*	965,4*	2,5	7,1	7,2	2,4

* = Beregnet snitt av flere målinger

Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) for SPE-eluatene og de organiske ekstraktene som ble testet for antimikrobielle aktivitet mot de ulike mikroorganismene, er vist i tabell 6 og 7. Det er her tatt utgangspunkt i proteinmålingene foretatt ved hjelp av proteinmålingskittet BCA (Pierce Biotechnology), som vist i tabell 5, samt resultatene fra de ulike målingene av eluatene og ekstraktens antimikrobielle aktivitet mot de ulike mikroorganismene. Den minste inhiberende konsentrasjonen viser hvor lav proteinkonsentrasjonene kunne være, samtidig som det fremdeles var antimikrobiell aktivitet i ekstraktet. Siden konsentrasjonene av eluatene og ekstraktene som ble testet for antimikrobiell aktivitet ble fortynnet, er MIC – verdien

konsentrasjonen av protein i den laveste konsentrasjonen av ekstraktene som viste antimikrobiell aktivitet.

SPE-eluatene og de organiske ekstraktene ble testet mot 3 humane mikroorganismer og 7 fiskepatogene mikroorganismer. Tabell 6 viser MIC for eluatene og ekstraktene når de ble testet for aktivitet mot de humane mikroorganismene.

Tabell 6: Ekstraktens MIC-verdier (minimum inhibitory concentration) mot de humane / terrestriske mikroorganismene brukt i dette forsøket, beregnet ut fra målte proteinkonsentrasjoner gjort vha BCA-assay. Mikroorganismene var E. c. = *Escherichia coli*, C. g. = *Corynebacterium glutamicum*, S. a. = *Staphylococcus aureus*, C. a. = *Candida albicans* og S. c. = *Saccharomyces cerevisiae*. Alle verdiene er i mg/ml.

Art	Type	E.c.	C.g.	S.a.	C.a.	S.c.
					e/24t	e/48t
Uer	10%	0,21	0,03	0,13	0,51	0,51
	40%	0,29	0,14	0,14	0,57	0,57
	80%	-	-	-	-	-
	Org	-	-	I.P. ²	-	-
Steinbit	10%	0,41	0,1	0,21	0,41	-
	40%	0,14	0,03	0,27	1,11	-
	80%	-	0,02	0,02	-	-
	Org	0,12	0,12	0,059	-	-
Laks	10%	0,24	0,13	0,02	-	0,242
	40%	0,29	0,36	0,28	0,57	0,57
	80%	0,11	0,02	0,45	I. T. ¹	I. T. ¹
	Org	-	0,25	0,25	0,25	-
Torsk	10%	0,25	0,13	0,13	I. T.	I. T.
	40%	14,22	0,18	0,36	0,71	-
	80%	0,36	14,37	14,37	I. T. ¹	I. T. ¹
	Org	-	0,48	-	-	-

¹= ikke testet ²= ikke målbart protein

MIC – verdiene for protein i de laveste eluat og ekstraktkonsentrasjonene som viste antimikrobiell aktivitet mot de fiskepatogene mikroorganismene kan man lese i tabell 7.

Tabell 7: Ekstraktens MIC-verdier (minimum inhibitory concentration) mot de fiskepatogene mikroorganismene brukt i dette forsøket, beregnet fra målte proteinkonsentrasjoner gjort ved hjelp av BCA-assay. Bakteriene: atypisk A. s. = atypisk *Aeromonas salmonicida* stamme 4001, 4067 og 4099, samt V. a. (L. a.) = *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) stamme AL 104, NCMB 1275-O2a, NCMB 2129-O1 og NCMB 6012-O1a. Alle verdiene er i mg/ml.

Art	Ekstrakt	Atypisk A.s.			V.a. (L.a.)			
		4001	4067	4099	AL 104	1275 O2a	2129 O1	6012 O1a
Uer	10 %	0,25	0,25	0,51	0,06	0,13	0,06	0,51
	40 %	0,29	0,29	0,29	0,14	0,07	0,07	-
	80 %	I. T. ¹	I. T. ¹	I. T. ¹	-	I. P ²	I. P ²	-
	Org.	I. P ²	I. P ²	I. P ²	-	I. P ²	I. P ²	I. P ²
Steinbit	10 %	0,05	0,05	0,05	0,10	0,05	0,03	0,03
	40 %	0,14	0,14	0,28	0,07	0,07	0,07	0,07
	80 %	-	0,02	0,02	0,02	0,005	-	-
	Org	0,03	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03
Laks	10 %	495,6	495,6	495,6	62	242,8	123,9	62
	40 %	286,3	286,3	286,3	71,6	71,6	71,6	71,6
	80 %	113,6	227,2	113,6	56,8	I. T. ¹	I. T. ¹	I. T. ¹
	Org	31,1	62,2	62,2	-	62,2	124,4	124,4
Torsk	10 %	0,1	0,25	0,25	0,25	0,06	0,13	0,13
	40 %	14,21	14,2	0,71	0,36	018	018	018
	80 %	I. T. ¹	I. T. ¹	I. T. ¹	44,9	I. T. ¹	I. T. ¹	I. T. ¹
	Org	0,03	0,12	0,06	0,24	0,03	0,06	0,03

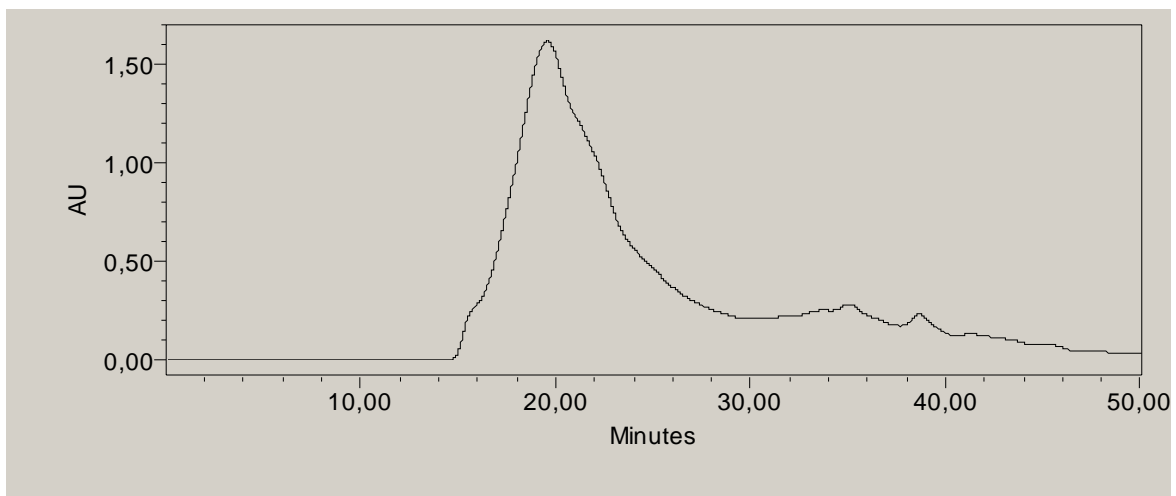
¹ = ikke testet. ² = ikke målbart protein

3.4 Gel-filtrering

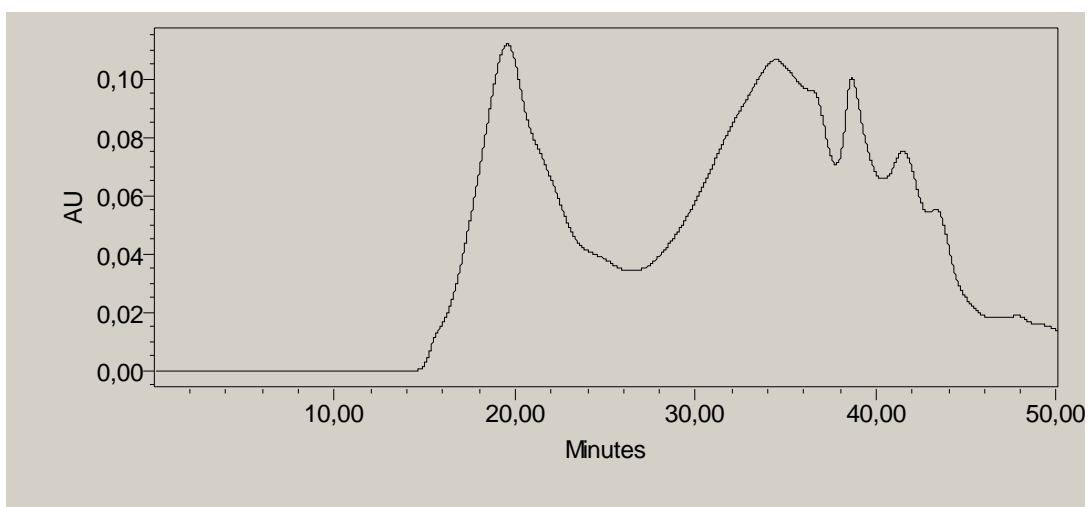
Et av de eluatene som viste mest aktivitet mot bakterier og sopp etter fast fase-ekstraheringen var 40 % -eluatet fra steinbit. Dette ble videre fraksjonert ved hjelp av gel-filtrering.

Fraksjonene fra gel-filtreringen ble deretter testet for aktivitet mot *Vibrio anguillarum* – AL 104 og *Corynebacterium glutamicum*.

a)



b)



Figur 2 Kromatogram som viser absorbans målt ved bølgelengde 220 nm (a), og ved 280 nm (b), etter gel-filtrering av 40 % eluatet fra steinbit. AU står for absorbance unit

Absorbansmålingen ved bølgelengde 220 nm etter gel-filtreringen av 40 % eluatet fra steinbit er vist i figur 2 a).

Fraksjoner som viste antimikrobiell aktivitet mot *L. anguillarum* (L. a.) og *C. glutamicum* (C. g.) absorberte lys ca 20-21 minutter ut i kjøringen.

Absorpsjonsmålingen ved bølgelengde 280 nm etter gelfiltreringen av 40 % eluatet fra gråsteinbit er vist i figur 2 b).

4. DISKUSJON

Fisk lever i nær kontakt med sitt miljø, og konsentrasjonene av bakterier og virus kan være høye i dette miljøet. Fisk har derfor utviklet mekanismer for å beskytte seg, og for å takle dette høye smittepresset. Disse beskyttelsesmekanismene kalles immunforsvaret. Hos fisk er det delt inn i to hoveddeler; det innate og det adaptive immunforsvaret. Det innate immunforsvaret er det man kan kalle et medfødt immunforsvar, i motsetning til det adaptive, som må gjennomgå en indusering før det kan virke fullt ut. Det innate forsvaret er det første en mikroorganisme møter på i dets forsøk på å trenge inn og infisere en annen organisme. Det er stort sett alltid til stede, og virker raskt og effektivt. Det negative er at det er uspesifikt, og en organisme vil derfor ikke være totalt uavhengig av det adaptive forsvaret. Det innate forsvaret finnes i hud/skinn og slimhinner, samt i blodet i form av fagocytter og naturlig drepe celler (Subramanian *et al.*, 2007).

Det adaptive immunforsvaret er ikke spesielt hurtigvirkende, og det må som nevnt bli induisert for at det skal virke fullt ut. Dette forsvaret er tilgjengelig svært spesifikt, og har ”hukommelse”.

Antimikrobielle forbindelser er en del av det innate immunforsvaret, og det har vist seg at mucus og skinn fra fisk innehar flere antimikrobielle peptider (Smith *et al.*, 2000, Fernandes *et al.*, 2002, Fernandes and Smith, 2002, Bergsson *et al.*, 2005) (Smith VJ & Fernandes JMO IN PRESS). De fleste studiene som er gjort, er gjort på mucus og skinn fra fisk. Dette er naturlig da mucus og skinn hos fisk er det viktigste første-linje forsvaret mot mikroorganismer (Hellio *et al.*, 2002).

Hensikten med dette forsøket var å søke etter antimikrobiell aktivitet i skinnen hos steinbit (*Anarhichas lupus*), uer (*Sebastes marinus*), laks (*Salmo salar*) og torsk (*Gadus morhua*). Til grunn for dette forsøket ligger tidligere funn av antimikrobiell aktivitet hos forskjellige marine organismer (Haug *et al.*, 2002a, Bergsson *et al.*, 2005, Nagashima *et al.*, 2003). I tillegg mener man at mye av grunnen til at marin fisk er så godt tilpasset det marine miljø, med alle de utfordringene som finnes av patogene mikroorganismer der, ligger i skinnen.

Spesielt interessant var det å se på hvilken aktivitet ekstraktene fra steinbit, laks og torsk utviste mot de tre atypiske *Aeromonas salmonicida* – stammene brukt i dette forsøket, da

disse er isolert fra de respektive artene. Dette kunne gi en indikator om hvorvidt skinnet er en naturlig infeksjonsvei for disse bakteriestammene.

Samtidig var det interessant å prøve å finne optimale betingelser for dyrking av forskjellige mikroorganismer, og optimale betingelser for testing av antimikrobiell aktivitet i de ulike ekstraktene fra fiskeartene.

Et annet mål var å undersøke om det var korrelasjon mellom proteinkonsentrasjonene og den eventuelle antimikrobielle aktiviteten i ekstraktene. Dersom det var korrelasjon mellom disse faktorene, ville man få en indikasjon om hvorvidt de antimikrobielle forbindelsene var av proteinart.

Skinnet fra de fire overnevnte fiskeartene ble frysetørket, og materialet etter tørkingen gjennomgikk flere ekstraksjonsprosesser. Etter frysetørkingen ble materialet grovekstrahert ved hjelp av 60 % acetonitril (ACN) + 0,05 % trifluorsyre (TFA) i 48 timer. Dette er en metode som er mye brukt, og det har vist seg at ACN er et godt løsemiddel til bruk for isolering av forbindelser av både protein - og ikke – proteinart (Haug et al.). Materialet fra grovekstraheringen ble satt kjølig, slik at ekstraktet ble separert i en vannfase og en organisk fase. Begge fasene ble tørket, før vannfasen ble løst i vann, og det ble kjørt en mer fintfølede separering, kalt fast fase – ekstraksjon (SPE). Dette er en metode som separerer etter polaritet. Materialet ble her eluert med stigende konsentrasjon av ACN, 10 %, 40 % og 80 % ACN + 0,1 % TFA ble brukt, gjennom en kolonne fylt med silika – partikler. De mest polare forbindelsene kom da ut av kolonne – materialet i 10 % - eluatet, mens de mest upolare forbindelsene ble eluert ut med 80 % - eluatet. Det var nok samtidig noen av de mest upolare forbindelsene som havnet i den organiske fasen under fase - separeringen. Tabell 3 viser tørrvekten av skinnet før ekstraheringen startet, samt hvor mye material man sto igjen med etter de forskjellige ekstraksjons – prosessene. Tabellen viser at den organiske fasen mest sannsynlig inneholder mange forskjellige stoffer og forbindelser, og at det dermed er nødvendig med den overnevnte fase – separeringen, da denne prosessen separerer de svært upolare forbindelsene fra de mer polare forbindelsene. Det man også kan se i tabell 3 er at mengden av 80 % - eluat fra laks og torsk var meget liten. Dette er grunnen til at disse eluatene ikke ble testet for antimikrobiell aktivitet mot enkelte mikroorganismer. I tabell 4, 6 og 7 er det satt inn en notasjon (I. T.) som viser hvilke mikroorganismer ekstraktene ikke ble testet for antimikrobiell aktivitet mot.

Alle ekstraktene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot flere mikroorganismer, herunder ti Gram – negative bakterier, to Gram – positive bakterier, og to sopparter. Det ble, som vist i tabell 4, observert antimikrobiell aktivitet av varierende grad mot de fleste av mikroorganismene. Ekstraktene fra uer viste lite antimikrobiell aktivitet, både mot de humane og de fiskepatogene mikroorganismene, og de to mens upolare ekstraktene (80 % og organisk fase) viste bortimot ingen aktivitet. Proteinmålingene, som er vist i tabell 5, viser at det ikke var målbart protein i disse to ekstraktene, men det ble derimot målt protein i 10 % - og 40 % - ekstraktene. Steinbit – ekstraktene var antimikrobielt aktiv mot de fleste mikroorganismene. 80 % -ekstraktet var ikke mye aktivt, og man ser fra tabell 5 at det, som forventet, heller ikke var mye protein i dette ekstraktet. 40 % - eluatet fra steinbit viste spesielt mye antimikrobiell aktivitet, både mot de atypiske *A. salmonicida* – stammene og *V. anguillarum* – stammene. Dette eluatet ble derfor rensert videre ved hjelp av gel-filtrering (SEC). Fraksjonene fra gel – filtreringen ble testet for antimikrobiell aktivitet mot *Vibrio anguillarum* og *Corynebacterium glutamicum*. Resultatet etter den antimikrobielle aktiviteten av fraksjonene fra gel – filtreringen av eluatet fra steinbit, viste aktivitet i fraksjon 20 og 21. Dette kan være en forbindelse som inneholder peptid-bindinger, da disse absorberer lys ved rundt 220 nm. Det kan også se ut som om at dette kan være en forbindelse/et peptid som ligner på aprotinin, da det som kjent har en retensjonstid på 21 minutter (fraksjon 21).

Det ser ikke ut som at ekstraktene fra steinbit er spesielt antimikrobielt aktive mot verken den atypiske *A. salmonicida* – stammen som var isolert fra steinbit (stamme 4067), eller mot noen av de andre atypisk *A. salmonicida* – stammene. Tabell 4 viser også at det ble målt mer antimikrobiell aktivitet i den organiske fasen fra steinbit enn i 80 % - ekstraktet. Dette stemmer overens med proteinkonsentrasjonene som ble målt i disse ekstraktene, vist i tabell 5. Mulighetene er derfor til stede for at denne antimikrobielle aktiviteten er fra forbindelser av proteinart.

Laks hadde ikke noen høy aktivitet i 10 % - og 40 % - eluatene mot atypisk *A. salmonicida*, stamme 4001, som er isolert fra laks. Den hadde derimot en del aktivitet i 80 % - eluatet og det organiske ekstraktet. Proteinkonsentrasjonene i disse ekstraktene var ikke spesielt høye, og man ser i forbindelse med MIC – verdiene at sannsynligheten for at disse aktive forbindelsene er av proteinart, er små. Det ble til gjengjeld målt middels høy antimikrobiell aktivitet i 40 % - eluatet fra laks mot alle de fire stammene av *V. anguillarum*. Det kan se ut som om disse stammene var sensitive for forbindelser som fantes i ekstraktene fra alle fiskeartene, da de fleste ekstraktene viste god antimikrobiell aktivitet mot alle fire stammene

10 % - og 40 % - ekstraktene fra torsk viste liten antimikrobiell aktivitet mot de tre atypisk *A. salmonicida* – stammene, mens det organiske ekstraktet viste stor antimikrobiell aktivitet. I tabellen over proteinkonsentrasjonene (tabell 5) kommer det frem at det er mye protein i både 40 % -, 80 % - og det organiske ekstraktet. Samtidig viser tabellen over MIC – verdiene (tabell 7) at disse ekstraktene er antimikrobielt aktive ned i lave proteinkonsentrasjoner. Selv om 10 % - og 40 % -ekstraktene fra torsk ikke var spesielt antimikrobielt aktive mot de atypiske *A. salmonicida* – stammene, viser de god antimikrobiell aktivitet mot *V. anguillarum* – stammene. Dette er som tidligere nevnt, et tydelig trekk for ekstraktene fra alle artene, bortsett fra 80 % - og det organiske ekstraktet fra uer.

Som vist i tabell 4, ble også ekstraktene fra alle artene testet for antimikrobiell aktivitet mot to sopparter, hvor *C. albicans* er en human sopp, og *S. cerevisiae* er en gjærsopp. Torsk, som hadde mye antibakteriell aktivitet, viste liten eller ingen antimikrobiell aktivitet mot soppartene.

Det var generelt få ekstrakter som viste noe antimikrobiell aktivitet mot soppartene. Grunnen til dette kan være så mangt, men den metoden for avlesning som ble brukt i dette forsøket, var mest sannsynlig ikke optimal. Avlesningen foregikk ved at det ble så på mikrotiterplatene med soppen og ekstraktene med det blotte øye og i mikroskop. Dette ble gjort etter 24 timer og etter 48 timer inkubasjon. Det optimale hadde nok her vært å lese av platene i en plateleser, og dermed fått mer presise avlesninger, samt fått sett en vekstkurve for soppene. Til tross for avlesningsmetoden, ble det observert at 40 % - ekstraktet fra steinbit vist mye antimikrobiell aktivitet mot *S. cerevisiae*.

Det ble også, som sagt, gjort en proteinkonsentrasjonsmåling av alle ekstraktene etter fast fase – ekstraksjonen. Dette for å undersøke korrelasjonen mellom antimikrobiell aktivitet og proteinkonsentrasjon. Det ble benyttet en metode kalt BCA (Pierce Biotechnology) for å finne proteinkonsentrasjonene. Resultatet fra disse målingene finnes i tabell 5. Tabell 6 og 7 viser den laveste konsentrasjonen av protein som viser antimikrobiell aktivitet sett ut fra tabell 5.

Dersom man går inn i tabell 5 og ser på aktiviteten 40 % eluatet fra steinbit hadde mot *C. glutamicum*, ser man at eluatet hadde mye antibakteriell aktivitet den bakteriestammen. Dersom man går inn i tabell 6, som viser MIC for eluatene og ekstraktene mot de humane bakteriene, ser man at MIC er ganske lav. Dette tyder på at det kanskje kan være noe av proteinnatur som er aktivt, og at aktiviteten har ”stoppet” fordi konsentrasjonen av proteinet har blitt for lav. Går man derimot inn og ser på 40 % eluatet fra torsk, og den antibakterielle

aktiviteten det utviser mot *C. glutamicum*, ser man at det ble observert lite aktivitet mot bakterien, og man ser også at proteinkonsentrasjonen er høy, selv om det er lite aktivitet. Dette tyder på at det ikke er antibakteriell aktivitet i proteinene/peptidene som ble eluert med 80 % ACN fra skinnen til torsk.

I forbindelse med gel – filtreringen som ble utført, ble fraksjoner samlet opp for hvert minutt. Absorbansen ble målt ved bølgelengde 220 nm og 280 nm. Fraksjonene ble deretter testet for antimikrobiell aktivitet mot *L. anguillarum* og *C. glutamicum*.

Gelfiltreringskolonna som ble brukt under gelfiltreringa (Superdex peptide), har et optimalt separasjonsområde på mellom 100 og 7000 Da, og der molekyler med molekylvekt over 20 000 Da vil passere direkte gjennom kolonna (ingen retardasjon). Ved tidligere analyser, under identiske betingelser, hadde peptidene aprotinin (mw = 6512 Da) og cecropin P1 (mw = 3339 Da) retensjonstider på henholdsvis 21 og 28 minutter (Haug T.; Pers. med).

Figur 2 viser kromatogram for absorbansen etter gel – filtreringen av 40 % - eluatet fra steinbit. Figur 2 a) viser absorbansen ved 220 nm, mens figur 2 b) viser absorbansen ved 280 nm. Resultatet etter den antimikrobielle aktiviteten av fraksjonene etter gel – filtreringen av eluatet fra steinbit, viste aktivitet i fraksjon 20 og 21. Som man ser ut fra figur 2 ser det ut som om dette kan være en forbindelse som inneholder peptid-bindinger, da disse absorberer lys ved rundt 220 nm. Det kan også se ut som om at dette kan være en forbindelse/et peptid som ligner på aprotinin, da det som kjent har en retensjonstid på 21 minutter (fraksjon 21).

Dyrkningsbetingelsene for bakterier varierer fra stamme til stamme, og i dette forsøket var det ønskelig med optimale dyrknings- og testbetingelser. For å få dette til var man nødt til å undersøke i hvilket medium bakteriene vokste best, samt ved hvilken temperatur. Det var nødvendig å tilpasse dyrknings – assay for de tre atypiske *A. salmonicida* – stammene. Dette ble gjort ved at bakterier ble strøket ut fra frysekultur på forskjellige typer agarskåler. Det ble brukt MH – agar og BHI – agar og blod – agar (helblod). Agarskålene ble inkubert ved 12 °C i 4 døgn, og det viste seg at bakteriene vokste best på BHI – agar og blod – agar. Det var ingen tegn til vekst på MH – agaren. Det ble laget en overnatt – kultur fra hver stamme ved å overføre bakteriekulturer fra agarskålene til 5 ml BHI – medium. Disse ble inkubert i ett døgn ved 12 °C, OD₆₀₀ ble målt, og det ble gjort seks ti – folds fortyninger. Fra de tre laveste konsentrasjonene ble det strøket ut 100 µl på blodagarskåler. Disse ble inkubert i 4 døgn ved

12 °C, før kimtall ble avlest, og bakterieantall (CFU) / ml beregnet. Dermed fikk man beregnet seg inn på standardassayet som ble brukt. Eneste forskjellen var at de atypiske *A. salmonicida* stammene vokste i BHI-medium, mens *V. anguillarum* stammene vokste i MH-medium.

5. Konklusjon

Hovedmålet med denne oppgaven var og observer om det var mulig å finne antimikrobiell aktivitet i skinn fra uer (*Sebastes marinus*), steinbit (*Anarhichas lupus*), laks (*Salmo salar*) og torsk (*Gadus morhua*). Det ble observert antimikrobiell aktivitet i alle ekstraktene fra alle fiskeartene, dog i varierende grad. Ut i fra de antimikrobielle testene som ble kjørt, så det ut som at det var ekstraktene fra steinbit, da spesielt 40 % - ekstraktet, og ekstraktene fra torsk som var de mest antimikrobielt aktive. Det ble kjørt gel – filterering av 40 % - ekstraktet fra steinbit, og der fant man antimikrobiell aktivitet i to fraksjoner. Det kan se ut som om disse var av proteinart, da det er kjent at peptidbindinger absorberer lys ved 220 nm, og det var ved denne bølgelengden fraksjonene kom tilsynet. Dessuten kom de ut ved 20 og 21 minutter, og det er kjent at retensjonstiden for et kjent peptid, aprotinin, er på ca 21 minutter.

Det ble også testet om ekstraktene fra steinbit, laks og torsk var spesielt antimikrobielt aktive mot tre ulike stammer av atypisk *A. salmonicida* som var isolert fra hver sin fiskeart (steinbit, laks og torsk). Resultatet fra testingen av ekstraktene mot disse tre stammene viste at alle tre stammene var sensitive for ekstraktene. Det var ingen tydelige tegn på at verken stammene var spesielt sensitive mot ekstraktene fra artene de var isolert fra, eller for ekstrakter fra arter stammene ikke var isolert fra.

6. Referanser:

- ALEXANDER, J. B. & INGRAM, G. A. (1992) Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 249-279.
- BERGSSON, G., AGERBERTH, B., JORNVALL, H. & GUDMUNDSSON, G. H. (2005) Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Febs Journal*, 272, 4960-4969.
- BIRKEMO, G. A., LUDERS, T., ANDERSEN, O., NES, I. F. & NISSEN-MEYER, J. (2003) Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1646, 207-215.
- BOMAN, H. G. (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254, 197-215.
- BRAVO, S. (2000) Occurrence of atypical furunculosis in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 20, 209-211.
- BROGDEN, K. A. K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, 3, 238-50.
- EPAND, R. M. & VOGEL, H. J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1462, 11-28.
- FERNANDES, J. M. O., KEMP, G. D., MOLLE, M. G. & SMITH, V. J. (2002) Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal*, 368, 611-620.
- FERNANDES, J. M. O. & SMITH, V. J. (2002) A novel antimicrobial function for a ribosomal peptide from rainbow trout skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 167-171.
- GUDMUNDSDOTTIR, B. K. & BJORNSDOTTIR, B. (2007) Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine*, 25, 5512-5523.
- HAUG, T., KJUUL, A. K., STENSVAG, K., SANDSDALEN, E. & STYRVOLD, O. B. (2002a) Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 371-385.
- HAUG, T., KJUUL, A. K., STYRVOLD, O. B., SANDSDALEN, E., OLSEN, O. M. & STENSVAG, K. (2002b) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis*

- (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81, 94-102.
- HAUG, T., STENSVAG, K., OLSEN, O. M., SANDSDALEN, E. & STYRVOLD, O. B. (2004) Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, 112-119.
- HELLIO, C., PONS, A. M., BEAUPOIL, C., BOURGOUGNON, N. & LE GAL, Y. (2002) Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 214-219.
- KJUUL, A. K., BULLESBACH, E. E., ESPELID, S., DUNHAM, R., JORGENSEN, T. O., WARR, G. W. & STYRVOLD, O. B. (1999) Effects of cecropin peptides on bacteria pathogenic to fish. *Journal of Fish Diseases*, 22, 387-394.
- MAGNADOTTIR, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
- NAGASHIMA, Y., KIKUCHI, N., SHIMAKURA, K. & SHIOMI, K. (2003) Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 136, 63-71.
- PATRZYKAT, A., ZHANG, L. J., MENDOZA, V., IWAMA, G. K. & HANCOCK, R. E. W. (2001) Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1337-1342.
- RICHARDS, R. C., O'NEIL, D. B., THIBAUT, P. & EWART, K. V. (2001) Histone H1: An antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 549-555.
- SCOTT, M. G. & HANCOCK, R. E. W. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Critical Reviews in Immunology*, 20, 407-431.
- SECOMBES, C. C. J., BIRD, S. S. & ZOU, J. J. (2005) Adaptive immunity in teleosts: cellular immunity. *Developments in biologicals*, 121, 25-32.
- SMITH, V. J., FERNANDES, J. M. O., JONES, S. J., KEMP, G. D. & TATNER, M. F. (2000) Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 243-260.
- SMITH, V. J. F. J. M. O. (2008) Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System. IN ZACCONE, G. (Ed.) *Fish Defenses*. Science Publishers.

- SUBRAMANIAN, S., MACKINNON, S. L. & ROSS, N. W. (2007) A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 148, 256-263.
- VORLAND, L. (2001) Naturlig forekommende antimikrobielle peptider-lovende nye antibiotika, eller ris til egen bak? *Tidsskrift for den Norske lægeforening*, 121, 3191.
- ZASLOFF, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.

<http://www.bbcm.unic.trieste.it/~tossi/search.htm>; undersøkt i desember 2003)

Abbas, A. K., Lichtman, A. H.; Basic Immunology 2001