

# Huwelijk van vis en microbe

TEKST Arno van 't Hoog

FOTOGRAFIE Janny Bosman, Kazakov Maksim, Huub Op den Camp, Daniel Petrsco en Andreas Terlaak

In de kieuwen van vissen leven bacteriën die giftig ammonia omzetten in onschadelijk stikstofgas. Dit ontdekten Nijmeegse wetenschappers. De bacteriën leven opmerkelijk genoeg binnenin de cellen van de vis. Deze bijzondere symbiose was nog niet eerder gezien en de onderzoekswereld heeft nog moeite om het te geloven.

Zo op het eerste gezicht is er geen relatie met vis te ontdekken in de laboratoria van Huub Op den Camp bij de afdeling microbiologie van de Radboud Universiteit in Nijmegen. Wel staan er tientallen kweekreactoren: glazen vaten van een liter of drie, die worden geroerd en voorzien van de juiste voedingsstoffen. Sommigen zijn rood en troebel van de microben die erin groeien. Sommige vaatjes staan op een verwarming en zijn bijna te heet om aan te raken. “Voel maar”, zegt Op den Camp, “Deze is 55 graden. Hierin groeit een bacterie afkomstig van een vulkanische bron.”

## Ammonia lozen

Ondanks dat alles draait om het kweken en onderzoek van bacteriën, speelt vis de afgelopen jaren een interessante bijrol in de ontdekking van een aantal bijzondere bacteriesoorten. Het onderzoek is het resultaat van samenwerking van de microbiologen met de onderzoeksgroep van dierfysioloog Gert Flik, die onderzoek doet aan fysiologie en gedrag van vissen.

Gezamenlijk wilden de onderzoeksgroepen meer te weten komen over wat vissen allemaal aan bacteriesoorten met zich

meedragen. Op den Camp: “We hebben bijvoorbeeld het DNA van alle bacteriën in de darm van de karper in kaart gebracht, maar we hebben ook gekeken wat er aan bacteriesoorten leeft in het aquariumfilter dat het water zuivert.”

Een derde onderzoek richtte zich op microben in de kieuwen van karper en zebravis. Kieuwen zijn de plek voor de opname van zuurstof uit het water, maar ze zijn ook de locatie waar de vis stoffen loost, vooral ammonia, een afvalstof die ontstaat bij afbraak van eiwitten en aminozuren. In de kieuwen zitten speciale transporteiwitten die de ammonia vanuit het bloed over de celmembraan duwen, richting het water. Ammonia is in hoge concentraties giftig en de vis moet het efficiënt via de kieuwen zien kwijt te raken.

## Denitrificatie

Ammonia in het bloed van vissen vertoont soms flinke pieken. Als een vis veel voer heeft gegeten is dat een paar uur later duidelijk te zien aan het stijgen van de hoeveelheid ammonia in het bloed. Als je weet hoeveel eiwit visvoer bevat kun je vrij nauwkeurig uitrekenen hoeveel ammonia een vis gaat uitscheiden. Een klein deel

wordt gebruikt om te groeien, de rest belandt in het water. Bacteriën in het biologisch filter van het aquarium zetten de ammonia (NH<sub>3</sub>) vervolgens via een aantal stappen om in nitriet, nitraat en uiteindelijk in het onschadelijk stikstofgas (N<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O). Deze denitrificatie zorgt ervoor dat het water schoon en leefbaar blijft.

Toch leek er bij onderzoek aan de karper iets niet helemaal te kloppen. Bij voerproeven maken karpers minder ammonia dan de berekeningen voorspellen. Een deel van de ammonia lijkt te verdwijnen. Misschien, dachten de onderzoekers, gebeurt er in de kieuwen wel hetzelfde als in het aquariumfilter en zetten kieuwbacteriën de ammonia om in stikstofgas. Dat bleek onder gecontroleerde omstandigheden inderdaad het geval: karpers die niet eten produceren nauwelijks stikstofgas, maar na een maaltijd vertienvoudigt die hoeveelheid.

## Ingesloten

Met DNA-technieken speurden de onderzoekers in de kieuwen met succes naar genen van nitrificerende en denitrificerende bacteriën. Tot slot keken ze onder de elektronenmicroscopie waar die ➤



In de kieuwen van karper zijn symbiotische bacteriën aangetroffen.

stikstof omzettende bacteriën precies zitten. Dat leverde een grote verrassing op.

Op de Camp laat een foto zien van microscopische opname van een stukje vissenkieuw, waarop een bloedvat met bloedcellen is te zien. Vlak ernaast ligt een groep van tientallen bolletjes in twee formaten. “Als je goed kijkt lijkt het erop dat het om twee typen bacteriën gaat. Dat klopt met wat we weten van omzetting van ammonia in stikstofgas. Meestal voeren twee bacteriesoorten afzonderlijke omzettingstappen uit, dus dan zou je twee bacteriën verwachten. Verder zie je dat de bacteriën omsloten zijn door een membraan, ze zitten dus ingesloten in de cel.”

### Symbiose

Het is al met al een nogal bijzondere wetenschappelijke vondst, deze symbiose tussen vis en bacterie. Het manuscript van het onderzoek ging naar *Nature* en *Science*, vertelt Op den Camp, maar het artikel werd door reviewers van die bladen toch niet geaccepteerd. Het heeft volgens Op den Camp enerzijds te maken met ontbrekende puzzelstukjes, anderzijds met ongelof.

Het is bijvoorbeeld nog niet precies duidelijk welke organismen in de kieuwen zitten en welke soort welke omzettingstap verricht.

DNA-onderzoek toont dat het gaat om bacteriesoorten uit de *Nitrosomonas* en *Acidovorax*-familie, die afwijken van verwante soorten die bijvoorbeeld in een aquariumfilter leven.

Het isoleren en onderzoeken van de symbiosebacteriën zou meer antwoorden kunnen geven, maar dat blijkt ingewikkeld omdat het oppervlak van kieuwen vol zit met een dikke laag microbiële flora. Het is vrijwel onmogelijk om symbiosebacteriën uit de kieuwen te halen, zonder besmetting van die andere bacteriesoorten.

Op de Camp: “Een van de echt controversiële zaken is dat de bacteriën in de kieuwen zitten, dus intracellulair. We kregen na de publicatie een mail van een Canadese vispatholoog, die moeite had het te geloven. Hij had in zijn carrière zoveel kieuwen bekeken en hij had dat nog nooit gezien. Nu zijn ze makkelijk over het hoofd te zien en de elektronenmicroscopie heeft de laatste jaren grote vorderingen gemaakt. Wij werken samen met onderzoekers die heel bedreven zijn in elektronenmicroscopie en het maken van zulke gedetailleerde beelden. De vissen die we onderzochten waren niet ziek, de bacteriën zijn dus geen infectie van de kieuwen. Wat we zien is intact, niet beschadigd

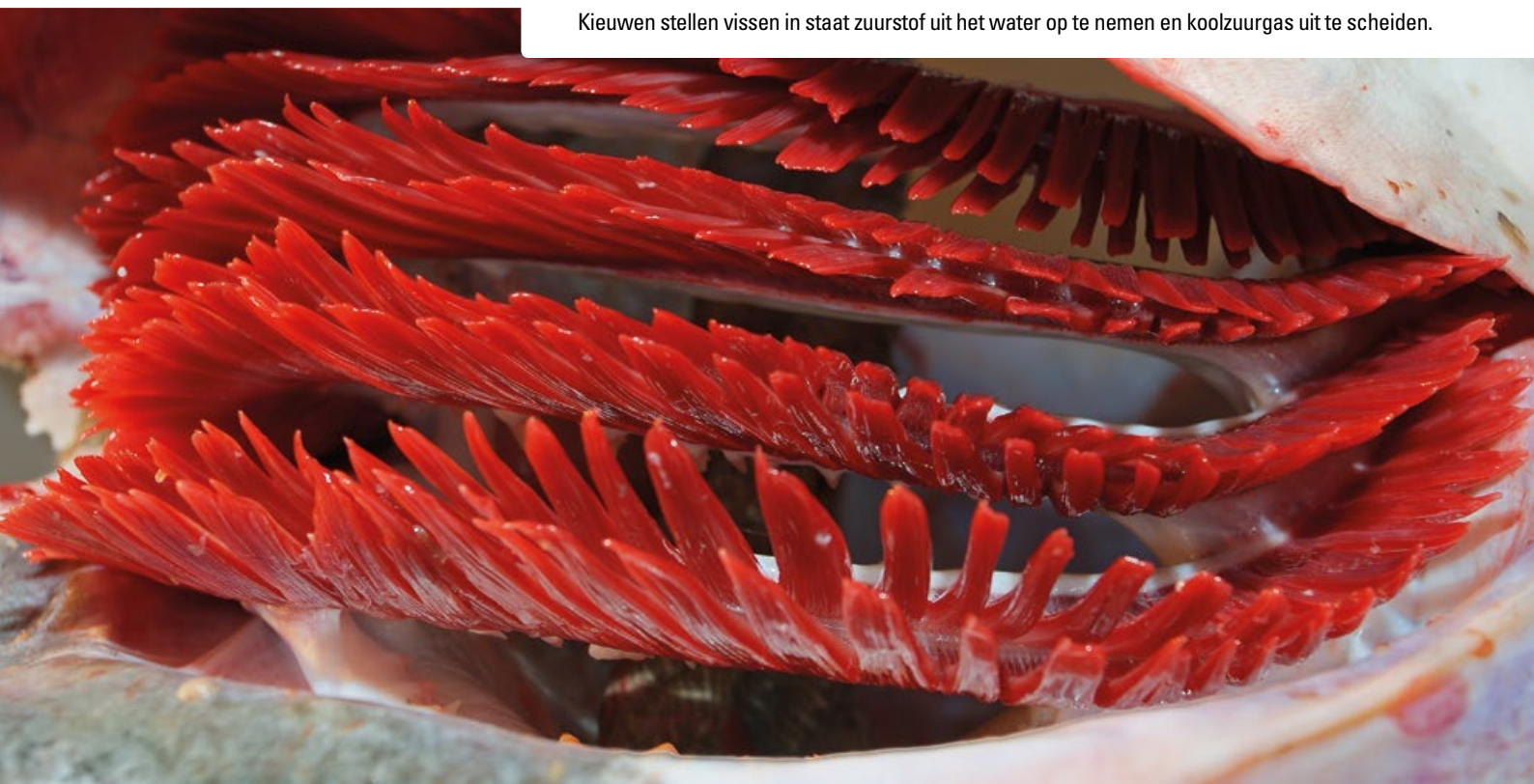
kieuuweefsel met bacteriën erin. Alle data tonen dat het een valide observatie is.”

### Mysterie

Wat vis en bacterie in deze samenwerking elkaar te bieden hebben is niet helemaal duidelijk. De vis wordt verlost van een deel van het giftige ammonia, de bacterie zit dicht bij zijn energiebron: omzetting van ammonia in stikstofgas levert energie voor de aanmaak van bouwstenen als suikers. Mogelijk krijgt de vis een deel daarvan. Maar of vis het beter doet met kieuwbacteriën, dus beter groeit dan zonder, is onduidelijk. Op den Camp verwacht niet dat het een enorm verschil maakt.

Het is ook een vraagteken hoe de vis ervoor zorgt dat de bacteriën niet de overhand krijgen. “Als zulke organismen op deze plek zouden blijven groeien, kunnen ze een probleem opleveren voor de vis. De vis moet ze op een of andere manier in toom houden, of ervoor zorgen dat ze niet te hard kunnen groeien.” Hoe de interactie tot stand komt is helemaal een mysterie. In de kieuwen zitten de bacteriën zo diep in het vissensweefsel dat ze geen contact meer hebben met het water dat door de kieuwen stroomt. Ergens nadat een visje uit het ei komt, moet er een moment zijn dat

Kieuwen stellen vissen in staat zuurstof uit het water op te nemen en koolzuurgas uit te scheiden.



de bacteriën hun intrede doen in de kieuw.

### Karpers en zebravissen

Tot nu toe zijn de symbionten alleen aangetoond bij karpers en zebravissen. Op den Camp: "We zouden graag weten hoe breed deze symbiose voorkomt in de natuur. We hebben wel een poging gedaan om deze bacteriesoorten met DNA-technieken ook aan te tonen in wilde vissen, maar dat ging nogal moeilijk. Soms verloopt wetenschappelijk onderzoek niet zoals je hebt gepland. Het is interessant om dat te onderzoeken, omdat in het wild de leefomstandigheden anders zijn dan in gevangenschap. In gevangenschap

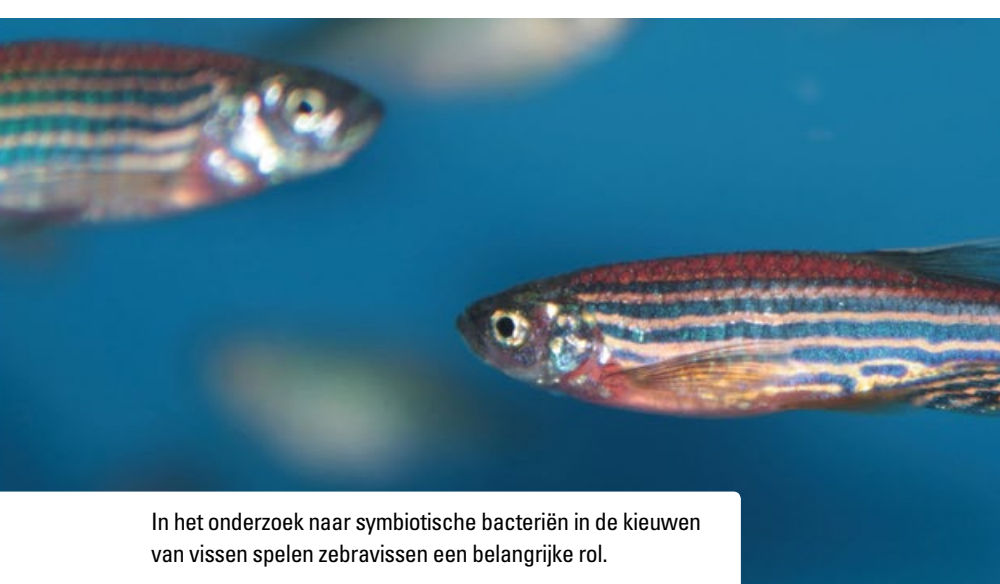
is bijvoorbeeld de voeding meer gelijkmatig verdeeld over de dag."

Visfysiologisch zijn er nog veel zaken te onderzoeken, zegt Op den Camp, bijvoorbeeld of haaien en roggen ook symbiotische bacteriën hebben. Deze soorten voeren hun stikstofafval via de kieuwen af in de vorm van ureum en ook die stof wordt gegeten door verschillende bacteriesoorten.

### Aquacultuur

Eventuele toepassingen zitten volgens de onderzoeker vooral in de aquacultuur. Als het voederregime wordt afgestemd op de aanwezigheid van kieuwbacteriën kan dat de vervuiling van het water

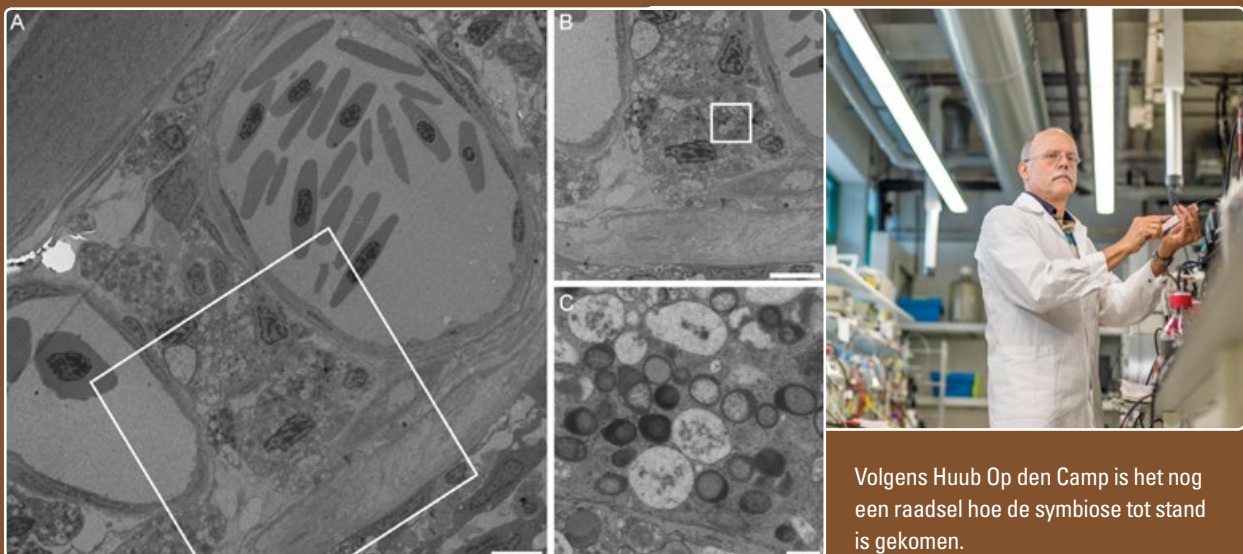
met ammonia misschien terugdringen. Vissen die gedurende de dag kleinere porties voer krijgen, maken waarschijnlijk meer stikstofgas omdat hun bacteriën meer gelegenheid hebben om ammonia te verwerken. Op den Camp: "Dit onderzoek is voor ons succesvol afgesloten. Vanuit de viskweek zou dit verder onderzocht kunnen worden met vis-fysiologische experimenten. Aldus kon duidelijk worden onder welke omstandigheden welk deel van het voer in stikstofgas terecht komt." **V**



#### Geraadpleegde literatuur

Van Kessel MAHJ et al. (2016) Branchial nitrogen cycle symbionts can remove ammonia in fish gills. *Environmental Microbiology Reports*. Epub (DOI: 10.1111/1758-2229.12407)  
Maartje van Kessel (2013) Nitrogen cycling in recirculating aquaculture systems. Proefschrift Radboud Universiteit Nijmegen.

In het onderzoek naar symbiotische bacteriën in de kieuwen van vissen spelen zebravissen een belangrijke rol.



Volgens Huub Op den Camp is het nog een raadsel hoe de symbiose tot stand is gekomen.

Transmissie elektronenmicroscopische-opnames van de kieuwen van een karper. De schaalbalkjes zijn 5 µm, 5 µm en 500 nm in respectievelijk de panels A, B en C.