

Kan klimatförändringen öka smitta av infektionssjukdomar via havsvatten?

Bodil Hernroth, professor i biomedicinsk laboratorievetenskap, Fakulteten för Naturvetenskap, Högskolan Kristianstad.
bodil.hernroth@hkr.se

Betty Collin, universitetslektor i mikrobiologi, Fakulteten för Naturvetenskap, Högskolan Kristianstad.
betty.collin@hkr.se

De pågående klimatförändringarna gör haven allt varmare och surare. Dessutom förväntas perioder av intensiva regn att öka, vilket bidrar till högre koncentrationer av näringsämnen i havsvattnet. Även sjukdomsframkallande bakterier och virus följer med vattnet från land ut i havet. Näringsämnena kommer att göda algblomningarna, vilket resulterar i fler syrefria bottenar. I botten sedimenten finns det naturligt rikligt med metallen mangan. Den frisätts till vattnet vid syrebrist och kan då tas upp av bottenlevande djur. I spåren av detta har vi genom experimentella långtidsstudier sett negativa effekter på immunförsvaret hos både kräfta, mussla och sjöstjärna. Förmågan att eliminera inkräktande bakterier och virus försämrades och djuren blev mer infektionsbenägna. Den tydligaste effekten såg vi då vi tillsatte mangan. Vi undersöker även hur viabilitet och virulens hos sjukdomsalstrande bakterier i havet påverkas och har bl.a. sett att havslevande bakterier av släktet *Vibrio* inte far illa av de förändrade faktorerna i havet, vilket indikerar att de kan få ett övertag på de marina organismerna, vars immunförsvår försvagats.

Pågående miljöförändringar

Den globala uppvärmningen som orsakas av människans utsläpp av växthusgaser, främst koldioxid (CO₂), utgör ett allvarligt hot mot miljön (IPCC, 2014). Inte minst ger det effekter i havet (se Fig. 1). En ökad

mängd CO₂ i atmosfären ger ett ökat tillskott till havet där gasen reagerar med vatten och bildar kolsyra. Det gör att pH sjunker och då reduceras tillgången på kalciumkarbonater (CaCO₃) (Sabine et al., 2004). Denna försurningsprocess som benämns "ocean acidification" har under 1900-talet reducerat pH med 0.1 enheter vilket motsvarar en ökning av vätejonskoncentrationen [H⁺] med ca 30 % .

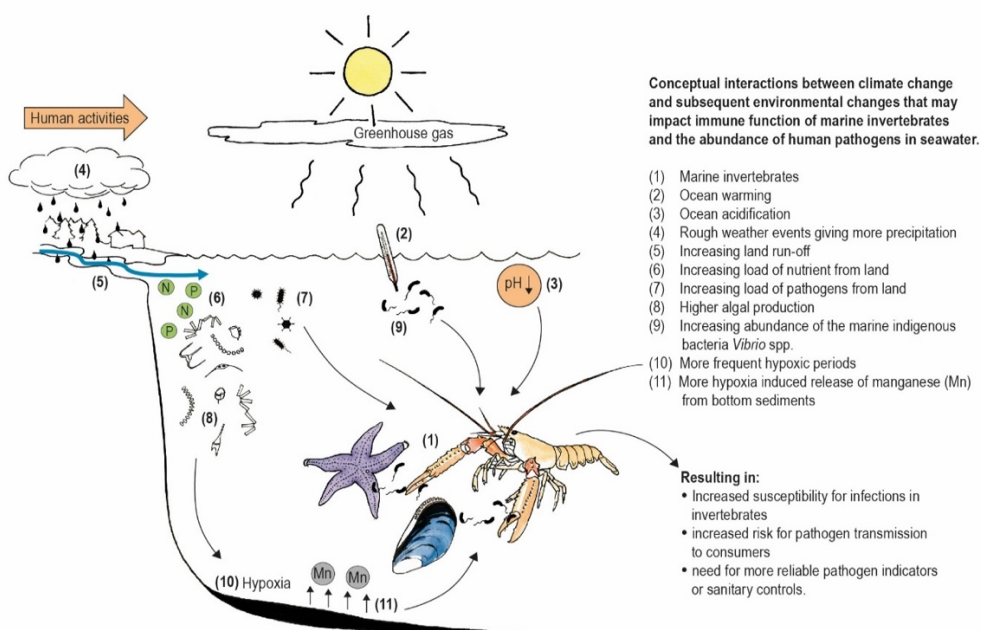


Fig. 1. Illustration av sambanden mellan parametrar som är relaterade till klimatförändringen (ökad temperatur, havsförsurning, landavrinning, syrebrist, tillgängligt mangan) och som påverkar de interaktioner mellan värd och patogener som vi studerar. Illustration Maj Persson.

Dessutom har vi de senaste decennierna fått erfara mer frekventa, massiva algblomningar i många kustområden. När blomningen är över sjunker alger till botten där de bryts ner och orsakar syrebrist (hypoxi). Bottensedimenten är rika på metaller och en av de vanligast förekommande är mangan (Mn). Normalt ligger Mn bundet i oxiderad

form i sedimenten. Vid syrebrist frisätts Mn-joner och kan tas upp i giftiga koncentrationer av bottenlevande djur (Nordahl-Hansen & Bjerregaard, 1995; Baden & Niel, 1998).

Klimatförändringen kommer med stor sannolikhet också att innebära mer intensiva regn (IPCC, 2014) vilket ger en ökad tillförsel av näring från land till hav med ökad algblomning, syrebrist och biotillgängligt Mn som följd.

Med utflödet från land ökar också tillförseln av förorenande patogena bakterier, virus och parasiter. Andra human-patogena mikroorganismer finns naturligt i havsvatten, såsom t.ex. bakterier av släktet *Vibrio*. Med klimatförändringen har man speciellt flaggat för att utbredningen och förekomsten av dessa kommer att öka, inte minst i Östersjöområdet (Lindgren et al., 2012).

Människan har med sitt alltför intensiva fiske tårt hårt på fiskpopulationerna. Detta har i kombination med miljöförändringarna bidragit till en rubbning i ekosystemet och har radikalt reducerat tillgången på matfisk (Jackson et al., 2001). Världen över ökar därför konsumtionen av marina evertebrater men även dessa anses hotade, huvudsakligen beroende på sämre tillgång på kalciumkarbonater som är viktiga komponenter för alla skalbildande organismer.

Syfte

Syftet med studierna har varit att undersöka om de miljöförändringar som vi beskrivit ovan har negativa effekter på djurens immunförsvar med större infektionskänslighet som följd. Därmed är det också viktigt att veta om patogena mikroorganismers förekomst och virulensegenskaper påverkas med den förändrade miljön.

Hur studierna går till

För att studera hur miljöförändringarna påverkar immun- och stressrespons hos marina djur har vi valt att använda djur från tre olika fyla; kräftdjur, tagghudingar och tvåskaliga blötdjur. Som respektive modell för dessa har vi huvudsakligen undersökt havskräfta (*Nephrops norvegicus*), sjöstjärna (*Asterias rubens*) och blåmussla (*Mytilus edulis*).

I de experimentella, hypotesbaserade studierna har vi exponerat djuren för manipulerat havsvatten (Fig. 2). Vi har också infekterat dem genom

matning eller injicering av bakterier eller virus för att undersöka djurens förmåga att eliminera mikroberna (Fig. 3).



Fig. 2. I experimentanläggningarna på Kristinebergs marina forsknings och innovationscenter har vi möjlighet att exponera marina djur under flera månader. Här finns ett rinnande havsvattensystem där inkommande vatten kan manipuleras för att t.ex. likna det klimatscenario som FN:s klimatpanel förutspår skall råda i slutet av detta århundrade. Vattnet kan med ett datorstyrt system t.ex. bubblas med koldioxid (försuras), kvävgas (hypoxi), temperaturregleras och tillsätta mangan.



Fig. 3. Efter exponeringen tas blod och vävnadsprover från djuren för att undersöka stress och immunrespons genom molekylära analyser eller funktionella tester. Dessa jämförs med djur som hålls i icke manipulerat havsvatten (kontroller).

För att studera hur miljöförändringarna påverkar humanpatogena mikroorganismer har vi främst inriktat oss på de parametrar som kan påverka tillförseln av dem från land, såsom nederbörd och säsonsberoende sjukdomsutbrott bland befolkningen. Det har vi gjort genom att använda musslor som ”biologiskt filter” eftersom de filtrerar stora mängder vatten för att få föda och därmed ansamlar mikroorganismer. Studierna har gjorts i olika geografiska områden såsom t.ex. i Indiska oceanen (SIDA-projekt), Medelhavet (EU-projekt), Stilla Havet (postdoc-projekt, Kungliga Vetenskapsakademien) och i våra vatten (EU-projekt, MISTRA-projekt, m.fl.). Vi har sekvenserat hela genomet på ett antal vibriostammar som isolerats från vatten, musslor och sjukhuskliniker från olika geografiska områden och undersökt hur dessa stammar är besläktade och på vilka olika virulensgener de bär. För de experimentella studierna har vi huvudsakligen valt bakterier av släktet *Vibrio* som kan infektera både fisk, skaldjur och människor. Exponering för manipulerat havsvatten har gjorts i 50 ml cellodlingsflaskor, s.k. mikrokosmstudier som vi har möjlighet att utföra i inkubatorer på Högskolan Kristianstad. Vi använder odlingstekniker och molekylär identifiering för att följa överlevnad, virulensuttryck (t.ex. deras förmåga att hemolysa blodceller) etc. under olika miljöbetingelser.

Kort sammanfattning av uppnådda resultat

Effekter på immunförsvaret

Våra experimentella studier har visat att havsförsurning vid den nivå som förutspått råda i slutet av detta århundrade (-0.4 enheter; IPCC, 2014) har negativ effekt på immunförsvaret hos kräfta, sjöstjärna och mussla. Efter ca fyra månaders exponering var de inte längre kapabla att bibehålla homeostasen och pH i deras blodvätska sjönk. Hos kräftor kunde vi se tecken på oxidativ stress. Antalet immunaktiva blodceller och deras förmåga att fagocytera sjönk markant (Hernroth et al., 2013), så också hos sjöstjärnor (Hernroth et al., 2011). Musslornas blodcellsantal påverkades inte men vi kunde se att de hade sämre förmåga att eliminera injicerade *Vibrio tubiashii* (Asplund et al., 2013). De antimikrobiella peptider som produceras på musslans gälar fick sämre förmåga att döda

V. parahaemolyticus (Hernroth et al., 2016). Sammantaget indikerar detta att djuren kan bli mer mottagliga för infektioner. Hos kräftor kunde *V. parahaemolyticus* t.o.m. tillväxa i levervävnaden, vilket blev än tydligare då de utsattes för försurning i kombination med hypoxi (Hernroth et al., 2015).

Den tydligaste effekten på immunförsvaret såg vi då Mn tillsattes i koncentrationer som är realistiska att finna i syrefattiga bottenvatten. Sjöstjärnor ackumulerade inte metallen i sin blodvätska eller levervävnad i samma utsträckning som musslor och i kräftorna var ackumuleringen än högre. Det fanns ett tydligt samband mellan immunrespons och den ackumulerade koncentrationen. Hos sjöstjärnor stimulerar Mn nybildningen av blodceller (Oweson et al., 2008) medan metallen har motsatt verkan med reducerat antal blodceller hos både kräftor (Hernroth et al., 2004) och musslor (Oweson & Hernroth, 2009). Detta återspeglar också deras förmåga att eliminera *V. parahaemolyticus* som injicerats i djuren. Sjöstjärnor kunde opåverkat eliminera bakterierna medan musslor hade större svårighet och i kräftorna kunde bakterierna till och med tillväxa. Vi fann att orsaken till det låga antalet blodceller i kräftor är att Mn inducerar apoptos (programmerad celldöd) i de stamceller som behövs för nybildning av blodcellerna (Oweson & Hernroth, 2009).

Effekter på humanpatogena mikroorganismer

Många studier har visat ett samband mellan förhöjda vattentemperaturer och sjukdomsutbrott, speciellt med avseende på *Vibrio*-infektioner (Collin & Rehnstam-Holm, 2011; Vezzulli et al., 2013; Vezzulli et al., 2016). Klimateffekter med hög nederbörd har också visats gynna förekomsten av *Vibrio* och tillför dessutom mer tarmbakterier till kustvattnet (Hernroth et al., 2002; Collin et al., 2008; Collin et al., 2012). Våra studier har visat att *Salmonella enterica* kan föröka sig i musslor vid ca 20 °C. Å andra sidan har en sådan temperatur visat positiv effekt på musslornas immunförsvaret (Hernroth, 2000a). Då både bakterie- och immunförsvaret gynnas av temperaturen är bakteriens virulens av stor betydelse för utgången av infektionen. Musslorna kunde lätt eliminera de lågvirulenta stammarna av *S. enterica* medan de högvirulenta t.o.m. dödade musslorna (Hernroth, 2000b).

Humana virus kan inte replikera i marina djur men kan vid låga temperaturer förbli intakta och behålla sina virulensegenskaper i flera veckor om de tagits upp av musslor eller ostron (Hernroth & Allard, 2007). Förmodligen kan skaldjuren bekämpa dem bättre under den varma årstiden då de är mer immunologiskt aktiva (Hernroth et al., 2012).

Humana virus som t.ex. calicivirus (Norwalk-virus) orsakar vinterkräksjuka och dessa hittar vi i musslor under den kalla årstiden (Hernroth et al., 2002). Vi har också med molekylära markörer kunnat följa virusets utbrott bland människor i Göteborg till musslor som insamlats nedströms stadens reningsverk (Nenonen et al., 2008). Generellt skulle man kunna anta att den globala uppvärmningen skulle kunna missgynna humana virus som lättare håller sig intakta i kallt vatten. Å andra sidan kan de negativa effekter vi sett på djurens immunförsvar då de utsätts för försurning, hypoxi och Mn, som ju också följer med klimatförändringen, motverka detta fenomen.

Gällande huruvida *Vibriobakteriernas* virulens påverkas av klimatförändringarna i form av pH-sänkning kan vi i de preliminära resultaten inte se några signifikanta skillnader på bakteriernas överlevnad, viabilitet eller virulensuttryck vid det pH-värde som beräknats råda vid år 2100 jämfört med dagens. Detta indikerar att bakterierna förblir opåverkade av havsförsurningen, vilket kan leda till att de får ett övertag på de marina djuren som får försämrat immunförsvar.

I stora drag kan vi sammanfatta att de storskaliga långtidsförändringarna som följer i klimatförändringen spår har potential att förändra ställningarna mellan patogena mikroorganismer och värdjur. Resultaten har visat att havsförsurning och ökad koncentration av Mn ger tydliga negativa effekter på djurens immunförsvar medan många patogena mikroorganismer inte påverkas negativt, utan snarare gynnas av ökad temperatur och näring från land. Det betyder att med klimatförändringen kan vi förvänta oss att djurens försvagade immunförsvar inte kan bemöta den ökade förekomsten av patogener. Dessa kan då spridas vidare till konsumenter i näringskedjan, så också till människor som konsumerar t.ex. skaldjur. Resultaten är viktiga för att förstå och motverka negativa effekter på bestånden av marina djur. Resultaten bör också ligga till grund för framtida utveckling av den sanitära kontrollen av skaldjur och badvatten.

Fortsatta studier

Nu studeras hur olika miljöfaktorer påverkar *Vibrio*. Genom att extrahera mRNA från dem kan man följa vilka gener de använder i olika miljöer och vi hoppas på det sättet få svar på vilka faktorer som påverkar deras virulens. Vi undersöker också bottensedimentens betydelse för *vibriobakteriers* övervintring.

Samverkan

De pågående studierna genomförs huvudsakligen i samarbete med forskare från Göteborgs Universitet och Karolinska Institutet. Som framgår av referenslistan har vi deltagit i ett brett nätverk av många internationella och nationella forskningsprojekt. Vi har igenom EU-projekt visat att våra resultat har potential att påverka framtida utveckling av sanitär kontroll av kustvatten och skaldjur (Formiga-Cruz et al., 2002, 2003) och vill med en nyligen publicerad review-artikel aktualisera betydelsen av att utveckla kontrollerna som en konsekvens av klimatförändringen (Hernroth & Baden, 2018).

Inom våra projekt deltar studenter både inom VFU och examensarbeten. Det rör sig om allt från pilotstudier och optimering av experiment till litteratursökningar. Det senaste examensarbetet ingick i delprojektet om hur vibriobakteriers viabilitet och virulens påverkas av temperatur, pH och tillgång på näringsämnen i form av växtplankton.

English summary

Studies presented in this article investigate the effects of climate change on marine organisms. The temperature in the waters tend to rise and the pH to become more acid. The precipitation is expected to be more intense which will increase the concentration of nutrients and pathogenic bacteria and viruses in the seawater. The free nutrients will feed the algae, and thereby the algal blooms which results in anoxic bottom sediments. Manganese ions, which in oxic conditions are bound to the sediment, will be released and available to organisms in anoxic conditions.

In our experimental studies we have seen negative effects on the immune systems in lobsters, starfish and mussels, with less ability to eliminate pathogenic bacteria and viruses. The organisms were even more susceptible to pathogens when we added manganese ions. We are also investigating the viability and virulence of the marine bacteria *Vibrio* spp. They are on the contrary not affected by the changed environmental factors, which indicates that they might have a large advantage on the marine organisms due to the impaired functions of the immune systems of the latter.

Referenser

- Baden, S.P., Neil, D.M., (1998). Accumulation of manganese in the haemolymph, nerve and muscle tissue of *Nephrops norvegicus* (L.) and its effect on neuromuscular performance. *Comp. Biochem. Physiol.* 199A:351–359.
- Asplund, M.E., Baden, S. P., Russ, S., Ellis, R. P., Gong, N. & Hernroth, B.E. (2014). Ocean acidification and host-pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. *Environ. Microbiol.* 16(4):1029-1039
- Collin, B., Pinnell, L.J., Tallman, J.J., & Turner, J.W, (2016). Draft genome sequences of one marine and one clinical *Vibrio parahaemolyticus* strain, both isolated in Sweden. *Genome Announc.* 4(5):e01196-16
- Collin, B., Rehnstam-Holm, A-S. & Hernroth, B. E. (2008). Faecal contaminants in bivalves from Maputo Bay, Mozambique: Seasonal distribution, pathogenesis and antibiotic resistance. *The Open Nutrition Journal* 2:86-93.
- Collin, B., Rehnstam-Holm, A.-S. (2011). Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78:306-313.
- Collin, B., Rehnstam-Holm A.-S., Lindmark, B., Pal, A., Wai, S. & Hernroth, B. E (2012). The origin of *Vibrio cholerae* influences uptake and persistence in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *J. Shellfish Res.* 31:1-6.
- Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D. N., Henshilwood, K., Allard, A. K., Hernroth, B., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M. D. & Girones, R. (2002). Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden and the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5990-5998.
- Formiga-Cruz, M. G., Allard, A. K., Conden-Hansson, A.-C., Henshilwood, K., Hernroth, B. E., Jofre, J., et al., (2003). Evaluation of potential indicators and their applicability to diverse geographical areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1556-1563.

- Hernroth, B., Hansson-Condén, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R. & Allard, A. (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4523-4533.
- Hernroth, B. (2003a). The influence of temperature and dose on antimicrobial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunol.* 14:25-37.
- Hernroth, B. (2003b). Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. *Fish & Shellfish Immunol.* 14:93-104.
- Hernroth, B., Baden, S., Holm, K., Andrén, T. & Söderhäll, I. (2004). Manganese induced immune suppression of the lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquat. Toxicol.* 70:223–231.
- Hernroth, B. & Allard, A., (2007). The persistence of infectious Adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). *Int. J. Food Microbiol.* 113:296-302.
- Hernroth, B., Baden, S., Thorndyke, M. & Dupont, S. (2011). Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. *Aquat. Toxicol.* 103:222-224.
- Hernroth, B., Nilsson Sköld, H., Wiklander, K., Jutfelt, F. & Baden, S. (2012). Simulated climate change causes immune suppression and protein damage in the crustacean *Nephrops norvegicus*. *Fish & Shellfish Immunol.* 33:1095-1101.
- Hernroth, B., Krång, A.-S. & Baden, S. (2015). Bacteriostatic suppression in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) exposed to manganese or hypoxia under pressure of ocean acidification. *Aquat. Toxicol.* 159:217–224.
- IPCC (2014). *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK/New York, NY, USA.
- Jackson J. C. B, Kirby, M. X., Berger, W. H., Bjorndal, K. A., Botsford, L. W., et al., (2001). Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293:629-638

- Lindgren, E., Andersson, Y., Suk, J. E., Sudre, B. & Semenza, J. C. (2012). Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change. *Science* 336:418-419.
- Nenonen, N. P, Hannoun, C., Horal, P., Hernroth, B., & Bergström, T. (2008). Tracing Norovirus Outbreak Strains in Mussels collected near Sewage Effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2544-2549.
- Nordahl-Hansen, S. & Bjerregaard, P. (1995.) Manganese kinetics in the sea star *Asterias rubens* (L.) exposed via food or water. *Mar. Poll. Bull.* 31:127–132.
- Oweson, C., Baden, S. & Hernroth, B. (2006). Manganese induced apoptosis in haematopoietic cells of the lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). *Aquat. Toxicol.* 77:322–328.
- Oweson, C., Sköld, H., Pinsino, A., Matranga, V. & Hernroth, B. (2008). Manganese effects on the haematopoietic cells and circulating haemocytes of *Asterias rubens* (L). *Aquat. Toxicol.* 89:75–81.
- Oweson, C. & Hernroth, B. (2009). A comparative study on the influence of manganese on the bactericidal response of marine invertebrates. *Fish & Shellfish Immunol.* 27:500–507.
- Thorell, K., Collin, B., Hernroth, B. & Sjöling, Å. (2016). Complete genome sequences of two marine *Vibrio cholerae* strains isolated from the south coast of Sweden. *Genome Announc.* 4(5):e011118-16
- Vezzulli, L., Colwell, R.R. & Pruzzo, C. (2013). Ocean warming and spread of pathogenic Vibrios in the aquatic environment. *Microb. Ecol.* 65(4):817-25.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., et al., (2016). Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 23;113(34):E5062-71.