

# tiny earth

En verdensomspændende jagt på ny antibiotika

## Pixiudgave Baggrund

Frederikke Dybdahl Andersen  
Thomas Tørring  
Simon Hernandez  
Tiffany Tsang  
Carol Bascom-Slack  
Nicole Broderick  
Jo Handelsman



AARHUS  
UNIVERSITET

novo  
nordisk  
fonden

# Indhold

<b>Introduktion.....</b>	<b>4</b>
<b>Kapitel 1: Bakteriernes planet.....</b>	<b>5</b>
<b>Mikroberne omkring os.....</b>	<b>5</b>
<b>Bakteriernes planet.....</b>	<b>5</b>
<b>Kom i gang med Tiny Earth.....</b>	<b>5</b>
<b>Øvelse 1: Hvordan ville du overføre mikrober fra en jordprøve til et vækstmedie? .....</b>	<b>6</b>
<b>Kapitel 2: Jord er ikke bare jord.....</b>	<b>7</b>
<b>Jordens rolle i økosystemet.....</b>	<b>7</b>
<b>Karakteristik af jord .....</b>	<b>7</b>
<b>Antibiotika og bakterier isoleret fra jord .....</b>	<b>8</b>
<b>Øvelse 2: Indsamling af jordprøver.....</b>	<b>9</b>
<b>Kapitel 3: Bakterievækst og -kulturer .....</b>	<b>10</b>
<b>Bakteriers vækst.....</b>	<b>10</b>
<b>Dyrkning af bakterier .....</b>	<b>11</b>
<b>CFU' er og bakteriekolonier .....</b>	<b>11</b>
<b>Øvelse 3: Find en metode til at isolere bakteriekolonier fra din jordprøve .....</b>	<b>13</b>
<b>Kapitel 4: Bakterier er også, hvad de spiser .....</b>	<b>14</b>
<b>Livets byggesten .....</b>	<b>14</b>
<b>Vækstmedie og vækstbetingelser .....</b>	<b>14</b>
<b>Øvelse 4: Valg af vækstmedie og vækstforhold .....</b>	<b>15</b>
<b>Kapitel 5: Kolonier vs. flydende kulturer .....</b>	<b>16</b>
<b>Bakteriekoloniers morfologi .....</b>	<b>16</b>
<b>Vækstfaser.....</b>	<b>17</b>
<b>Bakteriers vækstfase på fast medie .....</b>	<b>18</b>
<b>Øvelse 5: Isolér unikke kolonier til test for antibiotikaproduktion .....</b>	<b>19</b>
<b>Kapitel 6: Mød ESKAPE-patogenerne.....</b>	<b>20</b>
<b>Infektionssygdomme i et historisk perspektiv .....</b>	<b>20</b>
<b>Valg af test organisme .....</b>	<b>20</b>
<b>ESKAPE patogenerne .....</b>	<b>20</b>
<b>Ikke alle bakterier er sundhedsskadelige.....</b>	<b>21</b>
<b>Øvelse 6: Mod ESKAPE-patogenerne .....</b>	<b>22</b>

<b>Kapitel 7: Antibiotika: Opdagelse, opbygning og virkemåde.....</b>	<b>23</b>
Manden der opdagede antibiotika .....	23
Antibiotikas opbygning.....	23
Antibiotika – biosyntese .....	24
Hvorfor antibiotika dræber bakterier (og ikke os) .....	25
Øvelse 7: Design en metode til at identificere antibiotikaproducerende isolater .....	26
<b>Kapitel 8: Lær dine isolater at kende .....</b>	<b>27</b>
Klassificering af mikrober .....	27
Molekylær fylogeni.....	27
16S rRNA gen sekvens data .....	28
Mikrober i mikroskopet.....	29
Farvning af bakteriers cellevæg .....	29
Øvelse 8: Indledende identificering af antibiotikaproducerende bakterier.....	30
<b>Kapitel 9: I sidste ende handler det hele om kemi.....</b>	<b>31</b>
Ekstraktion af sekundære metabolitter eller naturstoffer .....	31
Fra isolat til molekyle .....	31
Øvelse 9: Test et organisk ekstrakt fra dit isolat for antimikrobiel aktivitet .....	31
<b>Kapitel 10: Resistens mod antibiotika .....</b>	<b>32</b>
Antibiotikaresistens .....	32
Hvordan bliver bakterier resistente?.....	32
Antibiotikaresistens i miljøet .....	33
<b>Kapitel 11: "Klassisk" vs. "moderne" klassificering .....</b>	<b>35</b>
Kliniske laboratorier og diagnose .....	35
Specialiseret medie og enzymologi .....	35
Klassisk eller moderne fremgangsmåde .....	35
Øvelse 11: Biokemisk karakterisering af isolater.....	36
<b>Kapitel 12: Bakterier i kontekst.....</b>	<b>37</b>
De gode vs. de onde bakterier .....	37
Afsluttende bemærkning .....	37

# Introduktion

Tiny Earth er et globalt netværk af forskere, lærere og elever, der alle samarbejder om at finde ny antibiotika fra jordbakterier. Tiny Earth har fire mål:

**Tiny Earth's første mål er at oplyse befolkningen om antibiotikaresistens og konsekvenserne heraf.**

**Tiny Earth's andet mål er at informere om jorderosions betydning for vores fremtid.**

**Tiny Earth's tredje mål er at vise elever autentisk naturvidenskab ved at involvere dem i et forskningsprojekt.**

**Tiny Earth's fjerde mål er at finde ny antibiotika!**

## Kort om Tiny Earth

Navnet Tiny Earth henviser til både stort og småt - små mikroorganismer på en stor planet, mange individuelle forskere i et stort globalt netværk samt mange små opdagelser, som tilsammen kan gøre en kæmpe forskel.

I Tiny Earth samarbejder vi om ét fælles mål. Alle vores fælles opdagelser bliver samlet i én fælles database. Det er så omfattende en database, at det havde været umuligt for én enkelt forsker at gøre os kunsten efter. Alt denne data vil gøre os meget klogere – hvad end vi finder ny antibiotika eller ej. Når vi samler data fra hele verden, kan vi nemlig lære noget om tendenser. Tendenser kan hjælpe os med at finde ud af, i hvilke regioner eller i hvilke biologiske miljøer vi oftest finder flest antibiotikaproducerende bakterier. Naturvidenskabelig forskning er i forvejen kendetegnet ved samarbejde på kryds og tværs af forskellige forskningslaboratorier – Men Tiny Earth tager denne model skridtet videre ved at involvere tusindvis af elever, studerende og lærere verden over i jagten på ny antibiotika og jagten på ny viden om antibiotika.

# Kapitel 1: Bakteriernes planet

## Mikroberne omkring os

Mikrober findes overalt i naturen og i alle slags miljøer. Mikrobernes omfattende tilstedeværelse og deres alsidighed er et resultat af et næsten 4 milliarder år langt samarbejde med vores planet. Mikroberne har spillet altafgørende roller i udviklingen af både vores planet og dens beboere. Mikroberne har også påvirket Jordens biogeologiske systemer. De er nemlig aktive spillere i recirkulationen af det livsnødvendige kulstof, kvælstof, svovl og fosfor også kaldet stofkredsløb. Uden bakteriernes hjælp ville andre systemer eller organismer ikke kunne optage stofferne. Vi kan f.eks. takke mikroberne for, at vi mennesker kan optage livsnødvendig kulstof og kvælstof. Uden mikroberne ville kulstof og kvælstof nemlig kun eksistere i former, vores kroppe ikke kan optage. Mikrober, der levede for mere end 2 milliarder år siden, producerede den oxygen, der fik Jordens atmosfære til at skifte fra anaerob (ilt-fri) til aerob (ilt-rig). De hjalp med at skabe ozonlaget, der beskytter Jorden fra UV stråling. Mikrober spiller måske endda en rolle i dannelsen af vanddråber i skyer, som i sidste ende bliver til regn.

## Bakteriernes planet

Man anslår, at det samlede antal prokaryoter i alt jord på kloden nærmer sig  $26 \times 10^{28}$ . Dette enorme antal celler tydeliggør, at disse mikrober kollektivt har en enorm påvirkning på vores planet. I dette undervisningsforløb vil vi særligt fokusere på bakterier da:

- Bakterier er massivt til stede næsten overalt på Jorden - på mange måder lever vi på bakteriernes planet;
- Bakterier er gode redskaber i forskning sammenlignet med andre organismer, da de er relativt simple, men de laver meget specialiserede kemiske stoffer, som vi mennesker kan udnytte og anvende til mange forskellige formål;
- Bakterier har stor indflydelse på vores sundhed – nogle forårsager sygdomme, mens andre beskytter os mod angreb fra sundhedsskadelige bakterier

## Kom i gang med Tiny Earth

Som deltager i projektet Tiny Earth vil du blive en del af et forskningsprojekt, der koncentrerer sig om jordbakterier og deres potentiale. I forløbet vil vi forsøge at få besvaret en række spørgsmål angående mikrobiel økologi og mikroorganismers rolle i naturen.

Igennem Tiny Earth forløbet vil I blive introduceret for mange grene af naturvidenskaben lige fra cellebiologi og biokemi til analytisk kemi og genetik. I vil benytte en lang række

forskellige redskaber indenfor disse felter til at blive klogere på biodiversiteten og bioaktiviteten i jeres jordprøver. I vil gennem forløbet skulle forholde jer kritisk til jeres resultater og koble dem til jeres nye viden om mikrobielle interaktioner og funktioner. I vil også skulle overveje, hvordan jeres resultater kan bidrage til at styrke vores fælles viden om feltet som helhed.

## Referencer

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. Proc Natl Acad Sci U S A 95(12):6578-6583

## Øvelse 1: Hvordan ville du overføre mikrober fra en jordprøve til et vækstmedium?

- 1) Forestil jer, at I får udleveret en jordprøve af jeres lærer. Hvordan kan I adskille mikroberne fra jorden og få dem til at gro på et vækstmedium?
- 2) Hvordan vil I finde ud af, om mikroberne er levende?
- 3) Hvordan vil I finde ud af, om mikroberne interagerer med hinanden?

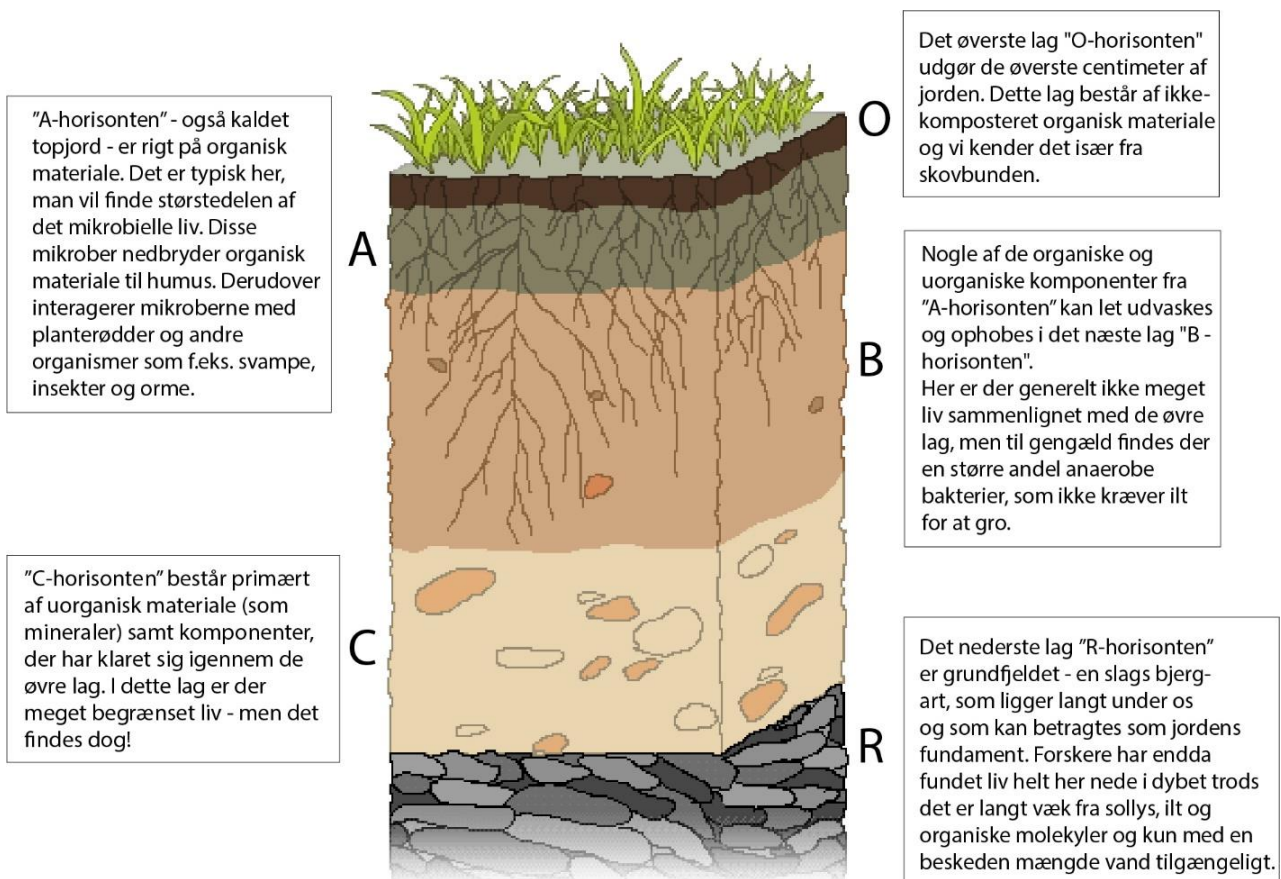
# Kapitel 2: Jord er ikke bare jord

## Jordens rolle i økosystemet

Jord dækker store dele af Jorden og understøtter skove og planter, der producerer over halvdelen af planetens ilt og 95% af vores mad. Jordens sundhed påvirker biodiversiteten, bioaktiviteten og biomassen på vores planet, men den er også sårbar over for naturlige og menneskeskabte påvirkninger som landbrug og forurening.

## Karakteristik af jord

De vigtigste parametre, som karakteriserer en jordtype, er jordens fysiske struktur, kemiske sammensætning og associering med planterødder eller andre organismer. Jord i kontakt med rødder kaldes rhizosfæren, hvor bestemte mikroorganismer trives på grund af det unikke miljø skabt af rødderne.



**Figur 2-1.** Jordhorisonter: Jord bliver opdelt i forskellige lag kaldet horisonter. Horisonterne varierer de deres kemiske og fysiske karakteristika. Mængden af organiske materiale og graden af mikrobielt liv vil falde, som vi bevæger os ned igennem horisonterne. Vi vil derimod opnå en højere grad af uorganisk materiale som mineraler og sten.

Billede: [http://en.wikipedia.org/wiki/Soil\\_horizon](http://en.wikipedia.org/wiki/Soil_horizon)

Den fysiske struktur af jord er bestemt af sammensætningen af tre forskellige typer jordpartikler: sand, silt og ler. Jord, som er domineret af store grove partikler (sand), er mere permeabel end finere jord, hvilket gør vandpassage og udsivning af næringsstoffer lettere og hurtigere. Det vil typisk resultere i en mere næringsfattig jord og derfor også begrænse mængden af liv. Jord bestående af fine partikler (silt og ler) vil på den anden side være mindre iltet. Dette betyder, at væksten af mikroorganismer, som er afhængige af ilt, typisk kun vil kunne findes i overfladen. Et tværsnit af jord viser afgrænsede lag, som kaldes horisonter (figur 2-1). Generelt falder mængden af både organisk materiale, lys og ilt jo dybere ned i jorden, vi kommer.

Jordens pH-værdi har stor indflydelse på det mikrobielle liv. Mikrober og planter kan ikke tåle store udslag i pH-værdien, og de kan derfor kun overleve indenfor et snævert pH-range. Som vi nærmer os de nederste jordlag, vil vi observere, at det mikrobielle liv er påvirket drastisk af begrænset ilt, næring, sollys og en ændring i tryk. Det er vigtigt at være opmærksom på, hvilket jordlag jeres bakterier er isoleret fra, da det har stor indflydelse på deres vækstbetingelser. Ved at opnå en forståelse for de miljømæssige faktorer, der påvirker mikroberne, kan vi nemmere opstille hypoteser om, hvor vi forventer at finde den største biodiversitet.

## **Antibiotika og bakterier isoleret fra jord**

Jord rummer en enorm diversitet af mikroorganismer, med op til titusindvis af bakteriearter og over en milliard celler per gram jord. Gennem evolutionen har jordbakterier udviklet evnen til at producere molekyler, der hjælper dem med at overleve i deres konkurrenceprægede miljø. Disse molekyler, kaldet sekundære metabolitter, inkluderer pigmenter, toksiner og antibiotika.

Sekundære metabolitter er ikke livsnødvendige for bakterien, men de forbedrer dens overlevelseschancer. Antibiotika er en type sekundær metabolit, der hæmmer andre mikroorganismers vækst, hvilket hjælper bakterierne med at reducere konkurrence om næringsstoffer. De antibiotika, vi bruger til at bekæmpe sygdomme, stammer hovedsageligt fra jordbakterier.

Der er stadig et stort potentiale for at opdage nye antibiotika i jorden. Derfor fokuserer dette projekt på at indsamle jordprøver og undersøge bakteriernes unikke egenskaber i laboratoriet, hvilket kan bidrage til at udvide vores forståelse af jordbakterier og deres anvendelsesmuligheder.



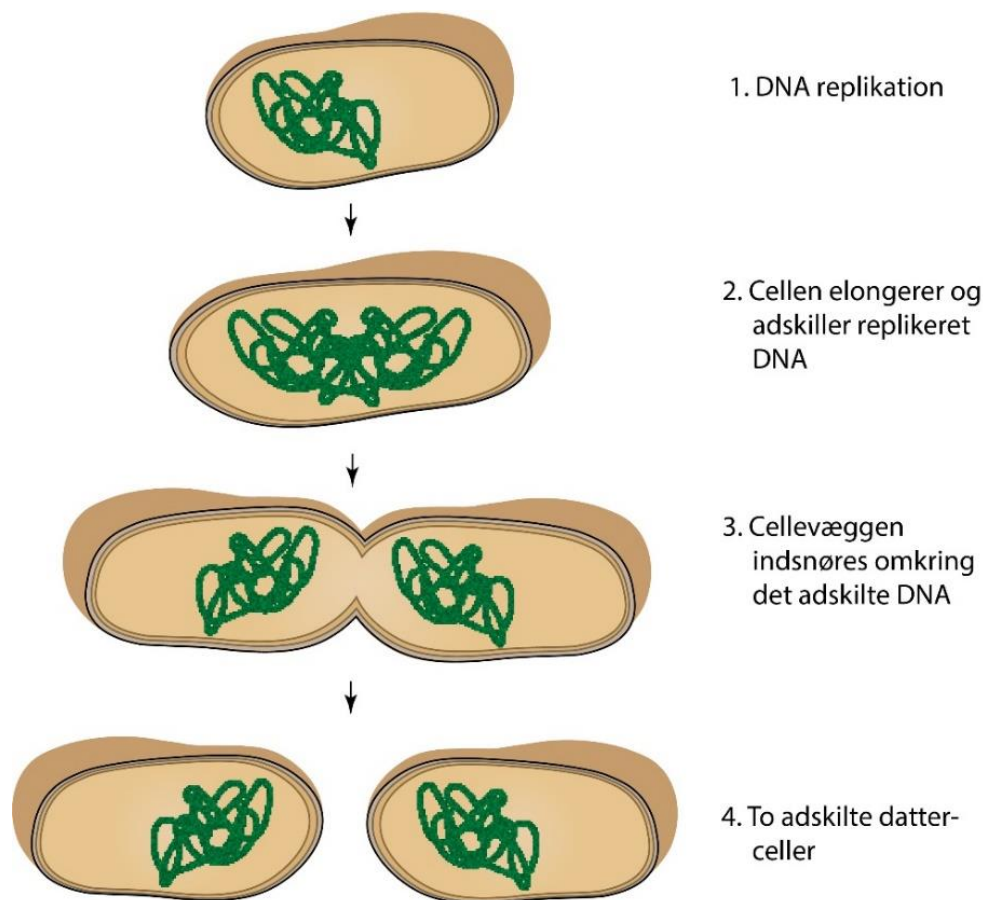
## Øvelse 2: Indsamling af jordprøver

- 1) Hvor vil I forvente at kunne finde de mest unikke og forskelligartede mikrobielle samfund? Overvej f.eks. jordtyper/miljøer/særlig natur. Definér hvad I forstår ved begreberne unik og forskelligartet.
- 2) Hvor vil I indsamle jord og hvorfor?
- 3) Hvilke tanker gør I jer om forekomsten af bakterier i jeres jordprøve (antal, diversitet mm.) og hvorfor? Hvordan vil I teste det i laboratoriet?

# Kapitel 3: Bakterievækst og -kulturer

## Bakteriers vækst

Selvom bakterier vokser i størrelse inden de deler sig, refererer mikrobiologer normalt til vækst som en stigning i antallet af individer i en bakteriepopulation. Vækst betyder derfor reproduktion, når vi taler om encellede organismer. Reproduktion er afgørende for overlevelse, og bakterier kan under optimale forhold reproducere sig eksponentielt, hvilket gør dem yderst overlevelsesdygtige.



**Figur 3-1.** Illustration af celledeling ved binær fission. Hver succesfuld celledelingsrunde fordobler antallet af celler i en population. Det resulterer i eksponentiel vækst under optimale vækstforhold.

Bakteriers vækstcyklus styres af signaler, der afgør, hvornår cellen skal dele sig. Processen begynder med DNA-replikation, hvor bakterien kopierer sit kromosom. Herefter vokser cellen, og de to kromosomer placeres i hver sin ende. En skillevæg dannes i midten, og cellen deles i to genetisk identiske datterceller gennem en proces kaldet binær fission. Nogle bakterier formerer sig ved budding, men resultatet er stadig genetisk identiske datterceller.

## Dyrkning af bakterier

I laboratoriet dyrkes bakterier som kulturer i et vækstmedie. Vækstmediet forsyner bakterierne med den næring, der er nødvendig, for at bakterierne kan overleve og reproducere. Vækstmediet kan være flydende eller det kan være stivnet med f.eks. agar. Bakteriernes vækst kan afhænge af parametre som temperatur, fugtighed, ilt og tilstedeværelse af næring. I tilfælde af at man opdager en ny organisme, er det derfor nødvendigt at afprøve og vurdere forskellige vækstforhold og skræddersy dem til at passe til den enkelte organismes behov.

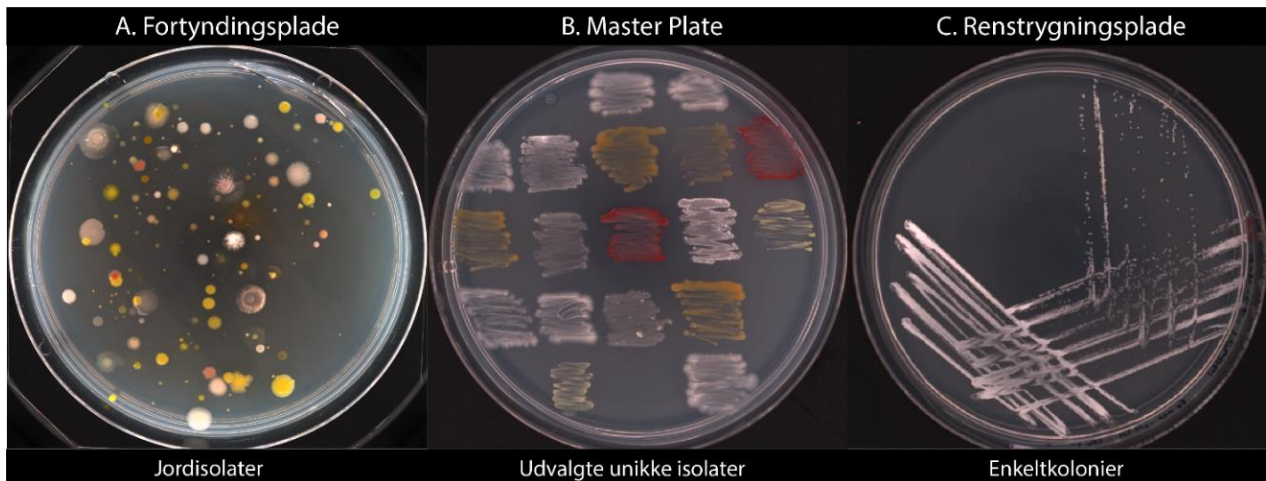
Når man skal dyrke jordbakterier i laboratoriet, er der særligt én begrænsende faktor. Det er kun en meget lille andel af det totale antal bakterier i jord, som vi er i stand til at dyrke i laboratoriet. Det skyldes, at det i laboratoriet er svært at efterligne de specifikke vækstforhold, som bakterien lever under i naturen. I dette projekt, vil vi kun undersøge de bakterier, vi er i stand til at dyrke i laboratoriet. Bare husk på, at de dyrkbare bakterier kun giver et *lille* indblik i det mikrobielle samfund i en jordprøve.

## CFU' er og bakteriekolonier

Den største fordel ved at undersøge dyrkbare bakterier er, at det giver os mulighed for at undersøge disse mikroskopiske størrelser på et makroskopisk niveau i form af kolonier. Det er dog vigtigt også at være opmærksom på begrænsningerne ved metoden:

- 1) Bakterier vil kun vokse, hvis de er levende og kan reproducere sig. Døde celler og celler i dvaletilstand vil ikke kunne detekteres.
- 2) Bakterier vil kun vokse, hvis de er dyrkbare under de pågældende vækstforhold. Celler, der ikke kan gro under de valgte forhold, vil ikke kunne detekteres.

For at vi kan detektere en bakterie i laboratoriet, bliver vi nødt til at have et eller andet visuelt tegn på, at bakterien møder de ovenstående betingelser for vækst. Derfor venter vi i laboratoriet på, at bakterierne danner kolonier på en agarplade. Inden for mikrobiologiens verden er en koloni produktet af én enkelt celle, der har delt sig. En koloni er dermed en samling af genetisk identiske celler. De individuelle celler, som kolonier udspringer fra, kaldes CFU'er (fra det engelske "Colony Forming Unit"). Når en CFU deler sig over tid, vil der til sidst være så mange celler, at kolonien kan ses med det blotte øje. Kolonier giver os et visuelt indblik i den mikroskopiske verden, da hver koloni har nogle særlige kendetegn, som er helt unikke for den bestemte bakterieart.



**Figur 3-3.** A) En fortyndingsplade med bakterier fra en jordprøve. Bakterierne i jordprøven er her blevet opløst i sterilt saltvand og fortyndet 100.000 gange ( $10^{-5}$ ) inden de er blevet udpladet. Efter inkubationsperioden kan kolonierne overføres til en ny agarplade, som kaldes en master plate. B) En master plate er en form for bakteriekatalog over de jordbakterier, man vælger at arbejde videre med. Kolonierne bliver overført fra fortyndingspladen til en ren master plate i små "strøg", hvor de vil vokse og danne en plet med tæt bakterievækst. C) De udvalgte isolater fra master platen kan nu renstryges på nye agarplader for at tjekke, at kulturen er "ren". En kultur er ren, når der kun er én enkelt art tilstede.

Ved isolering af bakterier fra en jordprøve er målet at opnå enkeltkolonier, da hver koloni stammer fra én CFU (Colony Forming Unit) og dermed består af genetisk identiske celler. Dette muliggør undersøgelse af forskellige bakteriearter individuelt og en bedre forståelse af deres diversitet og unikke egenskaber.

For at undgå overvældende vækst på agarpladen anvendes en fortyndingsrække, hvor cellerne fortyndes, ofte i saltvand for at skabe et isotonisk miljø, der øger overlevelsen. Efter fortynding udplades cellerne på en agarplade, hvor de spredes ud over overfladen. Ideelt set vil hver CFU danne en enkelt, adskilt koloni, hvilket gør det muligt at studere bakterierne separat.

## Referencer

- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59:143-169
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:10494-10499. doi: 10.1073/pnas.142680199
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2006). Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol*, 2:e92. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020092

### **Øvelse 3: Find en metode til at isolere bakteriekolonier fra din jordprøve**

- 1) Hvorfor er enkeltkolonier vigtige? Hvordan kan du sikre dig, at du får enkeltkolonier på dit vækstmedie?
- 2) Hvordan vil du vurdere antallet af dyrkbare bakterier i din jordprøve?
- 3) Kan du skelne bakterier fra hinanden, når du har opnået enkeltkolonier på din agarplade?
- 4) Hvad vil du gerne lære om de jordbakterier, du har isoleret?

# Kapitel 4: Bakterier er også, hvad de spiser

## Livets byggesten

Selvom vi har strategier til at isolere flest mulige bakterier fra en jordprøve, betyder det ikke nødvendigvis, at vi får det størst mulige antal forskellige arter. Ikke alle bakterier vil gro lige godt på én bestemt type vækstmedie. For at forstå dette, skal vi se på, hvordan mikroorganismer får den energi, de har brug for til at opretholde deres biologiske funktioner.

Ligesom alle andre organismer bruger mikroorganismer energi til at producere organiske molekyler, der er essentielle for deres vækst, deling og interaktion med miljøet. Disse molekyler består primært af kulstofatomer (C), men kræver også hydrogen (H), oxygen (O), nitrogen (N), fosfor (P), og svovl (S). Derudover har cellen brug for små mængder af mineraler og salte som natrium, magnesium, jern, kalium og calcium til at danne vitale makromolekyler som DNA, RNA og proteiner.

Organisk molekyle	Komponenter	Makromolekyler
Aminosyrer	C, H, O, N, S	Proteiner
Nukleotider	C, H, O, N, P	DNA og RNA
Fedtsyrer	C, H, O	Lipider
Sukre	C, H, O	Kulhydrater

Tabel 4-1. Makromolekyler og deres byggesten.

Natrium (Na <sup>+</sup> )	Magnesium (Mg <sup>2+</sup> )	Kalcium (Ca <sup>2+</sup> )
Jern (Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> )	Kalium (K <sup>+</sup> )	Klorid (Cl <sup>-</sup> )

Tabel 4-2. Mikronæringsstoffer (trace elements) omfatter essentielle mineraler og salte.

## Vækstmedie og vækstbetingelser

I laboratoriet dyrkes bakterier i vækstmedier, som indeholder essentielle næringsstoffer. Disse kan være baseret på ekstrakter fra dyr, planter eller svampe, eller være syntetisk fremstillet. Bakterier har forskellige præferencer, så vækstmedier kan justeres for at fremme væksten af specifikke bakteriegrupper fra f.eks. en jordprøve. Vækstmedier kan også beriges med organiske molekyler, makromolekyler og vitaminer for at tilgodese bakterier med specifikke behov, eller forenkles til kun at indeholde simple sukre, salte og vand.

Fysiske faktorer som lys, temperatur og tonicitet påvirker også bakterievækst. Sammensætningen af ioner og molekyler i mediet påvirker cellernes stabilitet, og ubalancer kan enten få cellerne til at bryde i et hypotonisk miljø eller skrumpne i et hypertonisk miljø. Bakterier har desuden ofte brug for et specifikt pH-range for at overleve.

Når en bakterie danner kolonier på en agarplade, betyder det, at vækstbetingelserne er tilstrækkelige til overlevelse og deling, men ikke nødvendigvis, at alle bakteriens behov er opfyldt. Udtrykket af visse gener kan afhænge af miljømæssige signaler, som måske ikke er til stede i laboratoriet, hvilket betyder, at nogle gener ikke bliver udtrykt.

En stor udfordring i at udforske mikrobers biodiversitet og biosyntetiske potentiale ligger i at finde de rette vækstbetingelser og stimuli, der kan fremme væksten af bestemte bakterier eller stimulere genudtryk. Mange bakterier er afhængige af at være en del af et mikrobielt samfund, hvor de kan udveksle signaler og næringsstoffer med andre mikrober. Forskningen viser, at denne interaktion ofte er nødvendig for at "tænde" bestemte biologiske processer. Derfor er det vigtigt at eksperimentere med forskellige vækstforhold for at lære mere om bakterierne i vores prøver.

## Referencer

Bauman, R. (2003). *Microbiology* (1<sup>st</sup> ed.) San Francisco: Benjamin Cummings.

Mukhopadhyaya, P. N., Deb, C., Lahiri, C., & Roy, P. (2000). A *soxA* gene, encoding a diheme cytochrome C, and a *sox* locus, essential for sulfur oxidation in a new sulfur lithotrophic bacterium. *J Bacteriol*, 182:4278-4287

Slonczewski, J., & Foster, J. W. (2011). *Microbiology: An Evolving Science* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: W.W. Norton & Co.

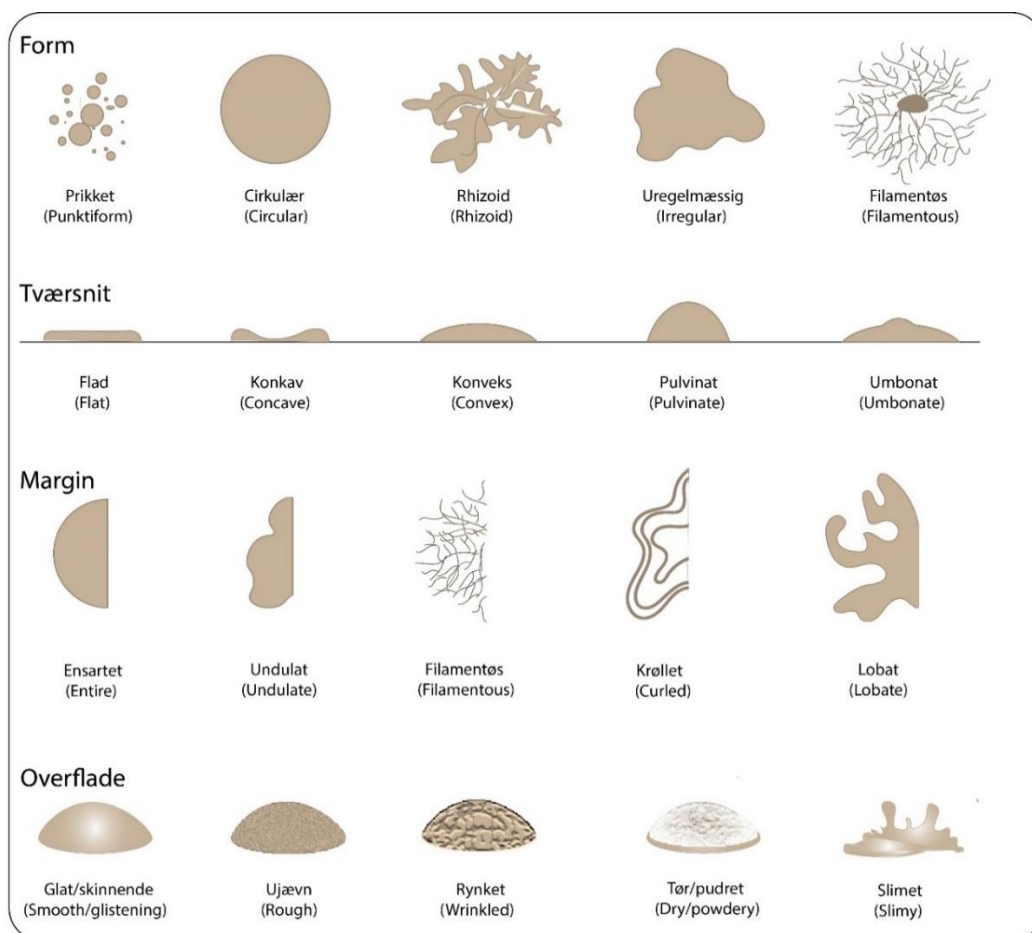
## Øvelse 4: Valg af vækstmedie og vækstforhold

- 1) Hvordan kan vækstmedie og vækstforhold optimeres, så det tillader vækst af mange forskelligeartede bakterier?
- 2) Hvilket medie og hvilke vækstforhold har du valgt og hvorfor?
- 3) Hvordan adskiller de valgte vækstforhold sig fra bakteriernes naturlige habitat?

# Kapitel 5: Kolonier vs. flydende kulturer

## Bakteriekoloniers morfologi

Lige siden bakterier allerførste gang blev dyrket på agarplader, har mikrobiologer observeret, at kolonier udviser stor variation i deres udtryk og udseende. Vi betegner beskrivelsen af disse karakteristika som koloniens morfologi, og vi kan bruge bakteriernes morfologiske egenskaber til at skelne mellem forskellige bakterier. På en agarplade kan forskelle i koloniernes morfologi f.eks. observeres som forskelle i koloniernes farve, tekstur, form og kanter.



**Figur 5-1.** Bakterier kan have forskellige former, højder, kanter og se forskellige ud på overfladen. Vi kan bruge disse begreber til at beskrive bakteriernes karakteristika og til at skelne mellem forskellige bakterier.

Desværre kan bakteriens morfologi ikke fortælle os noget om, hvor tæt beslægtede bakterierne er. En beskrivelse af bakteriens morfologi er derfor ikke *tilstrækkelig* til at identificere ukendte bakterier. Dog kan bakteriens morfologiske karakteristika hjælpe med at pege os i den rigtige retning.

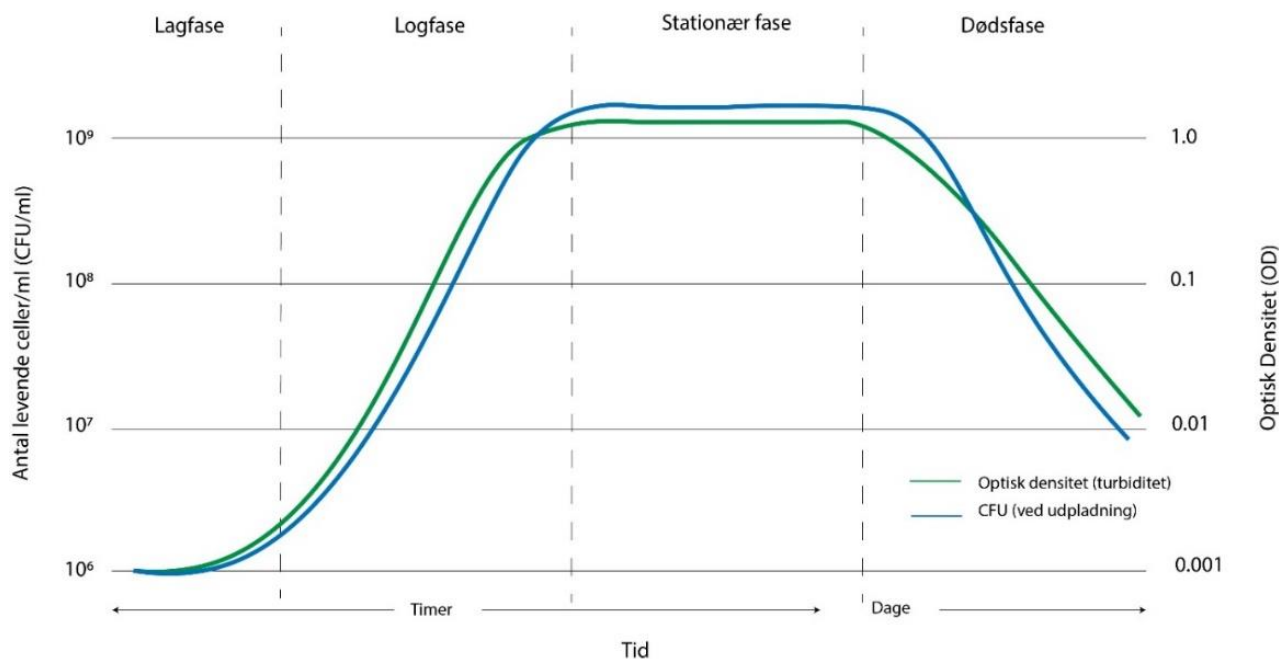


## Vækstfaser

Dyrkning af bakterier på fast medie giver mulighed for at studere bakteriekoloniernes morfologi og isolere dem i renkulturer. Fra disse renkulturer kan man overføre bakterierne til flydende medie, hvilket er nødvendigt for at undersøge bakteriers vækst, vækstkinetik og biokemiske processer i forskellige vækstfaser.

I flydende medie er bakterier planktoniske, dvs. fritsvømmende, hvilket gør det muligt for dem at bevæge sig rundt i mediet. Med tilstrækkelig omrøring fordeles cellerne ligeligt. Mange bakterier kræver iltning for at gro i flydende kulturer, hvorfor de ofte dyrkes på ry-steborde. Dog trives ikke alle bakterier i planktoniske miljøer; især mange jordbakterier har svært ved at overleve i flydende kulturer, hvilket kan føre til et fald i antallet af levende celler ved overgangen fra fast til flydende medie.

Bakterievækst i flydende medie kan følges ved hjælp af et spektrofotometer, som måler mængden af lys (ved en bølgelængde på 600 nm) der absorberes af bakteriekulturen over tid. Dette udtrykkes som optisk densitet (OD). Jo mere bakterierne vokser, desto mere uklar bliver kulturen, hvilket resulterer i højere OD-værdier. Når disse værdier plottes mod tiden, opnås en standard vækstkurve, som viser de forskellige vækstfaser, bakterier gennemgår i flydende kulturer. Vækstkurven er vejledende for bakteriernes fysiologiske og metaboliske tilstand i de forskellige faser.



**Figur 5-3.** Standard vækstkurve for *E. coli* i flydende kultur.

Når bakterier overføres til et nyt vækstmedie, gennemgår de først en lagfase, hvor de tilpasser deres metabolisme til de nye forhold. Herefter følger den eksponentielle vækstfase, hvor bakterierne deler sig hurtigt, og sekundære metabolitter som antibiotika produceres. Når næringsstofferne er ved at være opbrugte, går bakterierne ind i den stationære fase, hvor vækst og celledød er i balance. Til sidst indledes dødsfasen, hvor flere celler dør end overlever.

## Bakteriers vækstfase på fast medie

Der findes også indikationer på bakteriers vækstfaser, når vi dyrker bakterier på fast medie. Kolonier vil med tiden stoppe med at vokse og udbrede sig på agarpladen, og de kan endda begynde at svinde ind. Dette er som regel et tegn på, at næringsstofferne i mediet er opbrugt, og at affaldsstoffer bliver akkumuleret samt at vand fordamper fra agarpladen. Nogle bakterier går i en dvaletilstand og kan overleve i nogle uger, hvorimod andre bakterier har udviklet evnen til at danne sporer. Disse sporeformer er inaktive og meget modstandsdygtige. Forskellige jordbakterier har evnerne til at danne sporer, og de danner dem typisk, når der ikke længere er kulstof tilgængeligt i vækstmediet.

## Referencer

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2<sup>nd</sup> ed.) 2005. New York: Springer.

Bibb, M. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142:1335-1344.

Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P., & Sanchez, J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 74:3877-3886. doi:10.1128/AEM.02715-07

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:548-572

Slonczewski, J., & Foster, J. W. (2011). *Microbiology: An Evolving Science* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: W.W. Norton & Co.

Wessner, D. R., Dupont, C., & Charles, T. (2013). *Microbiology*. New York: Wiley Pub.

## Øvelse 5: Isolér unikke kolonier til test for antibiotikaproduktion

- 1) På baggrund af hvilke kriterier vil du udvælge unikke isolater fra dine plader?
- 2) Hvis du nu ikke kan teste ALLE dine isolater for antimikrobiel aktivitet, hvordan vil du så prioritere dine isolater, så du øger sandsynligheden for at finde en antibiotika-producerende bakterie?
- 3) Hvilke egenskaber eller karakteristika har de bakterier, du har valgt at arbejde videre med?

# Kapitel 6: Mød ESKAPE-patogenerne

## Infektionssygdomme i et historisk perspektiv

Historisk blev sygdomme som kolera og den sorte død tilskrevet "usund luft" (miasma) og spontan genese, hvor man troede, at liv kunne opstå fra ikke-levende ting. Denne misforståelse forhindrede samfundet i at koble mikroorganismer med infektionssygdomme, hvilket gjorde det svært at forebygge og kontrollere sygdomsudbrud. I midten af 1800-tallet udfordrede John Snow og Louis Pasteur disse teorier. Snow demonstrerede, at kolera spredtes via forurenede drikkevand, og Pasteur afviste spontan genese ved at vise, at mikroorganismer kun vokser i væsker, hvis de bliver kontamineret udefra. Dette førte til kimteorien, som fastslog, at visse sygdomme skyldes mikroorganismer som bakterier.

I dag har vi stor indsigt i, hvordan mikrober forårsager sygdomme, hvilket har muliggjort forebyggelse og behandling af infektioner. Dog står vi over for udfordringer med antibiotikaresistens, hvor resistente patogener, også kaldet "superbugs", spreder sig hurtigt, især på hospitaler og som følge af overforbrug af antibiotika.

## Valg af test organisme

Vi isolerer jordbakterier i håbet om, at nogle kan producere antibiotika. Deres potentiale vurderes ved at teste, om de kan dræbe en testbakterie. Typisk testes isolater først mod få testorganismer, og ved aktivitet udvides testen til flere. Prokaryoter varierer i deres opbygning og fysiologiske træk, hvilket påvirker, hvordan de reagerer på antibiotika. Nogle antibiotika er bredspektrede og påvirker mange bakterier, mens andre er smalspektrede og kun virker på få. Cellevæggens struktur er ofte afgørende for antibiotikas effekt.

På workshoppen vil I lave en række eksperimenter for at teste, om jeres isolater kan producere antibiotika. Men først skal I bestemme jer for, hvilke testorganismer I vil teste jeres isolater imod.

## ESKAPE patogenerne

Når man vælger en testorganisme, er det logisk at vælge en klinisk relevant bakterie, såsom en human patogen, der udgør en trussel mod mennesker. Seks mikroorganismer, kendt som ESKAPE, er særligt problematiske, da de forårsager størstedelen af antibiotikaresistente infektioner på hospitaler. Der er tale om *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* og flere *Enterobacter* arter (**ESKAPE**).

Det er ideelt at teste jeres isolater mod disse patogener, men på grund af infektionsrisikoen er det ikke muligt i et undervisningslaboratorium. I stedet kan I teste mod bakterier, der er tæt beslægtede med ESKAPE-patogenerne, men som ikke udgør en sundhedsmæssig risiko. Disse har lignende anatomiske og fysiologiske egenskaber som ESKAPE, men er sikre at arbejde med i et undervisningsmiljø, så længe laboratoriesikkerheden overholdes.

ESKAPE Patogener	Tæt beslægtet art
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Actinobacter baumannii</i>	<i>Actinobacter baylyi</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Enterobacter species</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>

**Tabel 6-1.** ESKAPE patogener og deres tæt beslægtede "familiemedlemmer", som vi vil arbejde med i Tiny Earth.

## Ikke alle bakterier er sundhedsskadelige

Selvom vi ofte hører om sygdomsfremkaldende bakterier, er det vigtigt at huske, at vi konstant er omgivet af gavnlige bakterier. De findes i og på vores krop, i maden, og i miljøet. Hvis du undersøgte hver celle i din krop, ville du opdage, at bakterieceller faktisk overgår antallet af menneskelige celler med ca. 2:1. Vores celler er konstant omgivet af bakterielle metabolitter, hvilket understreger, hvor stor en indflydelse mikrober har på vores liv og helbred.

## Referencer

- Biello, D. (2010) Meet the microbe eating the gulf oil spill. Scientific American August 18, 2010. <<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=gulf-oil-eating-microbes-slide-show>>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 48:1-12.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proc Natl Acad Sci U S A 108:16050-16055. doi:10.1073/pnas.1102999108
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastentmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J. A., Dzutyse, A., Kong, H., Campbell, D. J., Trinchieri, G., & Segre, J. A.,

Belkaid, Y. (2012). Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* 337:1115-1119. doi:10.1126/science.1225152.

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacterial cells in the body. *PLoS Biol* 14(8):e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.

Slonczewski, J., & Foster, J. W. (2011). *Microbiology: An Evolving Science* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: W.W. Norton & Co.

## Øvelse 6: Mod ESKAPE-patogenerne

- 1) Hvis et af jeres isolater inhiberer væksten af én test organisme, betyder det så, at den vil inhibere alle bakterier?
- 2) Hvordan kan vi detektere produktionen af antibiotika? Hvordan kan vi skelne mellem de bakterier, der kan producere antibiotika, og de som ikke kan?
- 3) Hvilke ESKAPE patogener vil du gerne teste dine isolater imod?
- 4) Hvordan udgør lige netop de ESKAPE patogener en sundhedsmæssig trussel?
- 5) Findes der noget antibiotika, som vi i dag kan bruge til at behandle infektioner med netop disse ESKAPE?

# Kapitel 7: Antibiotika: Opdagelse, opbygning og virkemåde

## Manden der opdagede antibiotika

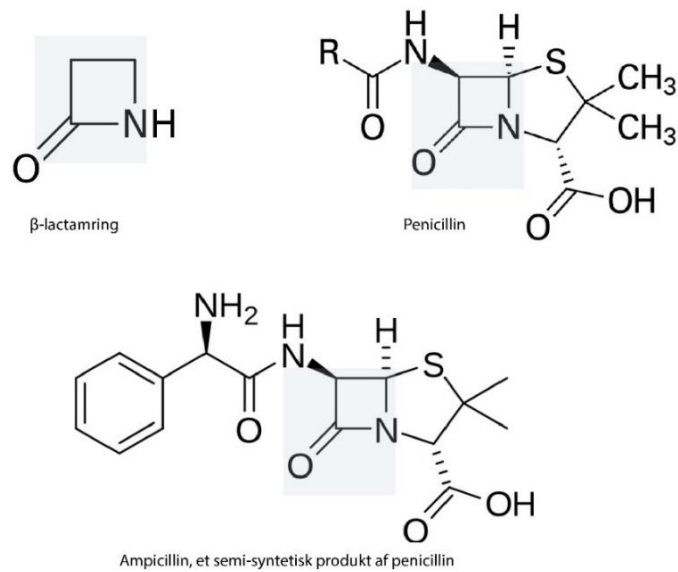
I 1928 gjorde Alexander Fleming en banebrydende opdagelse, da han fandt penicillin fra skimmelsvampen *Penicillium notatum*. Penicillin blev det første antibiotikum, der effektivt kunne behandle en lang række infektioner. Tidligere blev antiseptiske midler brugt til at behandle infektioner, især hos sårede soldater, men de var skadelige for både væv og immunsystemet. Fleming søgte derfor et alternativ, der kunne dræbe bakterier uden at skade menneskeceller.

Fleming bemærkede, at en skimmelsvamp på en agarplade dannede inhiberingszoner omkring sig, hvor bakterier ikke kunne gro. Han konkluderede, at svampen udskilte et stof, der kunne dræbe bakterier, og identificerede dette som penicillin. Penicillin viste sig at inhibere væksten af Gram-positive bakterier, der forårsager sygdomme som skarlagensfeber og lungebetændelse, uden at skade eukaryote celler.

Selvom Fleming opdagede penicillin, kunne han ikke oprense det til klinisk brug. Det var først 10 år senere, at Howard Florey og Ernst Chain lykkedes med at oprense stoffet og teste dets effekt i levende organismer. Penicillin blev dermed klar til brug under Anden Verdenskrig og reddede mange soldaters liv ved at reducere dødsfald som følge af infektioner.

## Antibiotikas opbygning

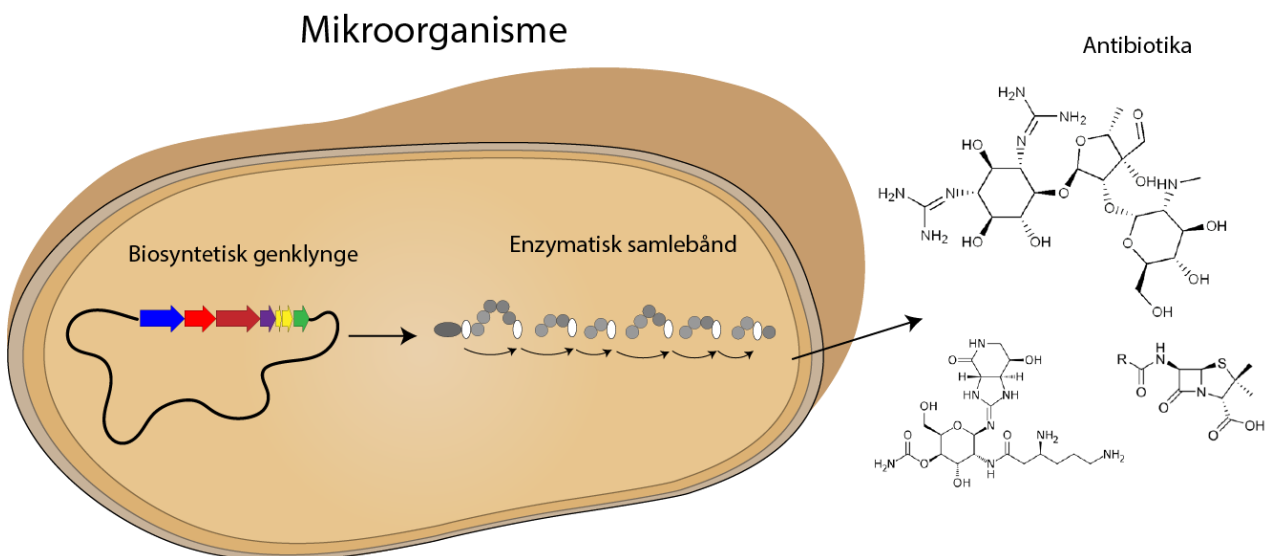
Penicillin var banebrydende, fordi det selektivt dræbte bakterier uden at skade humane celler, i modsætning til antiseptiske midler, der påvirkede begge. I 1942 introducerede Selman Waksman begrebet "antibiotika" for at beskrive små molekyler produceret af mikroorganismer, som kan hæmme eller dræbe andre mikrober. Antibiotika opdeles i forskellige klasser baseret på deres struktur. En vigtig klasse er  $\beta$ -lactam-antibiotika, såsom penicillin, som er kendetegnet ved en særlig ringstruktur, der hæmmer cellevægddannelsen i bakterier, hvilket er afgørende for deres overlevelse.



**Figur 7-1.** Antibiotika fra klassen  $\beta$ -lactam (f.eks. penicillin og ampicillin) indeholder alle en ringstruktur kaldet  $\beta$ -lactamring. Denne struktur gør denne klasse af antibiotika i stand til at hæmme cellevægssyntesen.

## Antibiotika – biosyntese

Antibiotikas kemiske struktur er tæt forbundet med deres produktion i bakterier. I modsætning til proteiner, der kodes direkte fra DNA, produceres antibiotika gennem en kompleks biosyntese, hvor enzymer samler og modificerer molekyler som aminosyrer, sukre og fedtsyrer. Dette hjælper med at klassificere antibiotika baseret på deres kemiske egenskaber.



**Figur 7-2.** Antibiotika dannes i cellen ved en kompleks biosyntese. Enzymerne involveret i processen er kodet i bakteriens genom.

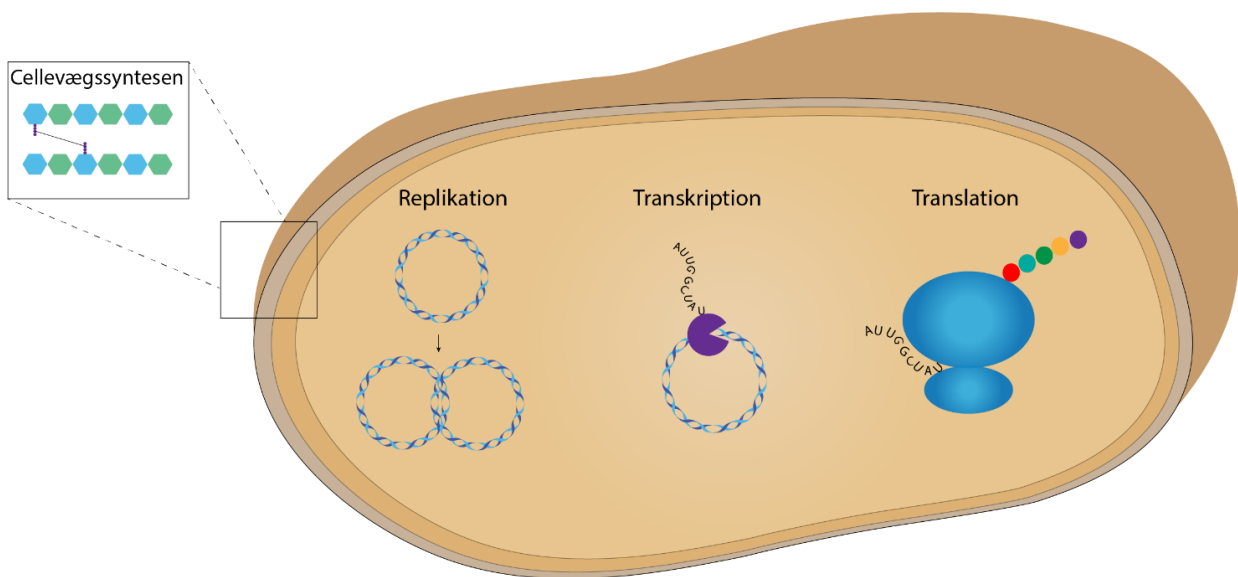


## Hvorfor antibiotika dræber bakterier (og ikke os)

Antibiotika klassificeres efter deres virkemåde på det cellulære niveau. De virker selektivt mod bakterier ved enten kun at trænge ind i bakterieceller eller ved ikke at genkende eukaryote celler, hvilket beskytter humane celler. Bakteriers cellevæg er et unikt mål, da den kun findes i bakterier og består af peptidoglycan. Gram-positive bakterier har et tykt peptidoglycan-lag, mens Gram-negative har et tyndt lag mellem to membraner.

Penicillin og vancomycin hæmmer dannelsen af cellevæggen ved at blokere enzymer, der samler peptidoglycan. Uden konstant vedligeholdelse af cellevæggen kan bakterier ikke overleve.

Nogle antibiotika målretter også DNA-metabolismen. Ciprofloxacin hæmmer f.eks. DNA-gyrase i bakterier, mens rifampicin hæmmer RNA-polymerase, hvilket forhindrer transkription af bakterielt DNA. Proteinsyntese, afgørende for både eukaryoter og prokaryoter, hæmmes også af antibiotika, der specifikt målretter forskelle i ribosomet mellem de to cellyper.



**Figur 7-4.** Eksempler på cellulære processer (targets) som antibiotika ofte hæmmer. Fælles for processerne er, at de er livsnødvendige for cellen.

## Referencer

Amyes, S. G. B. (2001) *Magic Bullets, Lost Horizons: the Rise and Fall of Antibiotics*. New York: Taylor & Francis.

Böttcher, H. H. (1959) *Miracle Drugs*. London: Heinemann.

Brown, K. (2005) *Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution*. Stroud, Gloucestershire: Sutton.

Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009) The natural history of antibiotics. *Curr Biol* 19:R437-R441.doi:10.1016/j.cub.2009.04.001.

Nicolaou, K. C., Harrison, S. T., & Chen, J. S. (2009) Discoveries from the abyss: The abyssomicins and their total synthesis. *Synthesis (Stuttg)* 2009:33-42.doi:10.1055/s-0028-1083259

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., & Hattori, M. (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12215-12220.doi: 10.1073/pnas.211433198

Walsh, C. T., (2004) Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility. *Science* 303:1805-1810.doi:10.1126/science.1094318

## **Øvelse 7: Design en metode til at identificere antibiotikaproducerende isolater**

- 1) Hvordan vil du bestemme, hvorvidt dine isolater producerer antibiotika eller ej?
- 2) Hvilke positive og negative kontroller vil du have med?
- 3) Hvilke faktorer kan påvirke en bakteries evne til at producere antibiotika?
- 4) Kan vi øge udbyttet af antibiotika fra et isolat?

## Kapitel 8: Lær dine isolater at kende

Det er vigtigt at understrege, at der er en lang vej fra opdagelsen af et antimikrobielt stof, til det kan findes på apotekets hylder. Der er en masse krav, som stoffet skal kunne leve op til, førend det kan blive et kommercielt behandlingsmiddel. For at kunne undersøge, om stoffet lever op til disse krav, kræver det, at man først får isoleret det aktive stof i ren form dvs. får det adskilt fra alt andet. Det er både en vanskelig proces og kræver dyrt udstyr at adskille ét enkelt stof fra alle de andre stoffer, som organismen producerer, og det kan tage op til måneder eller år selv for garvede kemikere. Derfor er der stor værdi i at prøve at få indikeret tidligt i processen, om stoffet er nyt eller allerede kendt.

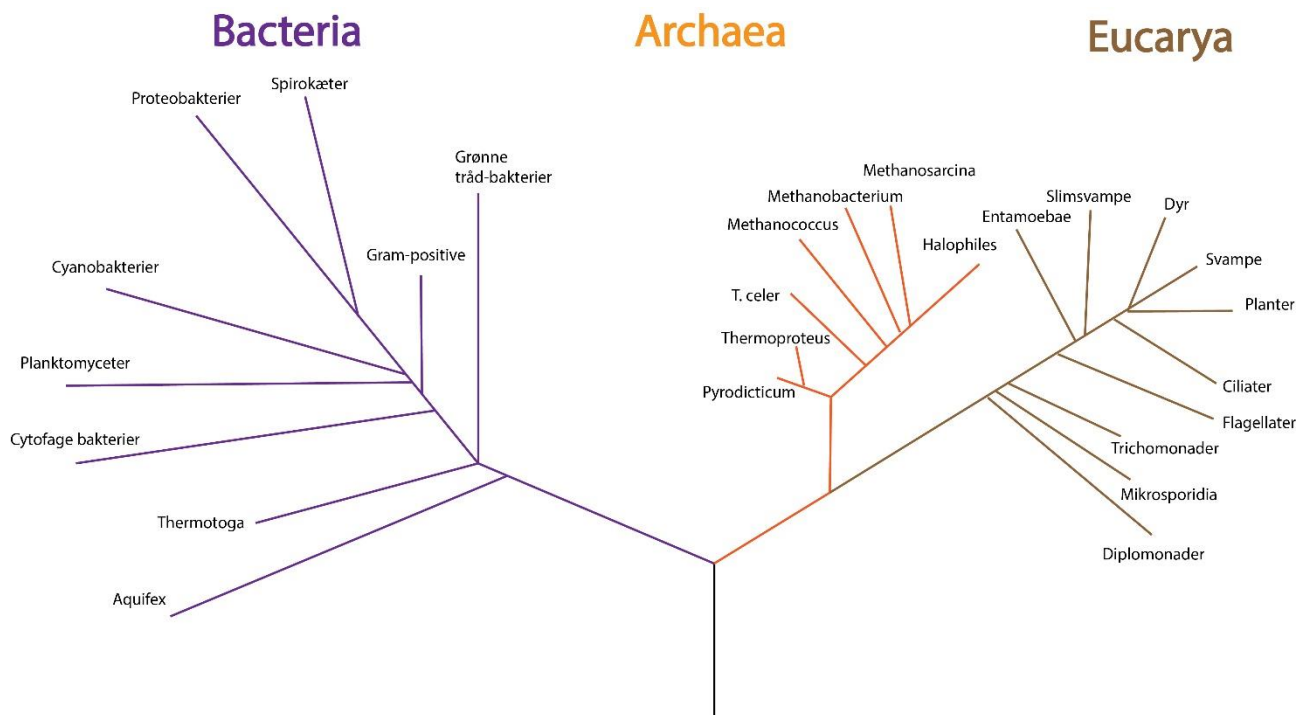
### Klassificering af mikrober

Begrebet taksonomi bruges indenfor biologien til at navngive og inddele levende organismer i grupper baseret på delte karaktertræk. Disse grupper er opbygget hierarkisk og inkluderer ofte syv taksonomiske niveauer; Domæne, rige, klasse, orden, familie, slægt og art. I slutningen af det 20. århundrede fik vi adgang til teknologier, der tillader sammenligning af DNA-sekvenser, og derved gør det muligt at klassificere bakterierne.

Forskere vælger ofte at sammenligne bestemte "markør gener", som findes i alle mikroorganismer og som er rimelig konserverede. At et gen er konserveret betyder, at det udvikler sig langsomt rent evolutionært. Dette er tilfældet med 16S rRNA genet i bakterier (18S rRNA genet i eukaryoter). 16S rRNA genet koder for en del af det bakterielle ribosom og er altså livsnødvendigt for cellen. Sammenligninger mellem bakteriers 16S rRNA gener bliver anvendt meget i dag, men sådan en analyse bør holdes op mod både morfologisk klassificering og biokemisk klassificering.

### Molekylær fylogeni

DNA er essentielt som sammenligningsgrundlag, da det udgør arvematerialet for alle levende organismer. Alle organismer deler homologe versioner af SSU-generne, som ændrer sig meget lidt over tid, hvilket gør dem til en stabil platform for evolutionære studier. Med 16S rRNA og 18S rRNA gen-sekvenser kan forskere sammenligne slægtskabet mellem alle levende væsner, hvilket førte til en omstrukturering af "Livets træ" i tre domæner: Archaea, Bacteria og Eucarya.

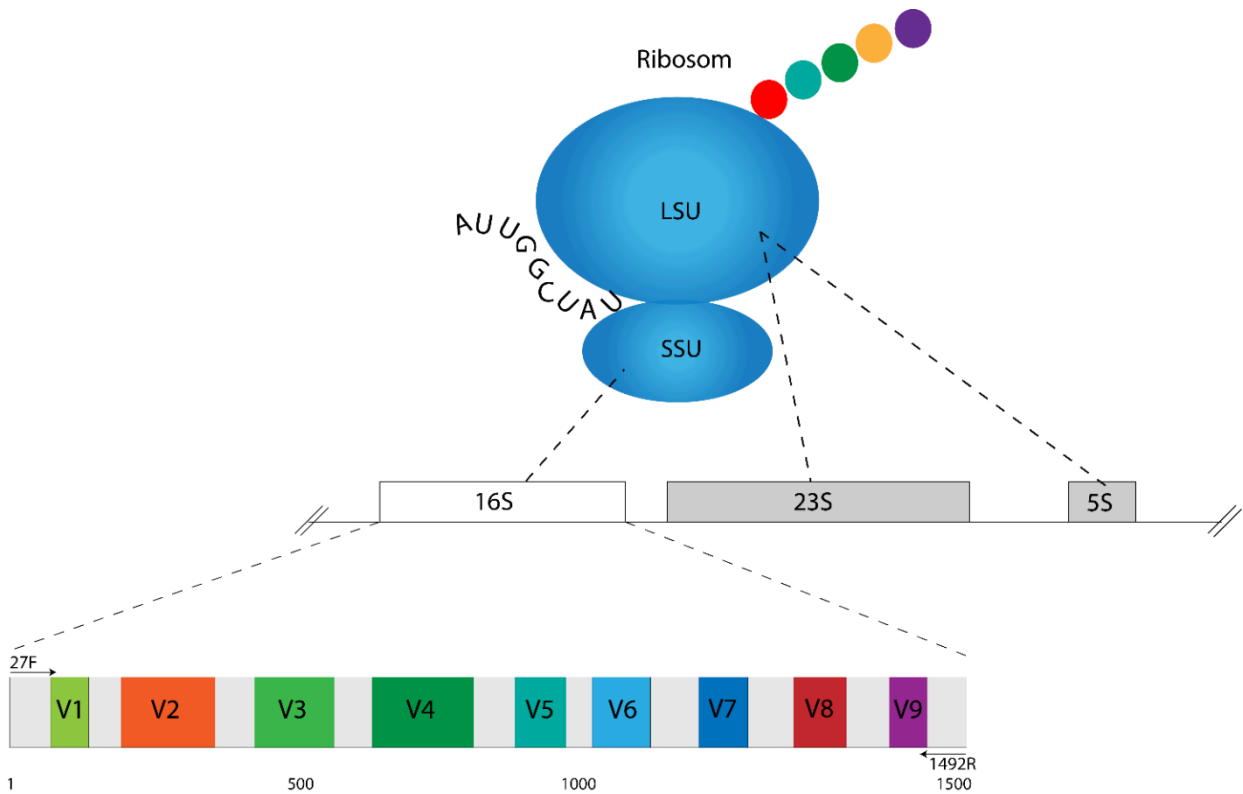


**Figur 8-1.** Livets Træ.

Selvom der findes andre markørgener, er 16S rRNA genet oftest brugt til at identificere ukendte isolater. Genet har ni variable og otte konserverede områder; de konserverede områder er ens i alle bakterier og muliggør design af universelle primere, mens de variable områder er artsspecifikke og fungerer som bakteriens "signatur". Dette gør 16S rRNA genet til en fremragende fylogenetisk markør, især til identifikation af ukendte isolater.

### 16S rRNA gen sekvens data

DNA-sekvensteknologier har udviklet sig markant de seneste årtier, og der findes nu flere måder at få en DNA-sekvens af et gen eller et helt genom. Alle metoder kræver mange kopier af den ønskede DNA-sekvens, kaldet template DNA. Den mest brugte teknik til at amplificere (kopiere) denne sekvens er Polymerase Chain Reaction (PCR). Ved at designe PCR-primere, der er komplementære til de konserverede områder af 16S rRNA-genet, kan vi amplificere en bred vifte af bakterier. De kopierede sekvenser indeholder også de variable, artsspecifikke områder, som gør det muligt at identificere den isolerede bakterie.



**Figur 8-2.** Ribosomalt RNA (rRNA) er organiseret i to subunits; *small ribosomal subunit* (SSU) og *large ribosomal subunit* (LSU). 16S rRNA genet koder for SSU, hvor 23S rRNA genet og 5S rRNA genet koder for LSU. 16S rRNA genet (~1500 bp) er illustreret her med ni variable regioner (V1-V9) omgivet af konserverede områder i grå. Forward primeren 27F og reverse primeren 1492R binder til konserverede områder på genet og anvendes ofte til amplificering af hele 16S rRNA genet.

## Mikrober i mikroskopet

Mikroskopi har udviklet sig markant siden de første observationer af mikroskopisk liv, men lysmikroskoper kan stadig kun skelne mellem objekter større end 0,2  $\mu\text{m}$ . Elektronmikroskopi kan derimod vise detaljer ned til 0,005  $\mu\text{m}$ , hvilket gør det muligt at se mindre objekter som virusser og cellekomponenter.

## Farvning af bakteriers cellevæg

Farvning af bakterier hjælper med at skelne mellem forskellige celleformer, såsom cocci (kugleformede) og bacilli (stavformede). Bakteriers cellevægge består af peptidoglycan, som beskytter cellen og giver den form. Gram-farvning er en klassisk teknik, hvor man bruger to farvestoffer: krystalviolet og safranin. Gram-positive bakterier har et tykt peptidoglycanlag, der holder på den violette farve, mens Gram-negative bakterier, med et tyndere lag, mister den violette farve og bliver pink ved farvning med safranin. Denne metode bruges til at skelne mellem de to største grupper af bakterier: Gram-positive og Gram-negative.

## Referencer

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5088-5090.

## Øvelse 8: Indledende identificering af antibiotikaproducerende bakterier

- 1) Hvad vil du gerne vide om dine antibiotikaproducerende isolater?
- 2) Kan vi identificere bakterier baseret på makroskopisk morfologi? Hvorfor/hvorfor ikke?
- 3) Hvilke cellulære og molekulære dele af vores isolat kan give os mest mulig information om dets identitet?
- 4) Hvordan kan vi bekræfte, hvad vi lærer om vores isolat?

# Kapitel 9: I sidste ende handler det hele om kemi

## Ekstraktion af sekundære metabolitter eller naturstoffer

Når en bakterie dyrkes, producerer den mange forskellige metabolitter. For at undersøge et potentielt nyt antibiotikum er det første skridt at adskille det aktive stof fra andre stoffer i kulturen. Oprensning indebærer flere separationsprocesser, hvor stoffer adskilles baseret på egenskaber som polaritet, størrelse eller opløselighed. De stoffer, der minder mest om det aktive stof, er sværest at fjerne.

## Fra isolat til molekyle

Organiske ekstrakter fra cellekulturer er komplekse blandinger, der skal reduceres til kun at indeholde det aktive stof. For at isolere det aktive molekyle via bioassay-guided isolering kræves tre ting: et biologisk aktivitetsassay, oprensningsteknikker og metoder til at bestemme stoffets kemiske struktur. Bioassays hjælper med at følge det aktive stof gennem processen, og når det er isoleret, kan strukturen løses ved hjælp af teknikker, der identificerer molekylet. Bioassay-guided isolering tager ofte lang tid og kan føre til genopdagelse af kendte stoffer. Derfor bruger man "dereplikering" tidligt i processen for at skelne mellem kendte og ukendte stoffer. Dereplikering involverer væske-kromatografi/massespektrometri (LC-MS), statistiske analyser og biologiske assays, som hjælper med at prioritere ukendte stoffer for videre forskning.

## Referencer

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., & Wothers, P. (2007) *Organic Chemistry*, New York: Oxford University Press.

## Øvelse 9: Test et organisk ekstrakt fra dit isolat for antimikrobiel aktivitet

- 1) Kan vi isolere antibiotika fra et isolat? Hvordan?
- 2) Hvordan kan vi vurdere, om det aktive stof er tilstede i ekstraktet?

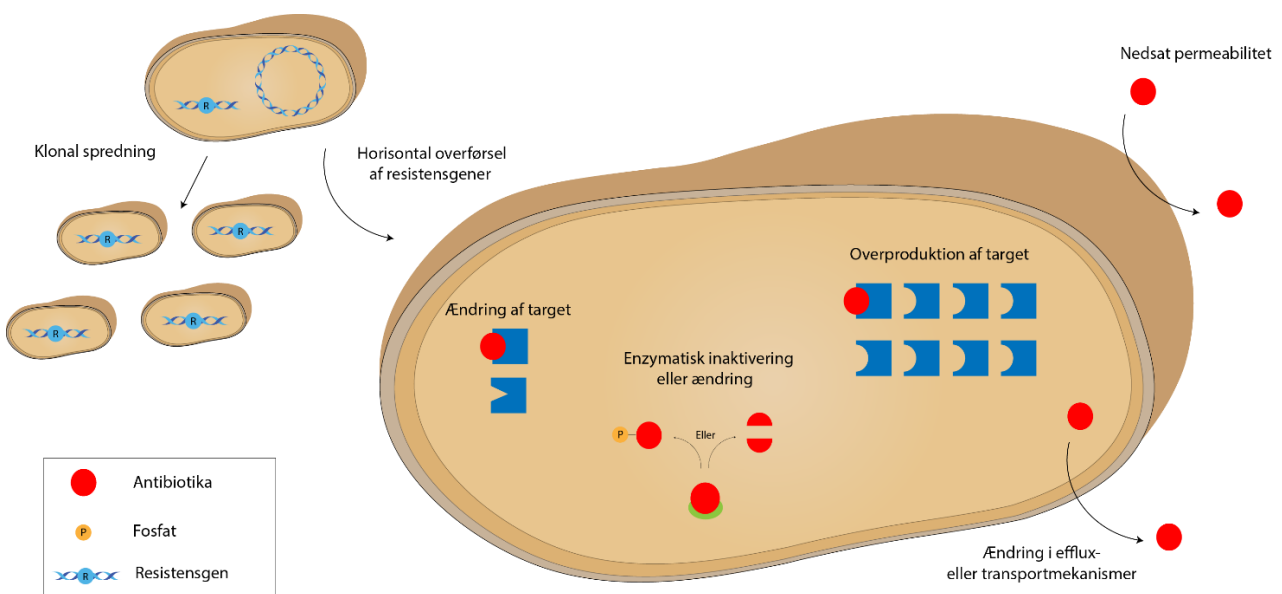
# Kapitel 10: Resistens mod antibiotika

## Antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens opstår, når skadelige organismer bliver modstandsdygtige over for antibiotika, hvilket betyder, at de ikke længere kan behandles med de mest effektive midler. I nogle tilfælde skal man bruge stærkere antibiotika, som normalt er reserveret til de mest alvorlige infektioner, hvilket kan efterlade patienten i livsfare, hvis infektionen har spredt sig. I værste fald findes der ingen behandling, og visse infektioner bliver uhelbredelige. ESKAPE-patogenerne repræsenterer en stor del af de multiresistente bakterier, der udgør en alvorlig sundhedsrisiko i dag.

## Hvordan bliver bakterier resistente?

Det kan hjælpe os med at blive klogere på antibiotikaresistens, hvis vi kigger på antibiotikas virkemåde og de cellulære interaktioner, der sker inde i cellen. Antibiotika er et molekyle, som trænger ind i cellen og interagerer med et særligt target; f.eks. vil antibiotika, der binder til ribosomet, hæmme proteinsyntesen, hvilket cellen ikke kan overleve. Enhver ændring i cellen, som forhindrer antibiotika i at nå sit target, vil føre til resistens.



**Figur 10-1.** Typiske resistensmekanismer; måder hvorpå cellen undgår antibiotikas virkning.

Der er to overordnede måder, hvorpå en celle tilegner sig antibiotikaresistens. Den ene involverer mutationer, og den anden involverer overførsel af resistensgener fra andre

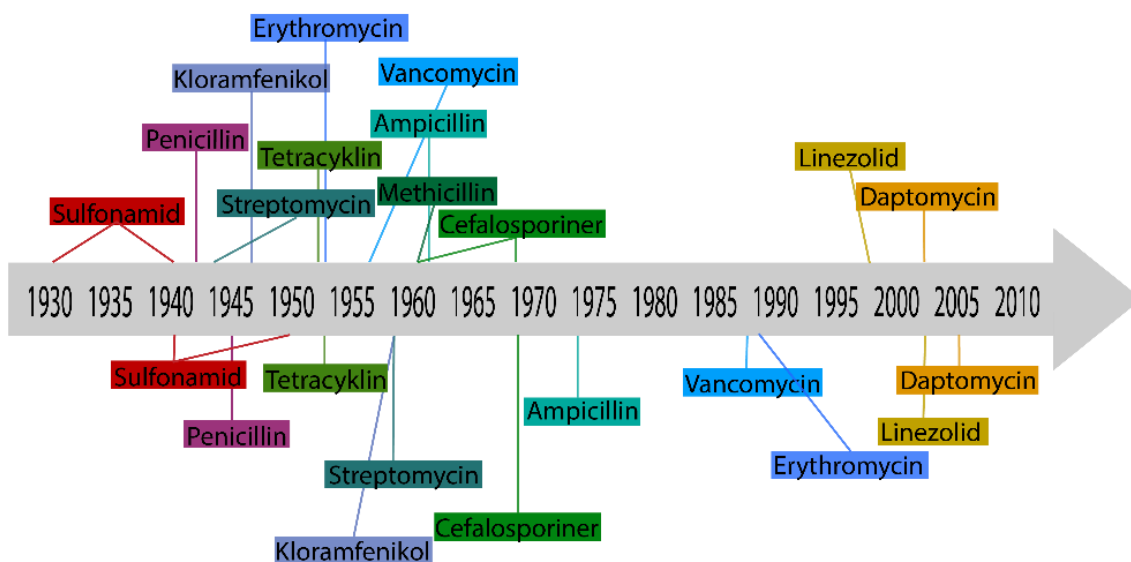


bakterier. Bakterier kan modtage DNA fra andre bakterier, fra det omgivende miljø eller fra virus via horisontal genoverførsel. Typiske eksempler på resistensgener, der videregives via horisontal genoverførsel, er gener der koder for pumper, der pumper antibiotika ud af cellen igen eller enzymer, som kemisk ændrer på selve stoffet, så det ikke længere kan binde til sit target. Mutationer, som opstår ved fejl i DNA-replikationen, kan også føre til resistens. Mutationen skal medføre en strukturændring af target, så antibiotikummet ikke længere har lige så god bindingsaffinitet, *men* funktionen af target skal bibeholdes.

## Antibiotikaresistens i miljøet

Resistente bakterier opstår under selektivt pres, hvor det er fordelagtigt for dem at bevare ændringer i deres genom, som gør dem resistente. For eksempel vil mikrober i patienter, der behandles med antibiotika, beholde deres resistens for at overleve behandlingen. Disse resistente bakterier kan spredes til miljøet, f.eks. via affald, og brugen af antibiotika i landbruget skaber yderligere pres, som fremmer overlevelsen af resistente mikroorganismer. Antibiotika blev tidligere brugt i store mængder til at fremme vækst hos husdyr, men denne praksis er blevet forbudt i Europa siden 2006 og i USA siden 2017. Antibiotika har været brugt medicinsk i relativt kort tid, men bakterier har produceret dem naturligt i årtusinder. Vi forstår stadig ikke fuldt ud, hvorfor bakterier producerer antibiotika i deres naturlige miljø. Det kan være en form for biologisk krigsførelse, hvor bakterier udskiller antibiotika for at eliminere konkurrenter i kampen om ressourcer. Kun de bakterier, der kan overleve denne kamp, vil formere sig og overføre deres resistensgener til efterfølgende generationer.

Introduktion på markedet



Observeret resistens

**Figur 10-2.** Tidslinje over introduktion af antibiotiske stoffer og observeret resistens.

## Referencer

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010) Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251-259.

Davies, J., & Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417-433.doi: 10.1128/Mmbr.00016-10

Rice, L. B., (2010) Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31:S7-S10

# Kapitel 11: "Klassisk" vs. "moderne" klassificering

## Kliniske laboratorier og diagnose

Når patienter diagnosticeres og behandles for infektioner, er det afgørende, at identifikationen af de patogene bakterier sker hurtigt og præcist. Klassiske metoder i kliniske laboratorier bygger på mikrobiologiske principper, hvor bakteriers respons på ændringer i deres miljø undersøges. Forskellige vækstmedier anvendes til dette formål: Selektive medier, som fremmer væksten af visse bakterier, og differentieringsmedier, som gør det muligt at visuelt skelne mellem forskellige bakterietyper.

## Specialiseret medie og enzymologi

Gramfarvning opdeler bakterier i to hovedgrupper: Gram-positive og Gram-negative. Udover dette kan andre tests som MacConkey Agar give yderligere oplysninger om bakteriernes biokemi. MacConkey Agar er et specialiseret vækstmedie, der adskiller Gram-negative bakterier, især dem fra menneskets mave-tarmkanal. Det indeholder stoffer, der hæmmer Gram-positive bakterier og kan afsløre syreproduktion, hvilket vises ved en farveskift til rød/pink.

Andre metoder som Triple Sugar Iron (TSI) testen hjælper med at klassificere bakterier efter deres evne til at fermentere sukkerarter og producere H<sub>2</sub>S. En stivelsestest kan også skelne mellem bakterier, der kan hydrolysere stivelse, ved at se, om stivelsen reagerer med jod og skifter farve. Desuden kan enzymtests som katalase-testen afsløre en bakteries evne til at modvirke brintoverilte, hvilket giver yderligere information om bakteriens egenskaber.

Disse biokemiske tests giver en omfattende forståelse af en bakteries identitet og hjælper med at vejlede den rette behandling. I kliniske omgivelser kan disse metoder føre til en hurtig identifikation på slægtsniveau, men sekventeringsteknologier er ofte nødvendige for præcis artsidentifikation.

## Klassisk eller moderne fremgangsmåde

De seneste to årtier har udviklingen af sekventeringsteknologier gjort dem hurtigere, mere pålidelige og billigere. Dette har resulteret i en eksponentiel vækst af tilgængelige genomer i databaser som GenBank. 16S rRNA gensekventering er nu en almindelig metode til at identificere bakterier på slægtsniveau, og mere specifikke primere kan yderligere identificere bakterier på arts- eller stammeniveau. Hvis en bakteries 16S rRNA gensekvens viser over 97% lighed med en kendt art, kan vi forudsige dens fænotype.

Forskere kombinerer ofte morfologiske, biokemiske og molekylære analyser for at identificere ukendte organismer. Uoverensstemmelser mellem disse resultater kan indikere, at der er tale om en ny art eller variant. Ved at koble en bakteries fylogenetiske baggrund, morfologi og biokemiske egenskaber kan forskere få et dybere indblik i organismens cellulære og molekylære processer.

## Referencer

ASM Microbe Library. Laboratory Protocols. <<http://microbelibrary.org/about/51>>

Fox, A. Culture and Identification of Infectious Agents. Bacteriol Microbiol Immunol, On-line: University of South Carolina School of Medicine

Wessner, D. R., Dupont, C., & Charles, T. (2013). *Microbiology*. New York: Wiley Pub.

## Øvelse 11: Biokemisk karakterisering af isolater

- 1) Vi har identificeret isolaterne og testet deres antibiotikaproduktion. Hvad vil du ellers gerne vide om dine isolater?
- 2) Når du sammenligner dine biokemiske test med din identificering, stemmer resultaterne fra de biokemiske tests så overens med vores forventning for den pågældende type bakterier? Søg i litteraturen!

# Kapitel 12: Bakterier i kontekst

## De gode vs. de onde bakterier

Bakterier har en blandet opfattelse i samfundet: på den ene side frygtes de som sundheds-skadelige organismer, der skal udryddes gennem god hygiejne, mens fødevarerindustrien på den anden side promoverer "gode bakterier" eller probiotika som gavnlige elementer i yoghurt og andre produkter. Denne opdeling i "gode" og "onde" bakterier er dog misvisende. De fleste bakterier er harmløse og spiller en essentiel rolle i Jordens økosystemer. Fra fødslen koloniserer bakterier vores hud og tarmsystem, hvor de styrker vores immunsystem og hjælper os med at optage næringsstoffer. Nyere forskning antyder, at tarmbakterier kan beskytte mod sygdomme som autisme, astma, diabetes, depression og fedme. Denne symbiose mellem bakterier og andre organismer er resultatet af en lang historie med co-evolution og samarbejde mellem arter.

## Afsluttende bemærkning

Mikrobiologien har set et skifte fra studiet af mikrober i renkulturer til blandede mikrobielle samfund og associationer. Bakterier påvirkes af deres kontekst – både af andre mikrober og af deres fysiske miljø. Ved at observere dem i deres naturlige miljø kan vi lære meget mere om deres biologi end ved at studere dem isoleret. Bakterier, der vokser i laboratoriet, har ofte helt andre vækstforhold end dem i naturen, og de fleste bakterier (99%) vil slet ikke gro under laboratorieforhold, fordi vi ikke forstår deres komplekse behov.

Under jeres undersøgelser af bakterier har I fokuseret på antagonisme, hvor en organisme hæmmer en anden. Men I kan også opdage, at bakterier kan påvirke hinandens vækst positivt eller samarbejde om ressourcer. Denne form for interaktion er et centralt emne inden for mikrobiologisk forskning, og der findes mange spændende studier om emner som mikrobielle samfund, blandede arter og biofilm. Jeres tilgang til studiet af jordbakterier har været meget målrettet, men forskningsmulighederne er uendelige, ligesom bakterierne selv. Hver bakterie indeholder en enorm mængde information, som vi fortsat kan opdage og forstå bedre ved at studere dem i forskellige kontekster. Jeres arbejde har efterladt et aftryk i forskningsverdenen, og I har nu et solidt fundament til at fortsætte med at lære om mikrober, diskutere dem og designe fremtidige eksperimenter.

## Referencer

- Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C., Malloch, D. (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:701-704
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., & Spitteller, D. (2009) Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4742-4746
- Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., Tanaka, M., Satoh, N., Bachtrog, D., Wilson, A. C., von Dohlen, D. D., Fukatsu, T., & McCutcheon, J. P. (2013) Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell* 153:1567-1578. Doi:10.1016/j.cell.2013.05.040
- Moorman, G. W. (2013) *Plants and Pests: Pythium*. Penn State College of Agricultural Sciences. <http://extension.psu.edu/pests/plant-diseases/all-fact-sheets/pythium>
- Needham, C. (2000) *Intimate Strangers: Unseen Life on Earth*. Washington, DC: ASM Press
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14:255-274
- Scott, J- J., Oh, D. C., Yuceer, M. C., Klepzig, K. D., Clardy, J., Currie, C. R. (2008) Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* 322\_63.
- Seipke, R. F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D. W., Goss, R. J. M., & Hutchings, M. I. (2011). A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE* 6(8):e22028.doi:10.1371/journal.pone.0022028
- Wessner, D. R., Dupont, C., & Charles, T. (2013). *Microbiology*. New York: Wiley Pub.
- Zimmer, C., Tending the Body's Microbial Garden. *The New York Times*. June 18, 2012. [http://www.nytimes.com/2012/06/19/science/studies-of-human-microbiome-yield-new-insights.html?\\_r=0](http://www.nytimes.com/2012/06/19/science/studies-of-human-microbiome-yield-new-insights.html?_r=0)