



TinyEarth

En verdensomspændende jagt på ny antibiotika

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



AARHUS
UNIVERSITET

novo
nordisk
fonden

Indhold

Introduktion	5
Kapitel 1: Bakteriernes planet	10
Mikroberne omkring os:	10
Definitioner:	10
Bakteriernes planet:	11
Kom i gang med Tiny Earth:	11
Øvelse 1: Foreslå en metode, der kan bruges til at overføre mikrober fra en jordprøve til et vækstmedie i laboratoriet	14
Kapitel 2: Jord er ikke bare jord	15
Karakteristik af jord	15
Antibiotika og bakterier isoleret fra jord	17
Øvelse 2: Indsamling af jordprøver	18
Kapitel 3: Bakterievækst og -kulturer	19
Bakteriers vækst	19
Dyrkning af bakterier	20
CFU' er og bakteriekolonier	21
Øvelse 3: Find en metode til at isolere bakteriekolonier fra din jordprøve	25
Kapitel 4: Bakterier er også, hvad de spiser	26
Livets byggesten:	26
Bakterier klassificeres på baggrund af deres ernæringsform	26
Vækstmedie og vækstbetingelser	27
Øvelse 4: Valg af vækstmedie og vækstforhold	30
Kapitel 5: Kolonier vs. flydende kulturer	31
Bakteriekoloniers morfologi:	31
Vækstfaser	32
Sporedannelse	34
Øvelse 5: Isolér unikke kolonier til test for antibiotikaproduktion	36
Kapitel 6: Mød ESKAPE-patogenerne	37
Infektionssygdomme i et historisk perspektiv:	37
Valg af test organisme	38
ESKAPE patogenerne	39

Ikke alle bakterier er sundhedsskadelige:.....	40
Øvelse 6: Mod ESKAPE-patogenerne	43
Kapitel 7: Antibiotika: Opdagelse, opbygning og virkemåde	44
Manden der opdagede antibiotika:.....	44
Antibiotikas opbygning.....	48
Antibiotika – biosyntese.....	49
Hvorfor antibiotika dræber bakterier (og ikke os).....	50
Antibiotikaresistens.....	52
Øvelse 7: Design en metode til at identificere antibiotikaproducerende isolater	53
Kapitel 8: Lær dine isolater at kende	54
Klassificering af mikrober	54
Molekylær fylogeni.....	55
16S rRNA gen sekvens data.....	57
Morfologisk karakterisering af isolater	58
Mikrober i mikroskopet.....	58
Farvning af bakteriers cellevæg	59
Øvelse 8: Indledende identificering af antibiotikaproducerende bakterier	61
Kapitel 9: I sidste ende handler det hele om kemi	62
Ekstraktion af sekundære metabolitter eller naturstoffer.....	62
Hvad er organiske molekyler	62
Hvad er sekundære metabolitter	63
Hvordan isolerer eller ekstraherer vi sekundære metabolitter?.....	64
Ekstraktion med organiske solventer.....	64
Fra isolat til molekyle.....	66
Øvelse 9: Test et organisk ekstrakt fra dit isolat for antimikrobiel aktivitet	69
Kapitel 10: Resistens mod antibiotika	70
Antibiotikaresistens.....	70
Hvordan bliver bakterier resistente?.....	70
Antibiotikaresistens i miljøet	71
Øvelse 10: Test om et isolat er resistent overfor antibiotika	74
Kapitel 11: "Klassisk" vs. "moderne" klassificering	75
Biologisk klassificering	75

Kliniske laboratorier og diagnose	75
Specialiseret medie og enzymologi	76
Klassisk eller moderne fremgangsmåde	78
Øvelse 11: Biokemisk karakterisering af isolater	79
Kapitel 12: Bakterier i kontekst	80
De gode vs. de onde bakterier	80
Symbiotiske forhold	80
Bosiddende på eller i en anden organisme	81
Planter og mikrober	82
Mikroberne og os	83
Afsluttende bemærkning	84
Øvelse 12: Vurdér dine isolaters aktivitet mod eukaryote celler, deres potentiale i biologisk kontrol og deres økologiske forhold med andre organismer	86

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:

1. At lære elever om antibiotikaresistens og de konsekvenser det har for vores samfund
2. At lære elever om jorderosion og de konsekvenser det har for vores samfund
3. At involvere elever i naturvidenskabelig forskning
4. At finde ny antibiotika!

Mål 1. Antibiotikaresistens

Vores fremtid er truet af en global sundhedskrise, der frygtes at have enorme sundhedsmæssige, økonomiske og politiske konsekvenser for vores verdenssamfund. Antibiotika har siden dets opdagelse i 1928 gjort os i stand til at behandle en lang række dødelige sygdomme forårsaget af bakterier. Men den mulighed forsvinder mellem hænderne på os. Årsagen er en hastig udvikling og spredning af bakterier, der er modstandsdygtige (resistente) overfor vores nuværende antibiotika. Ifølge Verdenssundhedsorganisationen WHO dør 700.000 personer hvert år af infektioner forårsaget af multiresistente bakterier. Det frygtes, at tallet i 2050 vil stige til 10 millioner årlige dødsfald, hvis ikke der handles nu.

Vi finder nye antibiotiske stoffer for langsomt, og det er en udfordring, da vi dermed ikke kan følge med den hastige udvikling af resistens. Store dele af medicinalindustrien, som i årtier har været aktive i jagten på ny antibiotika, har nedlagt eller begrænset deres indsats på området, hvilket har ført til en markant nedgang af nye godkendte stoffer. Så alt imens krisen eskaleres, er opdagelsen af ny antibiotika i stærk nedgang.

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

Mål 2. Jorderosion

De fleste af os tager jorden for givet, men jorden er faktisk en yderst værdifuld ressource. Jorden er mest kendt som et medie, hvori vi dyrker vores afgrøder, men faktisk har jorden spillet en meget afgørende rolle for vores historie ved også at forsyne os med f.eks. antibiotika. Størstedelen af den antibiotika, vi kender til i dag, stammer nemlig fra bakterier, der lever i jorden.

Desværre har vi ikke været gode nok til at passe på vores jord. Når vi overdyrker vores jord, udtømmer vi jorden for næring, og når vi pløjer jorden, nedbryder vi jordens struktur. Begge dele slider på jorden og gør den sårbar over for vind- og vanderosion. Erosion betyder, at jorden flytter sig væk fra det sted, den er produceret f.eks. til atmosfæren eller via vandveje. Når jorden flyttes, flyttes også alle jordens næringsstoffer. Det er u hensigtsmæssigt, og det kan skabe ubalance i økosystemerne. Det kan have fatale konsekvenser for miljøet f.eks. som i USA, hvor næringsrig landbrugsjord via Mississippi floden er eroderet ud i den Mexicanske golf. Her har den næringsrige jord medført en enorm algeopblomstring, der har opbrugt langt det meste af ilten i et 20.000 km² stort område. Meget få organismer kan overleve i disse iltfrie forhold, så området har næsten mistet alt dets liv og kan betragtes som en død zone. På den måde har jorderosion store konsekvenser - både der hvor jorden flyttes fra, men også der hvor jorden flyttes hen.

Jorden eroderer faretruende hurtigt sammenlignet med den tid, det tager naturen at producere ny jord. Det truer vores fremtid, da vi er dybt afhængige af jorden. Først og fremmest fordi vi forventer at skulle brødføde 9 milliarder mennesker på verdensplan i 2050. Men det er ikke den eneste udfordring. Jorden er den største kilde til mikrobiel diversitet på vores klode og gemmer derfor på mange vigtige funktioner. Når vi mister jord, mister vi altså også denne mikrobielle diversitet. Eftersom vi endnu ikke helt er klar over, *hvilken* diversitet og *hvilke* funktioner jorden gemmer på, er vi heller ikke helt klar over, hvad vi kommer til at miste. Vi ved dog med sikkerhed, at jorden gennem tiden har forsynet os med medicin som f.eks. antibiotika. Antibiotika har revolutioneret den medicinske historie og reddet utallige menneskeliv. Faktisk har jorden været kilde til to tredjedele af den antibiotika, vi bruger til behandling i dag. Det er lige netop her, at antibiotikakrisen og jordkrisen konvergerer.

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

Mål 3. Forskning – essensen af naturvidenskab

Tiny Earths tredje mål er at involvere gymnasieelever i et forskningsprojekt. Vi tror, at den bedste måde at lære om naturvidenskab og naturvidenskabens muligheder er ved selv at have fingrene i forskning.

Mange elever oplever aldrig autentisk naturvidenskab, men lærer i stedet om andres revolutionerende opdagelser gennem lærebøger og artikler. Selvom denne viden både er vigtig og nødvendig, er det svært for mange mennesker at blive oprigtigt fanget af fakta og koncepter, før de på egen krop har mærket begejstringen ved at gøre en opdagelse - for det er der nærmest intet i verden, der kan måle sig med. I et kort øjeblik sidder du, som den eneste i verden, inde med en lille information om den verden, vi lever i. Efterfølgende får du mulighed for at dele din opdagelse med andre, hvilket i sig selv også er tilfredsstillende. Det er lige netop essensen af naturvidenskab – få ideer, tilegn dig ny viden, del din viden og anbring din nye viden i kontekst med al den viden, vi i forvejen har.

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

Mål 4. Opdagelsen af ny antibiotika fra jord

Langt størstedelen af alt den antibiotika, vi behandler med i dag, stammer fra jordbakterier. Netop af denne årsag har forskere i årtier ledt efter ny antibiotika blandt jordens mikrobielle samfund. Man kunne måske fristes til at tro, at jorden efterhånden må være løbet tør for nye interessante stoffer. I takt med at vi bliver klogere og klogere på jorden og dens indbyggere står det soleklart, at jorden stadig gemmer på en masse uudforskede skatte.

Det virker måske pudsigt, at nogle bakterier kan producere nogle stoffer, der kan dræbe andre bakterier. Men måske er intentionen med disse stoffer faktisk en helt anden ude i naturen. Måske producerer jordbakterier faktisk disse stoffer som del af deres kommunikation med andre bakterier – det er noget, vi hele tiden prøver at blive klogere på.

En af udfordringerne ved at identificere nye antibiotikaproducerende bakterier er at få isoleret de helt rigtige bakterier fra en kompleks jordprøve og få dem til at producere de aktive stoffer i laboratoriet. Vi ved af erfaring, at der findes en masse bakterier i jord, som vi forholdsvis let kan få til at producere antibiotika, når vi dyrker dem i laboratoriet – og de er ikke svære at finde. Vi ved dog også, at vi stadig har meget at lære om de forhold, der får bakterier til at producere deres antibiotika. Det er nødvendigt at knække denne kode, hvis vi skal gøre os forhåbninger om at finde nogle nye stoffer. En af jeres opgaver bliver at finde på nye måder at aktivere produktionen af antibiotika og forhåbentlig finde nogle stoffer, som vi endnu ikke har set før.

Kan en gruppe elever løse denne opgave og dermed løse den krise, der truer vores fremtid? Svaret er et rungende ja! For at forstå, hvorfor vi mener, at elever kan opdage ny antibiotika, bliver vi nødt til først at forholde os til, hvorfor opdagelsen af ny antibiotika de sidste mange år er gået i stå.

Mange firmaer i medicinalindustrien har udtalt, at sandsynligheden for at finde ny antibiotika er meget lille i forhold til den arbejdsbyrde, det kræver. De mener ikke, det er en investering værd, da de "lavt-hængende frugter" - så at sige - allerede er blevet plukket. Her er vi meget uenige. Der findes meget klare beviser på, at der stadig er rigtig meget antibiotika i jorden, som blot venter på at blive fundet. Faktisk har elever i Tiny Earth netværket allerede fundet helt nye stoffer!

Vi tror i stedet, at medicinalindustrien melder sig ud af jagten på ny antibiotika, fordi deres fokus er flyttet over på mere lukrative præparater. Patienter i behandling for kroniske lidelser som f.eks. angst, depression, hjertesygdomme og forhøjet kolesteroltal er ofte afhængige af deres medicin i meget lange perioder. Patienter, der behandles med antibiotika, kræver derimod ofte kun nogle få dages behandling.

Selvom det tager længere end et skoleår at finde ny antibiotika og få det på markedet, så er der dog rig mulighed for at identificere potentielle nye stoffer på blot et par måneder. I Tiny Earth involverer vi elever over hele verden i et kollektivt samarbejde med ét fælles mål: at finde ny antibiotika. På denne måde udvider vi vores søgen efter antibiotika til lokationer med geografisk stor spredning og hver enkelt person, der deltager, har muligheden for at gøre en helt ny opdagelse.

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. De findes f.eks. i hydrotermiske væld på havets bund, men de findes også i vores tarmsystem og på overfladen af vores computertastatur. 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 hjulpet med at tilpasse biosfæren, da bestemte stoffer produceret af bakterier har hjulpet med at fremme evolutionen af komplekse celler og multicellulære organismer. 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.

Definitioner:

Mikrobiel økologi er læren om mikrobers interaktioner både med hinanden og med det omgivende miljø. Mikrober spiller en afgørende rolle i komplekse økosystemer, hvor det vrirler med liv og aktivitet. I disse mikrobielle samfund deler mikroberne signaler med hinanden, der fungerer som instrukser til at danne bestemte stoffer. Det kan f.eks. være i forbindelse med en intern konkurrence om en begrænset ressource eller et samarbejde om at udnytte en anden ressource mest muligt. To helt essentielle begreber indenfor mikrobiel økologi er *biodiversitet* og *bioaktivitet*. Disse begreber dækker over 1) de typer organismer, der er tilstede i et økosystem samt 2) deres funktioner og evner.

Begrebet mikrobe er en generel betegnelse for en organisme, der er så lille, at man ikke kan se den med det blotte øje. Dermed betegnes mikrober som mikroskopiske. Mikrober dækker både over bakterier og arkæer (prokaryoter), samt mikroskopiske eukaryoter som f.eks. gærsvampe, skimmelsvampe og protister. Derudover betegnes virus og prioner også som mikrober, dog opfylder de ikke helt kriterierne for "liv" som f.eks. evnen til selv at kunne reproducere sig. Derfor betragtes virus og prioner som ikke-levende.

Prokaryoter og eukaryoter adskiller sig bl.a. fra hinanden i deres cellulære opbygning og

deres kompleksitet. Eukaryoter bærer deres genetiske materiale i en særlig afdeling af cellen kaldet nukleus. Prokaryoter derimod indeholder slet ikke den slags intracellulære afdelinger eller organeller. Prokaryoters genetiske materiale findes derfor i cellens cytoplasma.

Bakteriernes planet:

Man anslår, at det samlede antal prokaryoter i alt jord på kloden nærmer sig 26×10^{28} (260 milliarder milliarder milliarder). 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;
- Desuden har bakterier 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 som f.eks.:

- Hvilke typer bakterier kan vi finde i en jordprøve?
- Hvordan kan vi tælle bakterier og skelne dem fra hinanden?
- Hvor mange forskellige typer bakterier findes der, og hvor stort et antal findes der af hver enkelt type bakterie?
- Hvordan kan dette blive påvirket af miljøet?
- Bliver bakteriers aktivitet påvirket, når de isoleres i renkulturer?
- Er en bestemt bakteries aktivitet skadelig eller fordelagtig for andre bakterier?
- Producerer bakterierne sekundære metabolitter som f.eks. pigmenter, toksiner eller antibiotika?
- Hvor aktivt er deres antibiotika, og hvordan virker det på andre bakterier?
- Er bakterierne resistente overfor antibiotika?
- Kan vi manipulere deres produktion af antibiotika?
- Er deres antibiotika brugbar for mennesker?
- Er det antibiotika, vi allerede kender, eller er det en ny type antibiotika?

Eksperimenterne i Tiny Earth er designet til at hjælpe med at besvare disse spørgsmål, teste hypoteser og opnå en dybere indsigt i den mikrobielle verden. Igennem 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.

Lad jagten begynde!

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



Livet på bakteriernes planet

Dette billede er taget gennem okularet på et lysmikroskop. Billedet viser den helt unikke form og farve på den **fotoautotrofe cyanobakterie** (også kendt som blågrønalgen).

Cellerne danner lange tråde (filamenter) og findes i en lang række forskellige miljøer bl.a. i jorden og på havets bund. Cyanobakterier producerer ilt via fotosyntese og kan omsætte atmosfærisk kvælstof, som de bruger til at vokse. Cyanobakteriernes evne til at producere ilt er måske en af historiens mest betydningsfulde evolutionære hændelser, der for flere milliarder år siden havde afgørende betydning for Jordens udvikling. Dengang blev der for første gang frigivet enorme mængder ilt til vores atmosfære, hvilket medførte drastiske ændringer som f.eks. en masseudryddelse af mange ilt-sensitive mikroorganismer, udviklingen af ilt-afhængig respiration og dannelsen af vores ozonlag, som siden har tilladt liv at migrere til land og udvikle sig til den biodiversitet, vi ser på kloden i dag.

Foto: commons.wikimedia.org

Øvelse 1: Foreslå en metode, der kan bruges til at overføre mikrober fra en jordprøve til et vækstmedie i laboratoriet

Biologiske spørgsmål:

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 vækstmedie?

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

Op gennem historien har mennesket tillagt jord stor betydning både praktisk og symbolsk. Vores samfundsudvikling har været påvirket af jordens sundhed; frugtbar jord har været forbundet med velstand, hvorimod gold og ufrugtbar jord har fået hele samfund til at kollapse. Derudover er flere religioner og traditioner inspireret af jorden som symbol på frugtbarhed og liv.

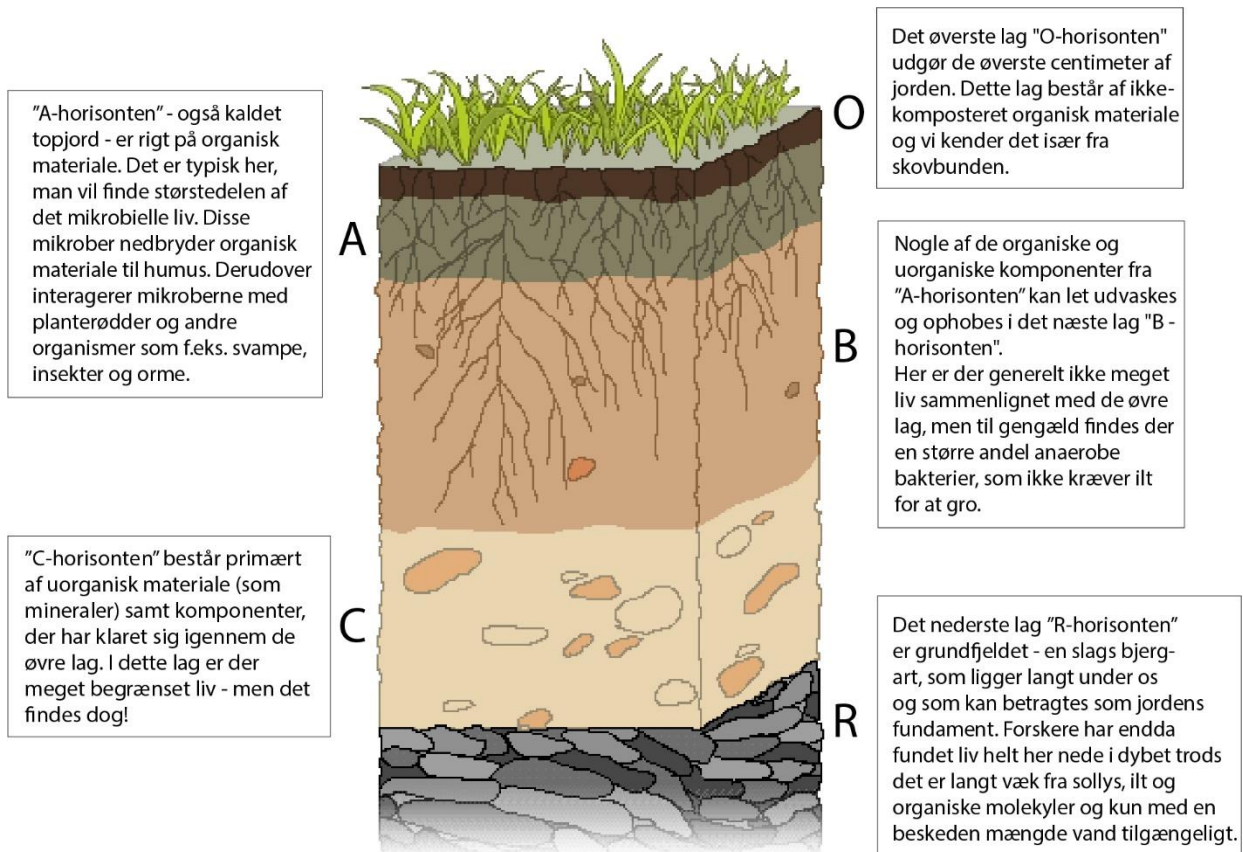
Jord dækker en meget stor del af Jorden og understøtter skov og planteliv, som producerer over halvdelen af jordens ilt og 95% af alt mad, vi spiser. Jord har en enorm indflydelse på vores planets økosystemer, men jorden bliver også selv påvirket af naturkræfter og menneskeskabte aktiviteter som f.eks. landbrug og forurening. Disse påvirkninger kan ændre al det liv, som afhænger af jorden og give udslag i biodiversitet, bioaktivitet og biomasse. Det sker netop fordi jorden er levested for nogle af de mest diverse og dynamiske organismer på Jorden.

Karakteristik af jord

De vigtigste parametre, som karakteriserer en jordtype, er jordens fysiske struktur, kemiske sammensætning og associering med planterødder eller andre organismer. Jord som er i direkte kontakt med levende planterødder (og dermed også de stoffer, som bliver udskilt fra planterødder) kaldes rhizosfæren. Den mikrobiologiske profil i rhizosfæren adskiller sig markant fra resten af jorden, fordi rodsystemerne skabe et mikromiljø, som favoriserer væksten af bestemte mikroorganismer. Forskellige planter og mikroorganismer har forskellige kemiske og metaboliske signaturer, som ændrer den kemiske sammensætning af jorden.

Den fysiske struktur af jord er bestemt af sammensætningen af tre forskellige typer jordpartikler: sand, silt og ler. Partiklerne klumper sig sammen og danner aggregater, som varierer i størrelse og tekstur. 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.

Sammensætningen af jord ændrer sig, når vand eller levende organismer tilføjer eller fjerner materialer. Når vi graver ned gennem jorden, ændrer den fysiske og kemiske sammensætning sig også. Derfor ændrer det også den type mikroorganismer, vi kan finde. 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.



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

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. På den måde kan pH-værdien anvendes som en mål for jordens sundhed. Ved en sammenligning af jord fra forskellige dele af verden viste pH-værdien sig at være en rigtig god indikator for graden af mikrobiel diversitet. Arid jord, som generelt er tør og næringsfattig jord med en neutral pH, har vist sig at have langt større mikrobiel diversitet sammenlignet med jord fra regnskove, som ofte er mere sur. Dette er på trods af, at regnskoven ellers er noget, vi forbinder med enorm diversitet på det makroskopiske plan.

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. Derudover har det stor indflydelse på, hvordan bakterierne skaffer energi og næring, hvordan de adherer til overflader, hvordan de interagerer med hinanden, hvordan deres livs- og vækstcyklus er og hvordan de udvikler sig over tid. 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 indeholder enormt mange mikroorganismer, både når man ser på diversitet og antal. Forskere har estimeret, at 1 gram jord indeholder titusindvis af *forskellige* bakterier og mere end 1 milliard *individuelle celler*. Jordbakterier har gennem evolutionen udviklet adskillige egenskaber. De syntetiserer molekyler, som de bruger til kemisk krigsførelse, kommunikation og til at anskaffe næringsstoffer. De nedbryder komplekse stoffer, som de finder i dødt plantemateriale og tilbagefører på den måde næringsstoffer til deres økosystem. Bakterierne lever tæt sammen i et meget kompetitivt miljø, hvor vækstbetingelserne og ressourcerne konstant ændrer sig. Derfor har mange af dem udviklet specialiserede metabolitter, som tillader dem at interagere med deres omgivelser. Disse molekyler kaldes sekundære metabolitter og det kan f.eks. være pigmenter, toksiner og antibiotika. Sekundære metabolitter er organiske stoffer produceret af bakterier. De kaldes *sekundære* metabolitter, fordi de ikke er direkte livsnødvendige for bakterien som f.eks. strukturelle molekyler og DNA. Derimod kan sekundære metabolitter være med til at give bakterien særlige karakteristika og forbedre dens chancer for overlevelse. Antibiotika er en type sekundære metabolitter, som inhiberer væksten af andre mikroorganismer. I bakteriernes naturlige habitat, som ofte er meget næringsfattigt, kan bakterier producere antibiotika f.eks. for at mindske konkurrencen om næringsstoffer; det er de samme stoffer, som vi bruger til at behandle infektionssygdomme og som hver dag redder utallige menneskeliv.

Langt størstedelen af den antibiotika, vi bruger til behandling af sygdomme i dag, stammer fra jordbakterier. Aktinobakterier er meget almindelige jordbakterier, som man ofte vil finde i en jordprøve. Lige netop den type bakterier producerer 60% af de klinisk relevante antibiotika. Der er stadig et kæmpe potentiale for at finde ny antibiotika i jorden. Jo mere vi studerer jorden, des tydeligere bliver det, hvor meget vi stadig har at lære om jordbakterier og deres egenskaber. Jordens ukendte egenskaber og dens kompleksitet gør dette økosystems mikroorganismer særligt interessante at undersøge. Netop derfor er det også jordbakterierne, der er fokus på i dette projekt. Vi vil igennem projektet indsamle jord og tage det med tilbage i laboratoriet for at udforske særlige evner og egenskaber blandt de bakterier, der bor jorden.

Tiny Earth er et enormt netværk af forskere, elever og lærere fra hele verdenen – fra Botswana til Connecticut til Sydkorea til Danmark. Tiny Earth netværket har dermed kapaciteten til at kunne opsamle data om jord som aldrig før. Ved at registrere detaljerede beskrivelser af indsamlingssted, jordprøver samt observationer gennem projektet (antal jordbakterier isoleret, hvor mange der producerede antibiotika osv.) kan vi begynde at opbygge et stort og brugbart datasæt, som muligvis kan gøre os klogere på tendenser i jord. Denne information er ikke kun brugbar for fremtidige klasser, der skal lede efter ny antibiotika, men også for forskningen generelt, da det kan hjælpe os med at skelne mellem jord, hvor der hhv. er stor og lille sandsynlighed for at finde antibiotikaproducerende bakterier.

Øvelse 2: Indsamling af jordprøver

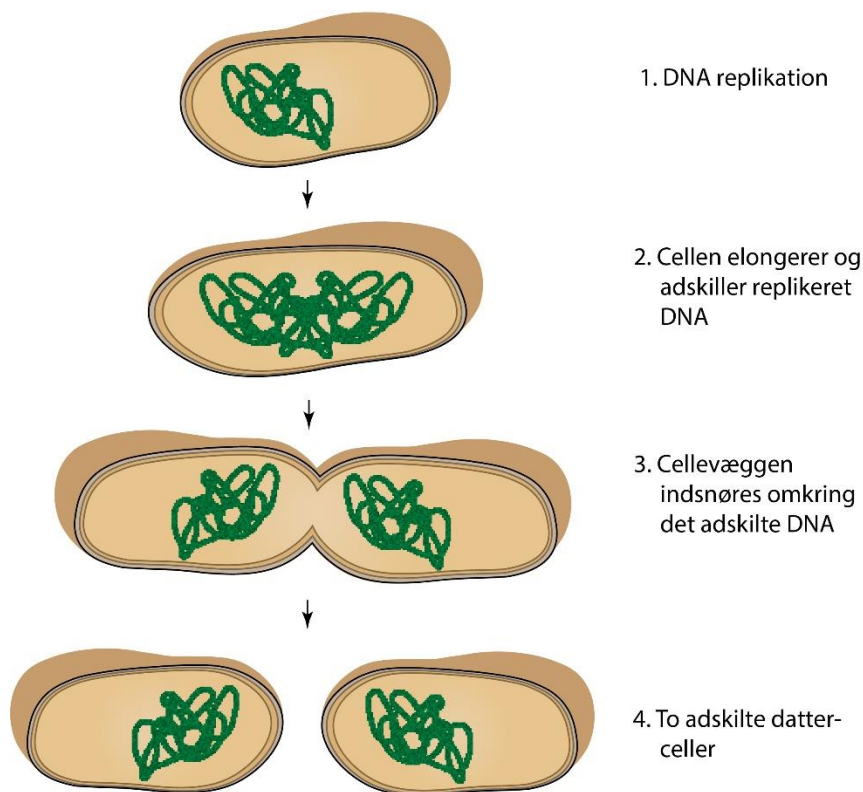
Biologiske spørgsmål:

- 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, er det typisk ikke dét fænomen mikrobiologer refererer til, når de snakker om bakteriers vækst. Begrebet vækst bliver i stedet brugt til at beskrive, hvordan antallet af individer i en bakteriepopulation øges ved formering. Med andre ord: vækst betyder reproduktion, når vi snakker enkeltcellede organismer. Reproduktion er essentielt for enhver arts overlevelse og bakteriers evne til at reproducere eksponentielt under optimale vækstforhold gør dem til pragtsemlarer, når det kommer til overlevelse.



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.

En bakteries vækstcyklus drives af intracellulære og ekstracellulære signaler, som fortæller cellen, hvornår det er tid til at dele sig. Det første step i processen er DNA replikation. Ved DNA replikation kopierer bakterien sit kromosom og dermed alt den genetiske information, som er nødvendig for at bakterien kan fungere. Cellen vokser i størrelse, bliver aflang og de to kromosomer placeres i hver sin ende af cellen. Cellens plasmamembran og cellevæg begynder at danne en skillevæg på midten, som til sidst deler de to en-

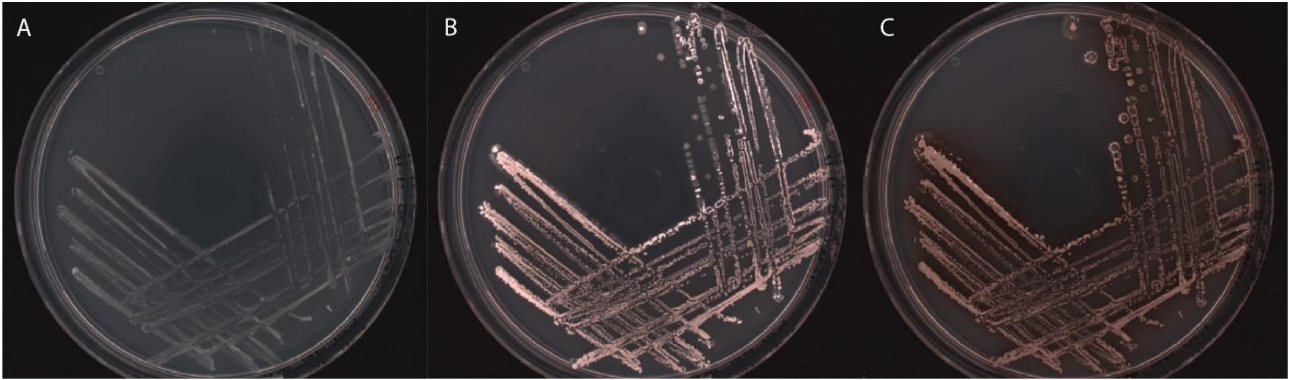
der og efterlader to datterceller. Denne type formering kaldes binær fission. Nogle få bakterier deler sig ved en anden mekanisme kaldet budding, men i begge tilfælde vil dattercellerne være genetisk identiske med den oprindelige celle.

I en bakteriepopulation vil der altid være nogle celler, der deler sig, mens nogle andre celler går i dvale eller dør. Hvis man giver bakterierne de optimale forhold for vækst, vil langt de fleste dog dele sig hurtigt. Begrebet fordoblingstid bliver brugt til at beskrive, hvor lang tid der går, fra én bakterie har delt sig, til hver af de nydannede celler har delt sig. Med andre ord: Den tid det tager en bakteriepopulation at fordoble i størrelse. I et næringsrigt miljø vil *Escherichia coli* have en fordoblingstid på 20 minutter, hvorimod andre bakteriearter som f.eks. *Mycobacterium tuberculosis* kan have en fordoblingstid på op til 16 timer. "Optimale vækstbetingelser" og næringsrige omgivelser er dog kun noget, vi skaber i laboratoriet, og det er ikke noget, vi forbinder med naturlige miljøer som f.eks. i jord. Her vil bakterierne holdes i skak i et næringsfattigt og kompetitivt miljø.

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. Bakterier er forskellige - og det er deres vækstbetingelser også. 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. Indtil 1990'erne havde vi det meste af vores viden om bakterier fra studier af disse dyrkbare bakterier, men der er sidenhen blevet udviklet metoder til biologiske studier, som ikke afhænger af dyrkning af bakterier. Disse studier kan derfor give et mere repræsentativt billede af en bakteriepopulation. Metagenomics er en værktøjskasse, der kan bruges til netop dette formål. Her kan man analysere alt genetisk materiale fra en jordprøve og dermed bestemme tilstedeværelsen af bestemte organismer - både dem der er dyrkbare og dem der ikke er. Disse metoder indikerer, at kun 0,3% af alle jordbakterier kan dyrkes i laboratoriet. Det skyldes, at det i laboratoriet er svært at efterligne de specifikke vækstforhold, som bakterien lever under i naturen. Undersøgelser af jordens metagenom har på mange måder skabt flere nye spørgsmål end de har besvaret. Selvom jordens metagenom skildrer jordens kompleksitet, så er jordens funktionelle diversitet meget svært at undersøge uden at have bakterierne i en kultur i laboratoriet. I dette projekt, vil vi kun undersøge de bakterier, vi er i stand til at dyrke i laboratoriet. Det gør vi, fordi det giver os funktionel information om bakterierne, og fordi det direkte kan føre til opdagelsen af antibiotikaproduktion blandt bakterierne. Bare husk på, at de dyrkbare bakterier kun giver et lille indblik i det mikrobielle samfund i en jordprøve.



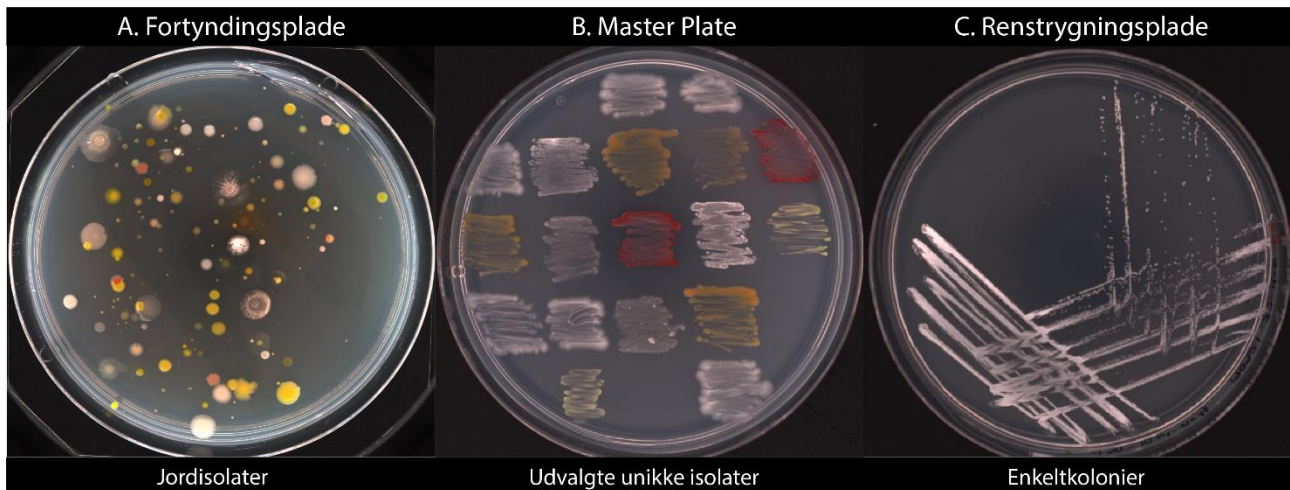
Figur 1-2. Agarplade med næringsfattigt vækstmedie bestående af enkelte næringsstoffer, vand og agar med bakterievækst. Billederne af agarpladen er taget efter A) 2 dage ved 22°C b) 5 dage ved 22°C og C) 10 dage ved 22°C.

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 (kan gro på det valgte vækstmedie og under de valgte temperatur- og iltforhold). 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. Vi ved alle sammen, at skimmelsvamp på madvarer som f.eks. brød er et visuelt tegn på, at maden er blevet kontamineret, og at vi skal undgå at spise den. På samme måde 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. I mange tilfælde tillader det, at erfarne mikrobiologer kan skelne mellem forskellige bakteriearter (mere om bakteriers morfologi i kapitel 5).



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.

Når vi isolerer bakterier fra en jordprøve, er det vigtigt, at vi opnår enkeltkolonier. Eftersom vi ved, at én koloni stammer fra én CFU, kan vi antage, at alle celler i kolonien er genetisk identiske. Ved at undersøge forskellige arter særskilt kan vi opnå en forståelse for bakteriel diversitet og hver bakteries deres unikke egenskaber.

Hvordan går vi fra millioner af individuelle celler i jorden til enkelte kolonier på en agarplade? Selv hvis kun 3 ud af 1000 bakterier i en jordprøve danner kolonier, vil vi alligevel ende ud med tusindvis af kolonier fra selv den mindste smule jord. Med så mange kolonier vil de mest af alt skabe et "tæppe" af bakterievækst på agarpladen, og det være helt umuligt at skelne mellem kolonierne. Den logiske løsning på dette problem vil være at skabe mere plads mellem bakterierne – men hvor meget plads har de brug for?

Mikrobiologer anvender en fortyndingsrække til at reducere antallet af celler i en prøve. Cellerne kan enten fortyndes i vand, men hvis man i stedet fortynder cellerne i saltvand, sikrer man et isotonisk miljø, som er mere fordelagtigt for cellerne. På den måde vil flest mulige celler overleve. Når cellerne er fortyndet, kan en lille smule af hver fortynding fordeles (udplades) på en agarplade. Selve udpladningen medfører, at cellerne bliver fordelt udover hele agarpladens overflade. Hver CFU vil ende et vilkårligt sted på agarpladens overflade, hvor den vil begynde at dele sig og vokse til en koloni. Ved den ideelle fortynding vil kolonierne være spredt ud på hele pladen, og de vil være adskilt fra hinanden (figur 3-3A).

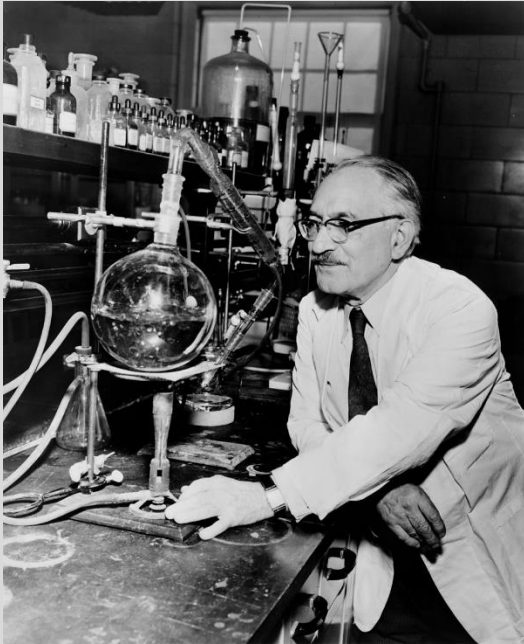
Når man skal undersøge kolonierne i laboratoriet, er det vigtigt at sikre sig, at hver koloni kun indeholder den samme art og ikke er forurennet af andre arter, da det vil gøre resultaterne uklare. Mikrobiologer bruger forskellige udpladningsstrategier til at sikre sig, at hver

koloni kun indeholder én enkelt art. Ved at separere koloniens celler, kan man observere, om der er ensartethed i koloniernes morfologi, eller om der er forskellige morfologier og dermed forskellige arter tilstede. Man opnår renkulturer af sine bakterier, når der kun er en enkelt art tilstede. Renkulturer er nødvendige, når vi vil lave kontrollerede eksperimenter med observationer, sammenligninger og kvantitative mål. Vi kan f.eks. få et bedre kendskab til en bakterie og dens egenskaber, hvis vi udsætter den for forskellige forhold (forskellige medietyper, temperaturer, inkubationstid, kemikalier osv.).

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

Milepæle indenfor mikrobiologi



Selman Waksman introducerede begrebet "antibiotika" og kan betragtes som en af lægevidenskabens pionerer på baggrund af hans opdagelse af flere antibiotika-producerende jordbakterier. Sammen med eleven Albert Schatz opdagede og udviklede han stoffet streptomycin, der produceres af aktinobakterien *Streptomyces griseus*. Streptomycin var den første effektive behandling mod tuberkulose. Waksman's opdagelser og kommercialiseringen af penicillin indledte dét, vi kalder "den gyldne æra" – en periode fra 1940'erne til 1960'erne, hvor man i stor stil opdagede nye antibiotiske stoffer. I perioden blev dusinvis stoffer opdaget og lanceret på markedet hvert år. Da man nåede 1980'erne var man overbevist om, at infektionssygdomme ikke længere var en trussel.

Alma Whiffen var en mykolog (svampeskander), som side om side med Waksman opdagede svampemidlet cykloheximid, der, ligesom streptomycin, også produceres af *Streptomyces griseus*. Cykloheximid bliver normalt anvendt i forskningslaboratorier f.eks. til at nedbringe vækst af svampe i bakteriekulturer og *ikke* til behandling af mennesker. Det skyldes, at midlet er toksisk (giftigt) overfor eukaryote celler (som f.eks. humane celler).



Fotos: commons.wikimedia.org

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

Biologiske spørgsmål:

- 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:

Indtil nu har vi beskæftiget os med strategier til at få *flest mulige* bakterier ud fra en jordprøve. Men giver dette os automatisk det *størst mulige* antal *forskellige* bakterier? Vil alle arter nødvendigvis gro lige godt på én bestemt type vækstmedie? For at kunne besvare disse spørgsmål må vi først dykke lidt ned i, hvordan mikroorganismer får den energi, der skal til for at kunne holde deres biologiske maskineri i gang.

Ligesom alle andre organismer bruger mikroorganismer energi til at producere organiske molekyler. Disse molekyler har specifikke biologiske funktioner og er nødvendige for at de kan vokse, dele sig og interagere med det omgivende miljø. Kendetegnet ved organiske molekyler er kulstofatomer (C), men derudover er hydrogen (H), oxygen (O), nitrogen (N), fosfor (P) og svovl (S) også nødvendige for dannelsen af cellens mest basale byggesten, som bruges til at danne makromolekyler som DNA, RNA og proteiner. Nogle mineraler og salte (f.eks. natrium, magnesium, jern, kalium og calcium) er også nødvendige for cellen men i mindre grad.

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^+)	Magnesium (Mg^{2+})	Kalcium (Ca^{2+})
Jern ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$)	Kalium (K^+)	Klorid (Cl^-)

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

Bakterier klassificeres på baggrund af deres ernæringsform

Bakterier kan inddeles i grupper alt efter, hvordan de kan skaffe kulstof og energi til at fremstille organiske molekyler. Nogle organismer kan producere organiske molekyler ved at fiksere kulstof fra uorganiske kilder som f.eks. CO_2 og bliver betegnet autotrofe. Eksempler er planter, alger og cyanobakterier. Heterotrofe organismer får deres kulstof fra organiske molekyler fra andre organismer. Eksempler herpå er dyr, protozoa, svampe og mange bakterier og arkæer.

Bakterier kan også inddeles i grupper baseret på deres tolerance overfor ilt. Mange (men ikke alle) bakterier er aerobe og kan overleve kontakt med atmosfærisk luft, der be-

står af ca. 21% O₂. Her bruger de ilt til at skaffe energi ved aerob respiration. Modsat kan O₂ være giftigt for anaerobe bakterier, som kun trives i miljøer fri for O₂. De anaerobe bakterier har en anden måde at skaffe sig energi på nemlig ved benyttelse af f.eks. sulfat eller nitrat.

		Energikilde	
		Lys (foto-)	Kemiske stoffer (kemo-)
Kulstofkilde	Kuldioxid (auto-)	Fotoautotrofe <ul style="list-style-type: none"> • Planter, alger, cyanobakterier • Grønne svovlbakterier og lilla svovlbakterier 	Kemoautotrof <ul style="list-style-type: none"> • Nitrificerende bakterier
	Organisk (hetero-)	Fotoheterotrofe <ul style="list-style-type: none"> • Grønne bakterier og lilla bakterier 	Kemoheterotrof <ul style="list-style-type: none"> • Aerob respiration: de fleste dyr, svampe og protozoa; mange bakterier

Tabel 4-3. Organismer klassificeres på baggrund af deres metabolisme; hvordan de skaffer energi og kulstof.
Tabel fra Bauman, Microbiology 1st ed., Figure 6.1

Vækstmedie og vækstbetingelser

I laboratoriet dyrkes bakterier i vækstmedier, der indeholder essentielle næringsstoffer. Vækstmediets ingredienser kan både være baseret på ekstrakter fra dyr, planter og svampe, men de kan også være syntetisk fremstillet i et laboratorium. Nogle grupper af bakterier har bestemte præferencer, og vækstmediet kan derfor justeres til selektivt at fremme væksten af forskellige grupper af bakterier fra f.eks. en jordprøve. Derudover kan vækstmedier med fordel beriges med forskellige organiske molekyler, makromolekyler og vitaminer for at fremme væksten af bakterier med meget specifikke behov. I andre tilfælde kan det være en fordel at anvende et meget simpelt vækstmedie, som kun består af simple sukre, salte og vand.

Fysiske parametre som lys, temperatur og tonicitet kan også have stor indflydelse på de bakterier, man får dyrket på sin agarplade. Sammensætningen og koncentrationen af ioner og molekyler i det omgivende miljø har også stor indflydelse på cellens stabilitet. Et vækstmedie med mangel på elektrolytter kan medføre et hypotonisk miljø, som medfører, at cellerne kan bryde. Det omvendte scenarie, et hypertonisk miljø, kan derimod medføre, at cellerne svinder ind og dør. Derudover kan mange bakterier kun overleve inden for et snævert pH-range.

Når en bakterie danner kolonier på en agarplade, betyder det, at forholdene er tilstrækkelige til at den kan overleve og dele sig. Men det betyder ikke nødvendigvis, at alle bakteriens behov er opfyldt. Bakteriens evne til at udtrykke bestemte gener kan b.l.a. afhænge af signaler eller stimuli fra det omgivende miljø. Disse gener bliver derfor ikke nødvendigvis udtrykt, når bakterien dyrkes i laboratoriet. Nogle forskere forsøger at udpege nogle af disse "slukkede" gener, der koder for produktionen af potentielle nye sekundære metabolitter for at forsøge at stimulere udtrykkelsen af dem.

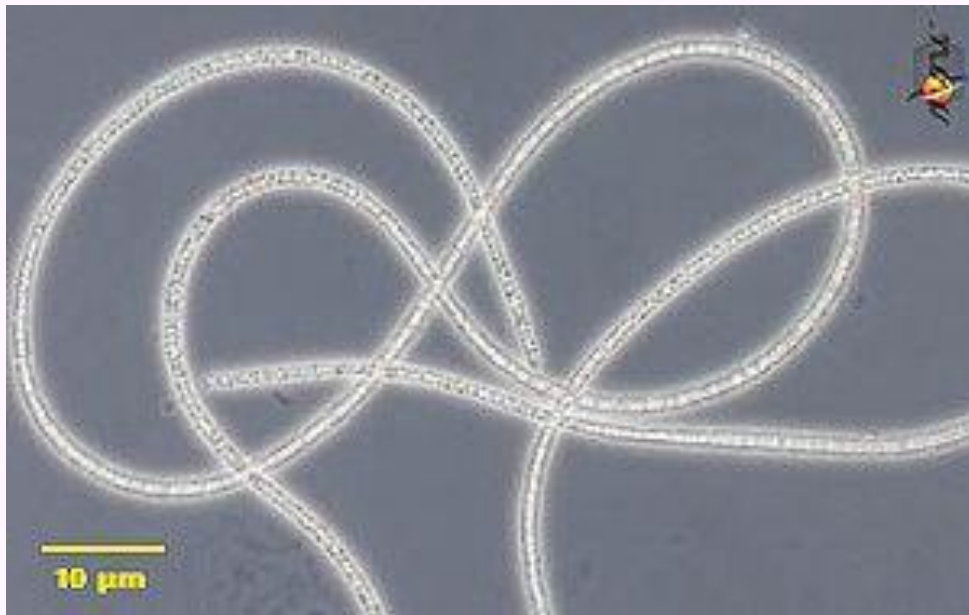
Den største hæmsko i forhold til at opklare det biodiverse og biosyntetiske potentiale blandt mikrober er nok at finde den rigtige kombination af vækstforhold og stimuli, der promoverer væksten af bestemte bakterier eller stimulerer udtrykkelsen af bestemte gener. Meget forskning peger på, at mange bakterier er afhængige af at være en del af et mikrobielt samfund, hvor de kan udveksle signaler, genetisk materiale, næringsstoffer og andre stimuli. De er simpelthen afhængige af deres "naboer" for at "tænde" en bestemt biologisk respons i cellerne. Når det kommer til vækstforhold, er der langt flere variabler, end vi kan teste for i et eksperiment, men jo flere måder vi isolerer og dyrker bakterier på, des mere kan vi lære om det, der er tilstede i vores prøve. Brug din fantasi!

Referencer

Bauman, R. (2003). *Microbiology* (1st 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* (2nd ed.). New York: W.W. Norton & Co.



Livet på bakteriernes planet

Dette billede fra et mikroskop viser lange tråde (filamenter) dannet af den svovloxiderende bakterie *Beggiatoa*. Denne mikroorganisme er et eksempel på en lithotrof organisme, som anskaffer næring ved at omsætte uorganiske stoffer som f.eks. reducerede uorganiske stoffer og mineraler fra sten. Sådanne organismer kaldes derfor også "rock eaters". Både bakterier og arkæer kan være lithotrofe, og de kan findes i meget ekstreme miljøer som f.eks. hydrotermiske væld. *Beggiatoa* var det første eksempel på en lithotrof bakterie, som blev opdaget i et svovlholdigt miljø i nærheden af et hydrotermisk væld på bunden af havet. *Beggiatoa* oxiderer svovlforbindelser som f.eks. sulfid (S^{2-}) som energikilde og kuldioxid (CO_2) som kulstofkilde.

Foto: <https://alchetron.com/Acidophile>

Øvelse 4: Valg af vækstmedie og vækstforhold

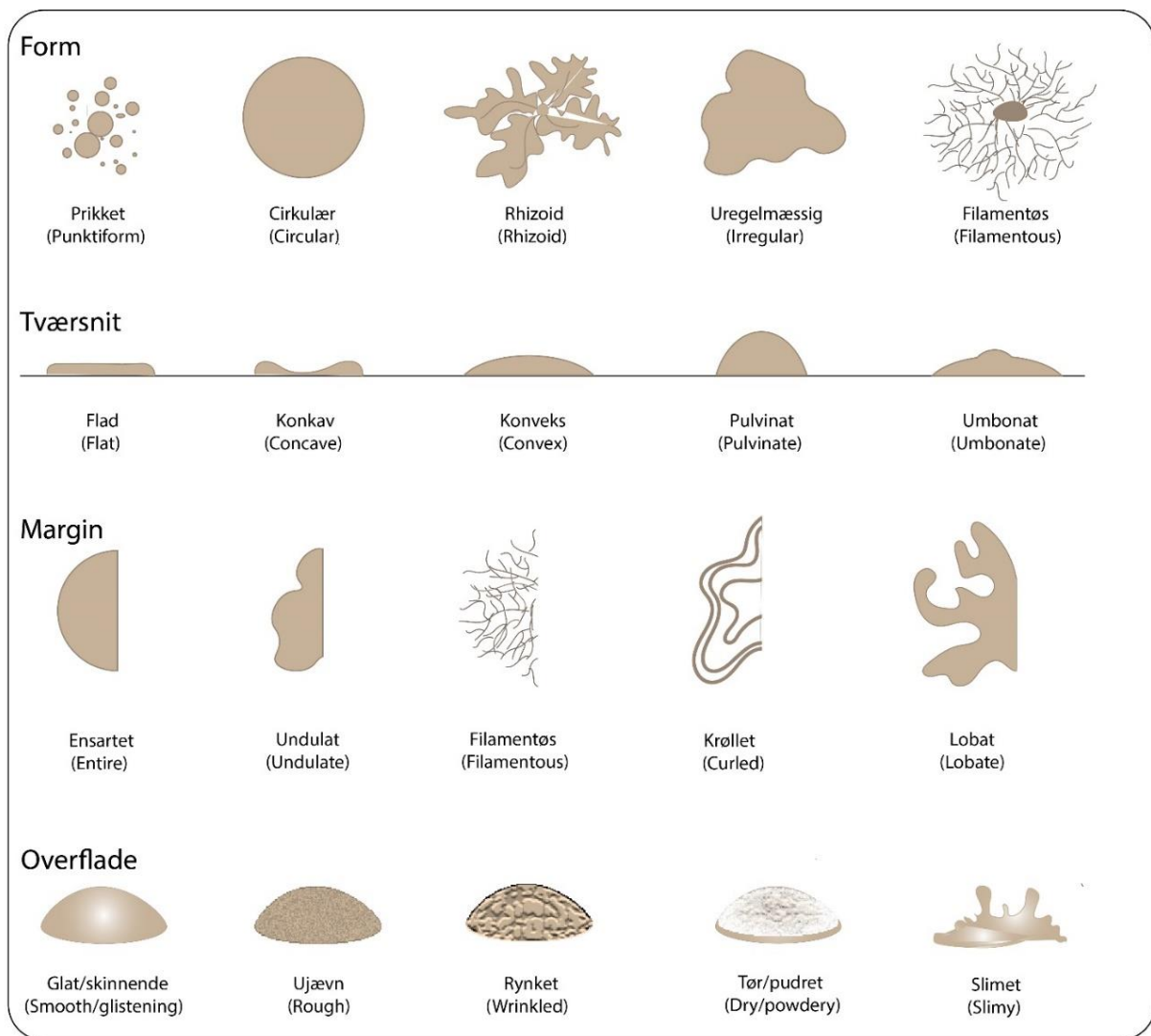
Biologiske spørgsmål:

- 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 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.



Figur 5-2. Jordbakterier udpladet på 10%NB-medie. Jordbakterierne udviser forskellige morfologiske karakteristika.

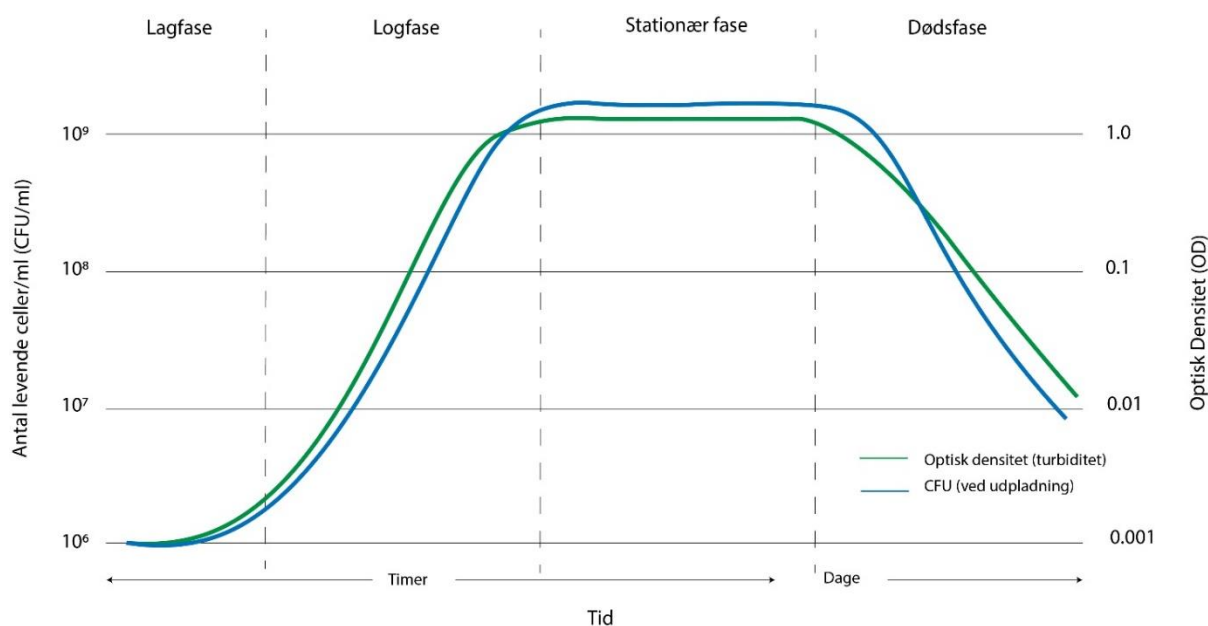
Desværre kan bakteriers morfologi ikke fortælle os noget om, hvor tæt beslægtede bakterierne er. En beskrivelse af bakteriens morfologi er derfor ikke *tilstrækkelig* til at identificere ukendte bakterier. Dog kan bakteriens morfologiske karakteristika hjælpe med at pege os i den rigtige retning. Nogle bakterier udviser nemlig meget karakteristiske morfologier. *Lysobacter* og *Pseudomonas* er f.eks. typisk karakteriseret ved en slimet overflade, en uregelmæssig form samt evnen til at fluorescere ved UV-belysning. Kolonier fra slægten *Streptomyces* er ofte meget farverige og har en meget karakteristisk "pudret" overflade, der indeholder sporer.

Vækstfaser

Når vi dyrker bakterier på fast medie giver det os muligheden for at studere bakteriekolonierne morfologi, men det giver os også muligheden for at isolere hver enkelt koloni i en renkultur. Dette kan f.eks. gøres ved at lave en fraktioneret udstrygning af en enkelt koloni på en ny agar plade, så man ender op med enkeltliggende kolonier. Dette kaldes en renstrygning (figur 3-3C). Fra denne renkultur på fast medie kan vi nu gå over til at dyrke bakterien i flydende medie. Det er nødvendigt at dyrke bakterien i flydende medie, hvis vi f.eks. vil undersøge bakteriens vækst, vækstkinetik og biokemi i forskellige vækstfaser.

Modsat fast vækstmedie, hvor bakterier er i direkte kontakt med både hinanden og deres substrat, er bakterier i flydende kulturer planktoniske dvs. fritsvømmende. Her kan bakterierne bevæge sig rundt i mediet, og hvis der er tilstrækkelig omrøring, vil cellerne være ligeligt fordelt i mediet. Mange bakterier kræver iltning for at kunne gro i en flydende kultur, og derfor bliver bakterier i flydende kulturer ofte dyrket på rysteborde. Dog skal man være opmærksom på, at ikke *alle* bakterier trives i et planktonisk miljø. Mange jordbakterier er ikke egnede til at vokse i flydende kulturer, så når de overføres fra fast vækstmedie til flydende vækstmedie, vil der være en nedgang i antallet af levende celler.

Bakteriers vækst kan følges ved brug af et spektrofotometer. Her kan bakterievæksten estimeres ud fra mængden af lys (med en bølgelængde på 600 nm), der absorberes af bakteriekulturen over tid, og dette angives som optisk densitet (OD). Jo mere bakterievækst, des mere uklar vil kulturen blive, og des højere vil OD-værdien være. Forholdet mellem OD-værdier og koncentrationen af celler kan bruges til at bestemme bakteriers væksthastighed. Når OD-værdier plottes som funktion af tiden, får vi en standard vækstkurve som vist på figur 5-3. Denne vækstkurve er et nyttigt værktøj til at studere, hvordan en bakteriepopulation ændres over tid. Vækstkurven viser, hvordan bakterier gennemgår forskellige vækstfaser i flydende kulturer. Disse vækstfaser er vejledende i forhold til bakteriernes fysiologiske og metaboliske tilstand.



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

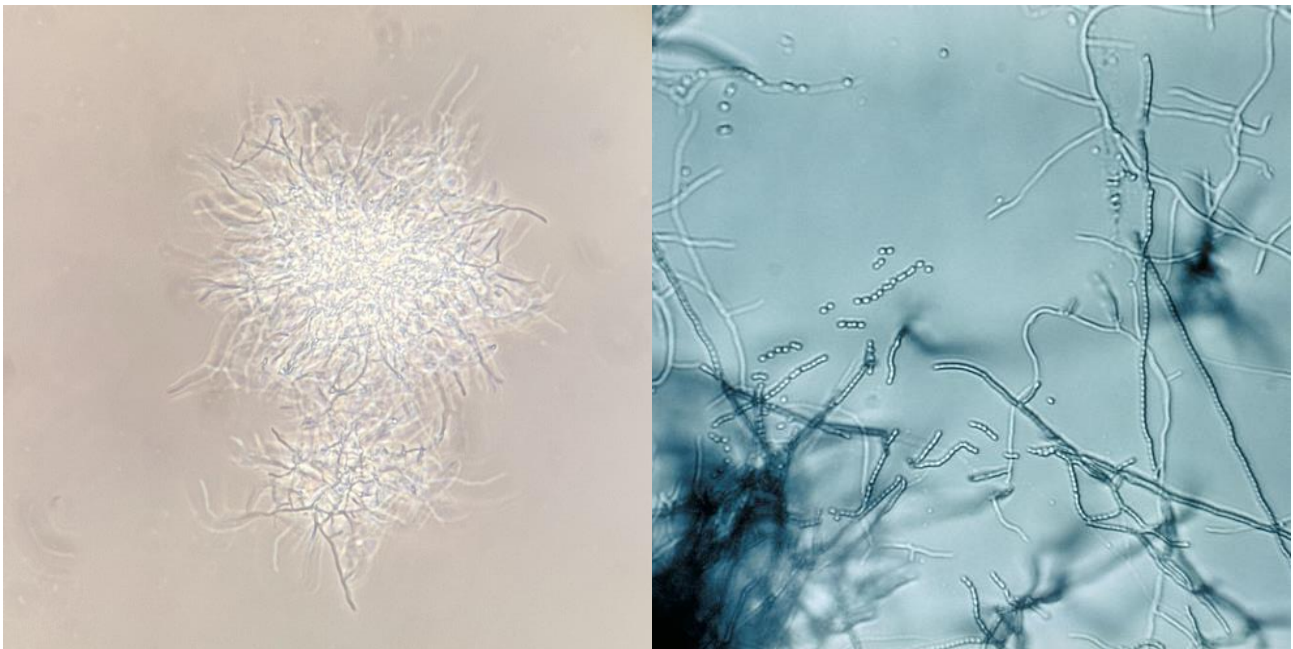
Når bakterier overføres og introduceres til et nyt vækstmedie kræver det lidt tilvænning, hvilket betegnes som bakteriens lagfase. Det er begrænset, hvor meget bakteriepopulationen vokser i denne fase. I stedet benytter bakterien lagfasen til at opfange signaler fra det nye miljø og ændre samt tilpasse sin metabolisme til de nye forhold. Når det er sket, begynder cellerne at dele sig hurtigt - dette kaldes den eksponentielle vækstfase. I denne fase er bakterierne meget metabolisk aktive, og de omsætter næringsstofferne fra mediet til energi og til fremstilling af makromolekyler til dannelsen af nye celler. Sekundære metabolitter (f.eks. pigment eller antibiotika) bliver normalt produceret hen imod slutningen af den eksponentielle vækstfase. Her er antallet af celler på sit højeste, og næringsstofferne er ved at være opbrugt. Det er tidligere beskrevet, at bakterier, der tilhører slægten *Streptomyces*, indleder den sekundære metabolisme, når produktionen af essentielle komponenter som f.eks. DNA ophører. Derfor er antibiotika produktio-

nen for disse bakterier vækstfase-afhængig, og sammensætningen af det pågældende vækstmedie samt tilgængeligheden af næringsstoffer i vækstmediet har dermed stor betydning. I den stationære fase er væksten begrænset, da der dannes ligeså mange celler, som der dør pga. mangel på næringsstoffer og akkumulerede affaldsstoffer. Den stationære fase kan vare fra timer til dage afhængigt af cellernes respons på et miljø med begrænset næring, der i stigende omfang bliver toksisk. Med tiden overstiger antallet af døde celler antallet af levende og delende celler, og dødsfasen indledes.

Sporedannelse

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.

Mange *Streptomyces* ændrer udtryk, når de indleder sporedannelsen. *Streptomyces* har en karakteristisk forgrenet vækstform kaldet mycelia, hvilket betyder, at cellerne vokser



Figur 5-5. Venstre: Pellet fra en kultur af *Streptomyces* sp. observeret i et lysmikroskop under fasekontrast ved 40x forstørrelse. På billedet ses bakteriens karakteristiske filamentøse morfologi med lange mycelia filamenter. Bakteriernes sporer fremstår oplyst. Højre: *Streptomyces* sp. observeret i en lysmikroskop under fasekontrast ved 400x forstørrelse. Her ses et nærbillede af bakteriens mycelia filamenter samt lange kæder af exosporer.

Foto (højre): commons.wikimedia.org

i lange kæder. *Streptomyces* kan pga. denne mycelia minde en smule om svampe. Dannelsen af mycelia hænger ofte sammen med påbegyndelse af den sekundære metabolisme, og særligt disse bakterier er kendt for at danne størstedelen af den antibiotika, vi kender i dag. Efterfølgende medfører denne forgrenede mycelium også dannelsen og frigivelsen af de reproduktive sporer.

Arter af *Bacillus* og *Clostridium* kan producere særligt sejlvivede endosporer. Når forholdene i det omgivende miljø ikke længere er favorable, bliver endosporer frigivet, og den oprindelige celle dør. Sporerne er ekstremt modstandsdygtige og særdeles tolerante overfor varme, tørke, kulde, giftstoffer mm. Det medfører, at de kan forblive i et sådan stadie i lang tid - helt op til flere hundrede tusind år.

Referencer

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd 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* (2nd 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

Biologiske spørgsmål:

- 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:

Mange sygdomme som bl.a. kolera og den sorte død er gennem historien blevet forbundet med miasma eller "usund luft". Derudover troede datidens samfund på spontan genese, altså at organismer kan opstå ud fra ikke-levende ting. Dette var sammen med miasma-teorien årsag til, at det førindustrielle samfund ikke fik koblet mikroorganismer med infektionssygdomme. De havde derfor ikke kunne udvikle effektive strategier til at forebygge og kontrollere sygdomsudbrud.

I midten af 1800-tallet lykkedes det dog John Snow at aflive nogle af disse misforståelser ved at koble spredningen af kolera til én bestemt kloakforurenede drikkevandspumpe i London. Under koleraudbruddet døde hundredvis af de mennesker, der drak af vandet fra den pågældende Pumpe. Snøvs detaljerede epidemiologiske undersøgelse førte for det første til at pumpen blev lukket, men det medførte derudover også en øget opmærksomhed på vandkvalitet, hygiejne og sanitet.

I samme periode aflivede Louis Pasteur, fransk kemiker og mikrobiolog, teorien om spontan genese. Han påviste, at der ikke spontant opstår vækst af levende organismer i en steril væske, men at vækst derimod opstår som et produkt af en forurening udefra. Denne opdagelse var særlig vigtig i en tid, hvor fordærvet mad var helt almindeligt. Pasteur blev klar over, at løsningen måtte være at konservere mad og drikkevarer ved at nedbringe antallet af bakterier ved varmebehandling. Denne proces blev efterfølgende kendt som pasteurisering.

Pasteurs revolutionerende arbejde førte til det vi kalder kimteorien – altså teorien om at visse sygdomme er forårsaget af mikroorganismer som f.eks. bakterier. Derudover blev datidens forskere i samme periode opmærksomme på, at bakterier er til stede overalt, og at de også spiller en nyttig rolle. Gær blev bl.a. anvendt til fremstilling af vin, og bakterier blev anvendt til at fermentere mælk til yoghurt.

Det var den tyske læge Robert Koch, der særligt bidrog til identificering af patogener (sygdomsfremkaldende) bakterier. Koch opstillede en række eksperimenter med målet om at undersøge, hvad der forårsagede tuberkulose og miltbrand. Det var i den forbindelse, at Koch opstillede en række postulater, der beskriver en række kriterier, der skal være opfyldt, førend man kan betegne en mikroorganisme som patogen:

- 1) Mikroben findes altid i syge mennesker, men den findes ikke i raske mennesker
- 2) Mikroben er isoleret fra et sygt menneske og er dyrket i en renkultur

- 3) Når mikroben fra den dyrkede renkultur introduceres i et rask menneske, vil det medføre samme symptomer
- 4) Hvis mikroben re-isoleres i renkultur fra det syge menneske vil den have samme karakteristika som originalen

Dette var i slutningen af 1800-tallet revolutionerende. Koch formåede at identificere *Bacillus anthracis* og *Mycobacterium tuberculosis*, som forårsager hhv. miltbrand og tuberkulose. Han modtog i 1905 Nobelprisen i fysiologi og medicin for sit arbejde. Kochs simple og logiske kriterier hjælper stadig moderne kliniske mikrobiologer med at identificere patogene bakterier. I dag har vi fået en god forståelse for sammenhængen mellem mikrober og sygdomme; denne viden har gjort det muligt at forebygge og behandle infektionssygdomme i hele verden. Ikke desto mindre er menneskeheden stadig truet af sygdomme forårsaget af mikroorganismer. Patogener, som vi engang troede, at vi havde besejret, dukker op igen i resistente udgaver - og de gør det med en uhyggelig fart. Som konsekvens begynder vi at løbe tør for behandlingsmuligheder. Hospitaler er blevet hjemsted for multiresistente "superbugs", og overforbruget af antibiotika i landbruget og i private hjem driver den antibiotikaresistente udvikling. Måden hvorpå patogener tilegner sig resistensgener er kun delvist opklaret, og det er et vigtigt forskningsområde i dag (læs mere om resistens i kapitel 10).

Valg af test organisme

Vi isolerer en masse jordbakterier i håbet om, at nogle af dem vil producere antibiotika. Vi vurderer deres evner til potentielt at producere antibiotika ved at undersøge, om bakterierne kan slå en anden bakterie (en test organisme) ihjel. Af praktiske årsager vil man ofte vælge indledningsvist at teste *alle* isolater mod et par *enkelte* test organismer. I tilfælde af, at et isolat udviser aktivitet, kan der efterfølgende testes mod et bredere panel af test organismer.

Prokaryoter er forskellige i forhold til deres opbygning og deres fysiologiske karaktertræk. Derfor vil der også være forskel på, hvordan de bliver påvirket af et bestemt antibiotikum. Noget antibiotika er bredspektret, hvilket betyder, at det har en effekt på en bred vifte af bakterier. Andet antibiotika er smalspektret og har kun en effekt på én eller få bakterier. Særligt cellevæggens opbygning spiller tit en stor rolle i forhold til, hvorvidt et antibiotikum har en inhiberende 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 test organismer I vil teste jeres isolater imod.

ESKAPE patogenerne

Når man skal vælge en test organisme, vil det logiske valg være at vælge en, der er klinisk relevant. En bakterie er klinisk relevant, hvis det f.eks. er en human patogen dvs. en sundhedsskadelig bakterie, der udgør en trussel mod mennesker. Der findes i dag seks mikroorganismer, som *særligt* udgør en trussel - ikke fordi de udgør en massiv byrde i form af sygelighed og dødelighed, men derimod fordi de medfører størstedelen af de antibiotikaresistente infektioner, vi ser på hospitalerne i dag. Der er tale om *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* og flere *Enterobacter* arter (**ESKAPE**).

Det vil være ideelt at teste, hvorvidt jeres isolater kan slå én eller flere af disse humane patogener ihjel, men det er ikke muligt i et undervisningslaboratorie pga. infektionsrisiko. Vi kan dog drage udnytte evolutionen og teste isolaterne mod bakterier, der er meget tæt beslægtet med ESKAPE patogenerne - men som ikke udgør en sundhedsmæssig risiko. De har mange af de samme anatomiske og fysiologiske egenskaber som deres beslægtede ESKAPE, men det er forsvarligt at arbejde med dem i et undervisningslaboratorie, så længe almindelig laboratoriesikkerhed og god laboratoriepraksis 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.

Tabellen ovenover viser de seks ESKAPE og deres "ufarlige pendant". Derudover kan I også teste jeres isolater mod *Mycobacterium smegmatis*, som er tæt beslægtet med den sundhedsskadelige *Mycobacterium tuberculosis*, der hvert år forårsager millioner af dødsfald på verdensplan. I kan også teste jeres isolater mod *Saccharomyces cerevisiae* for at teste, om jeres isolater kan slå gærsvampe ihjel.

Ikke alle bakterier er sundhedsskadelige:

Selvom vi oftest hører om patogene bakterier og de sygdomme, de kan medføre, er det vigtigt at have in mente, at vi konstant er omgivet af bakterier – også de gode af slagsen. De findes både i og på vores krop, i den mad vi spiser og i miljøet omkring os. Hvis du blev bedt om at undersøge hver enkelt celle i og på din krop, ville du hurtigt opdage, at størstedelen af dem faktisk ikke er humane celler. Faktisk så overstiger det humane mikrobiom (betegnelsen for alle de bakterier, der lever i og på din krop) antallet af humane celler ca. 2:1. Forskning viser, at vores egne celler konstant er "badet" i metabolitter fra bakterier. Der kan derfor ikke være nogen tvivl om, at så mange mikrober må have en væsentlig påvirkning på vores liv og vores helbred.

Det vrirler med aktivitet i tarmen. Tarmens mikrobiom består af over 100 milliarder bakterier pr. cm^3 . Dette konsortium af mikroorganismer består bl.a. af arter af *Bacteroides*, *Clostridium* og *Escherichia*. Vores tarmflora er vigtig for vores sundhed, og ændringer eller forstyrrelser i tarmfloraen kan medføre metaboliske og fysiologiske lidelser.

Forskellige Gram-positive bakterier som f.eks. *Staphylococcus* eller *Bacillus* findes særligt på vores hud, og de udgør derfor også en del af det humane mikrobiom. Her spiller de en vigtig rolle i immunforsvarets første forsvarslinje mod infektioner. Forskning har bl.a. vist, at mus med *Staphylococcus epidermidis* på deres hud udviste bedre immunrespons end mus uden.

Probiotika er en betegnelse for mikroorganismer (bakterier og gærsvampe), der indtages med målet om at opnå en sundhedsfremmende effekt. Probiotika kan indtages som tabletter, men de findes også naturligt i mange fermenterede fødevarer bl.a. i yoghurt. Farmakologen John Cryan opstillede en række forsøg med målet om at undersøge den neurologiske effekt af probiotika på mus. Han fandt ud af, at bestemte probiotika havde en imponerende virkning på dyrenes angst- og stressniveau. Mus var, som følge af behandling med probiotika, mere villige til at bl.a. at beskytte dem selv, hvilket tyder på et lavere niveau af angst. Andre studier indikerer, at bakterier, der lever i mave- og tarmregionen hos pattedyr, har indflydelse på sygdomme som astma, autisme, colitis, cancer, fedme og diabetes. Sådan nogle opdagelser er revolutionerende i forhold til den måde, vi betragter mikrober på, og det kan med sikkerhed føre til spændende opdagelser i fremtiden.

Bioteknologi er anvendelsen af biologiske systemer, levende organismer og deres produkter til at imødekomme menneskets behov. Vi har i årtusinder anvendt gær og bakterier til at fermentere mad og drikkevarer samt sikre sunde afgrøder. Vi udvinder og udnytter bakterier i husholdningen såvel som i forbindelse med medicinsk behandling; lipaser og proteaser findes i bl.a. vaskepulver, og botulinumtoksinet (bedre kendt som botox) bruger vi til at fjerne rynker og til behandling af enkelte sygdomme. Derudover bruger vi mikroorganismer som et værktøj indenfor bioengineering. Vi kan udnytte bakterier og

gær som cellefabrikker ved f.eks. at kloner humane gener og få produceret værdifulde proteiner som f.eks. insulin. Derudover kan bakterier udnyttes til at fjerne luftforurening og dermed afgifte forurenede miljøer som f.eks. svinestalde. Så selvom nogle bakterier er skadelige overfor mennesker, dyr eller planter, så virker listen over fordele ved mikroberne dog uendelig lang.

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 ESCAPE! 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., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J. A., Dzutsey, 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* (2nd ed.). New York: W.W. Norton & Co.



Figur 6-1. Elektron-mikrograf der viser *Helicobacter pylori*, der lever i maven. På billedet ses bakteriens mange flageller, som bakterien bruger til at bevæge sig ind i mucus-laget i mavens slimhinde. Foto: commons.wikimedia.org

Milepæle inden for mikrobiologi

Den australske læge og professor Barry Marshall opdagede i 1982, at mavesår skyldes bakterier, der lever i vores mave. Man havde ellers tidligere troet, at bakterier ikke kunne overleve i mavens sure miljø. Marshall blev i starten ikke anerkendt for sin opdagelse. Han havde svært ved at dyrke denne bakterie kaldet *Helicobacter pylori* i en kultur, og det såede tvivl om troværdigheden af hans opdagelse. Derfor forblev spekulationerne om årsagen til mavesår. Da det omsider lykkedes Marshall at dyrke *Helicobacter* bakterien, drak han en kultur med de sundhedsskadelige bakterier i et forsøg på at overbevise folk om sin opdagelse. Han udviklede kort efter symptomer på mavesår. En endoskopi og en biopsi slog fast, at bakterien faktisk var tilstede, og at indersiden af mavens slimhinde var betændt. Efter behandling med antibiotika begyndte symptomerne at aftage, hvilket beviste, at *H. pylori* faktisk var årsagen til mavesår. Marshall udførte sine eksperimenter i 1980'erne og modtog i 2005 Nobelprisen for sin opdagelse, som på mange måder revolutionerede vores syn på bakterier. Hans opdagelse lærte os, at bakterier kan gro under ekstreme forhold, og at ikke alle bakterier let kan dyrkes i kulturer.

Øvelse 6: Mod ESKAPE-patogenerne

Biologiske spørgsmål:

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

Alexander Fleming gjorde i 1928 en "tilfældig" opdagelse, som skulle vise sig at være noget af et gennembrud indenfor lægevidenskaben. Han opdagede penicillin fra skimmelsvampen *Penicillium notatum* - det første antibiotikum til effektiv behandling af en lang række infektioner. Men hvor "tilfældig" var denne opdagelse i grunden? Var Fleming virkelig den første til at observere mikrobiel bioaktivitet? Sandheden bag denne opdagelse er nok nærmere, at det var muligt for Fleming at opdage denne aktivitet, fordi han allerede vidste, hvad han ledte efter. Med mange års erfaring indenfor sit felt havde Fleming en solid mikrobiologisk værktøjskasse med færdigheder, og han var dygtig til at observere og sætte spørgsmålstejn ved sine observationer. Det gjorde det muligt for ham at forvandle en observation i laboratoriet til et enormt medicinsk gennembrud.

Op igennem 1800-tallet blev antiseptiske midler anvendt til behandling af infektioner specielt blandt sårede soldater. Dog var disse antiseptiske midler langt fra uden bivirkninger, da de både ødelagde væv og skadede immunsystemet. Behandling med sådanne midler blev refereret til som "det antiseptiske dilemma".

I starten af 1900-tallet begyndte Fleming sin søgen efter et alternativ til disse antiseptiske midler. Han søgte et stof, der selektivt kunne dræbe bakterier uden at skade menneskets egne celler. Han var ikke alene i sin søgen, og det var netop også samme tanker, som lå bag Paul Ehrlichs hypotese om "the magic bullet". Erlichs hypotese udsprang fra et samarbejde med den tyske farveindustri, og han resonerede, at hvis bestemte farve selektivt kunne farve bakterier, så kunne man også finde stoffer, der selektivt ville inhibere væksten af dem. Erlich udviklede det første syntetiserede antibiotikum, salvarsan, i 1909. Salvarsan var effektivt i behandling af syfillis, men det blev senere opdaget, at stoffet var giftigt overfor mennesker, hvilket gør det til et oplagt eksempel på et antiseptisk dilemma.

Det var ikke før 1928, at Fleming gjorde en opdagelse blandt nogle stakke af gamle agarplader. Fleming opdagede, at en af pladerne var kontamineret. Det var ikke usædvanligt, at der en gang imellem blev observeret uønsket vækst af skimmelsvamp, men der var alligevel noget usædvanligt ved netop én af pladerne. Fleming bemærkede, at der blev dannet inhiberingszoner omkring skimmelsvampen, når den groede på agarplader med stafylokokker. Bakterien var altså ikke i stand til at gro tæt på skimmelsvampen, hvilket fik Fle-

ming til at tænke, at skimmelsvampen var i stand til at udskille noget, der kunne slå bakterien ihjel. Fleming var fascineret af sin opdagelse og påviste senere, at inhiberingszonen var forårsaget af stoffet penicillin.

Fleming lavede mange forskellige tests mod forskellige patogene bakterier for at bestemme virkningen af penicillin. Penicillin inhiberede vækst af Gram-positive bakterier, som var involverede i skarlagensfeber, lungebetændelse, gonoré, meningitis og halsbetændelse uden at have nogen skadelig effekt på eukaryote celler. Det levede dermed op til de krav, som Fleming år forinden havde stillet til et potentielt mirakelmiddel. Fleming var dog ikke i stand til at oprense stoffet, hvilket ikke gjorde det muligt at teste det *in vivo*. Han kunne simpelthen ikke teste penicillin på mennesker uden at skulle udsætte dem for alle de andre stoffer, som skimmelsvampen også producerede.

Arbejdet med penicillin blev dermed lagt på hylden i 10 år indtil Howard Florey og Ernst Chain faldt over Flemings opdagelse. Deres kemiske viden gjorde det muligt at oprense stoffet og teste dets effekt *in vivo*, og resultaterne viste, at stoffet var egnet til behandling. Penicillin kom på markedet tids nok til at blive anvendt som behandling i Anden Verdenskrig, hvilket kraftigt reducerede andelen af soldater, der døde som følge af infektion. Det kollektive samarbejde om opdagelsen af det første naturlige antibiotikum penicillin førte til at Fleming, Florey og Chain i 1945 vandt Nobelprisen i fysiologi og medicin.



From a Spoiled Cantaloupe in Peoria . . .
the best of 100,000 strains of Penicillium

Milepæle inden for mikrobiologi

Opdagelsen af penicillin startede en verdensomspændende søgen efter varianter (stammer) af *Penicillium* svampen, som kunne producere store mængder af stoffet i flydende kultur. Mary Hunt (også kendt som "Moldy Mary" fra det engelske "mold" som betyder skimmelsvamp) var en amerikansk laborant fra Dr. Kenneth Rapers laboratorie i Illinois. Hun gennemsøgte frugt og grønt på lokale markeder i jagten på *Penicillium* stammer. Fra overfladen af en cantaloupe-melon isolerede hun en stamme, som producerede den hidtil højeste koncentration af penicillin. Dyrkningen af denne stamme blev optimeret, hvilket gjorde det muligt at masseproducere penicillin, som blev sendt afsted til frontlinjen under Anden Verdenskrig.

Foto: <http://www.peoriahistoricalsociety.org/!/Exhibits-PenicillinMoldyMary>



Milepæle inden for mikrobiologi

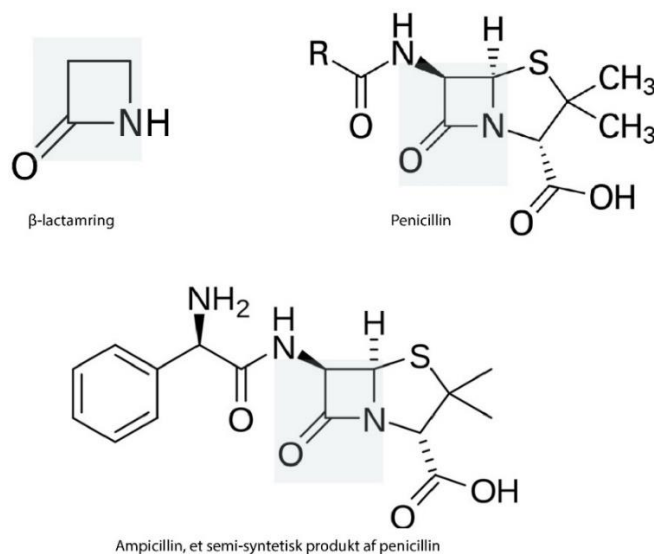
Det er værd at have in mente, at Fleming ikke var den første til at gøre denne slags observationer. Skrifter fra det gamle Egypten beskriver brugen af muggent brød til behandling af sår, mens Biblen nævner helbredende egenskaber ved brug af planten isop. Det var på netop denne plante, at den svenske naturalist Westling isolerede *Penicillium notatum* flere tusind år senere. Selvom Fleming introducerede os for navnet "penicillin" er en gruppe arkæologer sidenhen bragt i vildrede over fundet af en salve fra Romersk tid med indgravningen "PENICILLE". I alle disse år har folk udforsket disse skimmelsvampe for deres helbredende egenskaber uden at forstå den kemi og biologi, som ligger bag. Mange videnskabsmænd forsøgte tilbage i 1800-tallet at finde årsagen til svampenes inhiberende virkning. Joseph Lister blev opmærksom på *Penicillum* svampens inhiberende virkning på bakterier hele 10 år før Fleming blev født - og 10 år senere forklarede en anden videnskabsmand denne inhibering med "udskillelsen af et specifikt stof" men uden yderligere at forklare, hvad der blev udskilt, og hvilket stof der var tale om. Den franske videnskabsmand Ernest Duchesne behandlede og kurrerede endda mus for tyfus ved at injicere dem med svampekulturer. Ikke desto mindre var der ikke nogle af disse videnskabsmænd, der formåede at identificere stoffet eller drage nogle konklusioner ud fra deres forskning.

Denne historie understreger, at bag enhver opdagelse ligger en organiseret laboratorielogbog samt en portion held og vedholdenhed.

Antibiotikas opbygning

Penicillin var særpræget, da det selektivt slog bakterier ihjel modsat de antiseptiske virkemidler, der både slog bakterier og humane celler ned. I 1942 opfandt Selman Waksman begrebet "antibiotika" til at beskrive små molekyler produceret af mikrober, der kan enten kan hæmme eller eliminere væksten af andre mikrober. "Små molekyler" henviser til det faktum, at antibiotika er mindre end de makromolekyler, som cellen består af. Forskellige typer af antibiotika varierer meget i deres struktur, og de opdeles derfor i forskellige klasser. Et eksempel på en af disse klasser er β -lactam-antibiotika som f.eks. penicillin. Denne type antibiotika er karakteriseret ved en særlig ringstruktur, som gør det muligt for stofferne at inhibere cellevægddannelsen, som er nødvendig for en bakteries overlevelse. En af de nyere opdagelser er antibiotikaklassen Abyssomicin, som blev opdaget i Japan 2004. Denne klasse har meget passende fået sit navn efter at den blev opdaget cirka 300 meter under havets overflade (abyss = afgrund). Denne klasse kendetegnes ved polycykliske stoffer produceret af særlige havbakterier kaldet *Verrucosipora*. Abyssomicin C inhiberer væksten af vancomycin- og methicillinresistente *Staphylococcus aureus* ved at blokere for dannelsen af folsyre.

Oprindeligt blev begrebet *antibiotika* kun brugt om antimikrobielle stoffer, der naturligt produceres af mikroorganismer. Dette inkluderer kendte stoffer som penicillin, streptomycin og kloramfenikol, som alle oprindeligt er isoleret fra mikroorganismer. Disse naturlige stoffer udgør ca. 60-80% af alle antimikrobielle stoffer, vi benytter i dag; resten er kemisk fremstillede stoffer, som er fremstillet med stor inspiration fra stoffer produceret af mikroorganismer. Derfor bliver begrebet antibiotika i dag brugt både om stoffer produceret af mikroorganismer og stoffer produceret af kemikere.

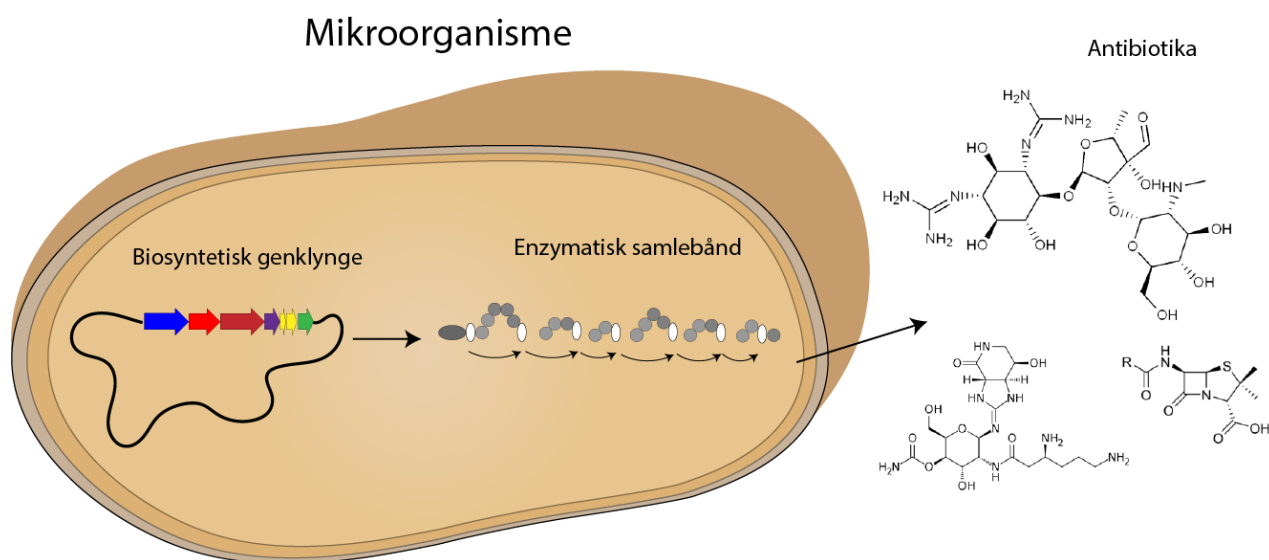


Figur 7-1. Antibiotika fra klassen β -lactam (f.eks. penicillin og ampicillin) indeholder alle en ringstruktur kaldet β -lactamring. Denne struktur gør denne klasse af antibiotika i stand til at hæmme cellevægssyntesen.

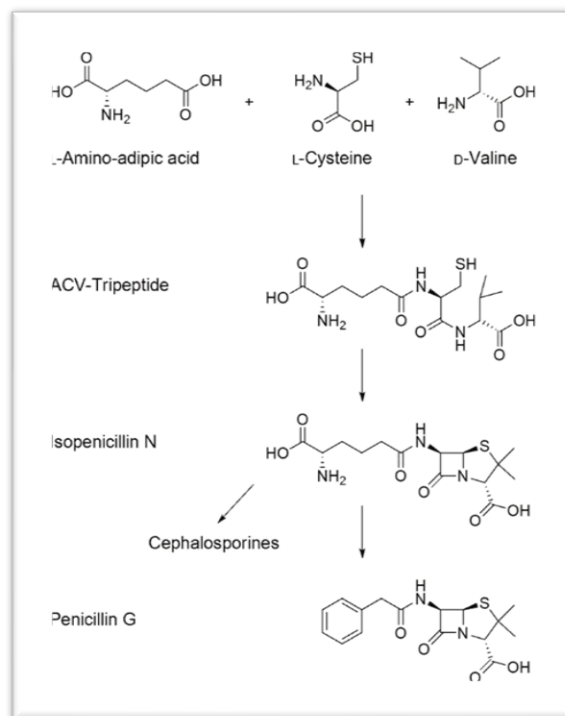
Antibiotika – biosyntese

Særligt bakterier tilhørende gruppen *Streptomyces* har gennem tiden været gode kilder til antibiotika, og ca. 60% af den antibiotika, vi bruger til behandling af infektioner i dag, kommer fra denne type bakterier. Denne type bakterier viser fortsat sit værd, som vi lærer dem bedre at kende. Forskning har vist, at disse bakterier ofte har evnerne rent genetisk til at producere op mod 20 forskellige slags antimikrobielle stoffer. Det er bare ikke altid, at disse stoffer bliver produceret, når vi undersøger bakterierne i laboratoriet. Det betyder, at der er et kæmpestort uudnyttet potentiale, og rigtige mange forskere brugere meget tid på at prøve at forstå, hvorfor disse stoffer ikke bliver produceret - og ikke mindst hvordan vi kan løse gåden og få bakterierne i gang med at producere stofferne. Nogle forskere mener, at vi igennem tiden faktisk kun har opdaget 0,1-10% af de stoffer, som bakterier rent faktisk producerer. Det er netop grunden til at Tiny Earth er så spændende – det er netop dette skattekammer, vi jagter!

Der er en meget interessant sammenhæng mellem et antibiotikas kemiske struktur, og måden det bliver dannet på i bakterier. Modsat mange proteiner, som oversættes/translateres fra mRNA til det færdige produkt, så er antibiotika ikke direkte kodet i bakteriens DNA. Antibiotika produceres nemlig ved en kompleks biosyntese, hvilket er en kædereaktion forårsaget af forskellige enzymer inde i cellen. Her kan cellens enzymer f.eks. være involveret i at samle og modificere aminosyrer, sukre og fedtsyrer til de stoffer, vi kender som antibiotika. Måden hvorpå disse stoffer er "bygget" hjælper os med at klassificere dem 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.



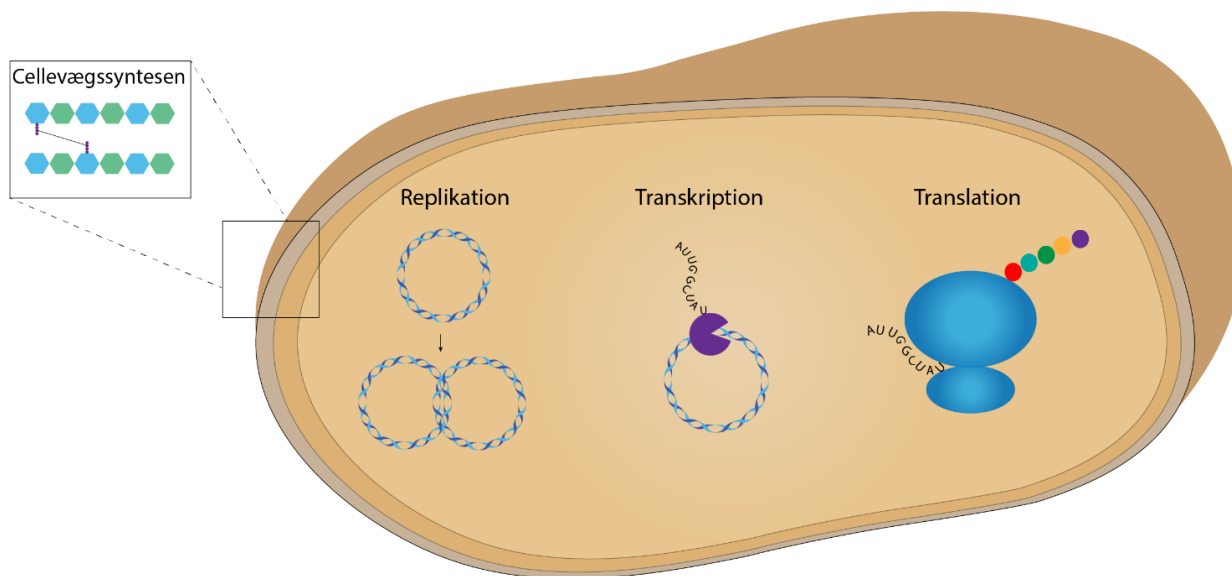
Figur 7-3. Penicillin biosyntese. Penicillin er produktet af tre aminosyrer, som modificeres og samles i en enzym-katalyseret reaktion. Foto: commons.wikipedia.org

Hvorfor antibiotika dræber bakterier (og ikke os)

Antibiotika bliver opdelt i grupper alt efter, hvordan de – på et cellulært niveau - hæmmer eller dræber andre mikroorganismer. Det kaldes stoffets virkemåde. Dét, at antibiotika virker selektivt mod bakterier, betyder, at de enten meget selektivt kun trænger ind i bakterieceller, eller at de simpelthen ikke genkender eukaryote celler og derfor ikke påvirker dem.

Cellevæggen er et unikt komponent, som kun findes i bakterier. Cellevæggen består af peptidoglycan, som er et makromolekyle, der er opbygget af aminosyrer og komplekse sukre. Denne cellevæg beskytter bakterier mod belastninger fra det omgivende miljø, mens den også er med til at opretholde bakteriens karakteristiske form. Gram-positive bakterier har et tykt peptidoglycan-lag, hvorimod Gram-negative bakterier i stedet har et tyndt peptidoglycan-lag, der befinder sig mellem den indre cytoplasmiske membran og en ydre membran bestående af bl.a. fosforlipider og lipopolysaccharider.

Noget antibiotika som f.eks. penicillin og vancomycin inhiberer dannelsen af cellevæggen ved at blokere for de enzymer, der er ansvarlige for at samle peptidoglycan-enheder til en færdig cellevæg. For at en bakterie kan vokse, kræver det konstant vedligeholdelse af cellevæggen, så når et antibiotikum sætter en stopper for denne vedligeholdelse, så kan cellen ikke overleve.



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

Vi finder også nogle unikke komponenter i bakteriens DNA-metabolisme. Enzymet DNA-gyrase findes i både prokaryoter og eukaryoter, og den eukaryotiske variant har mange strukturelle ligheder med den prokaryotiske variant. Noget antibiotika som f.eks. ciprofloxacin udnytter alligevel en *lille* forskel, som gør det muligt kun at inhibere i den prokaryotiske variant. DNA-gyrasen spiller en rolle i DNA-replikationen, hvor den hjælper til med at holde DNA-molekylet i skak, så det er muligt for resten af maskineriet at bevæge sig ned over DNA-strengen. På samme vis inhiberer rifampicin RNA-polymerasen, som er nøglespilleren i transkription af DNA-koden. RNA-polymerasen i hhv. prokaryoter og eukaryoter er lige nøjagtigt så forskellige, at rifampicin kun inhiberer bakteriers transkription.

Translation (protein syntesen) er endnu en cellulær proces, der ofte er offer for et antibiotikums inhiberende virkning. Både eukaryoter og prokaryoter er dybt afhængige af at kunne syntetisere proteiner baseret på en RNA template, og generelt ligner mekanismen meget hinanden. Dog er der nogle forskelle i ribosomet, som medfører, at noget antibiotika kun hæmmer bakteriers proteinsyntese. Nogle typer antibiotika *kan* binde til eukaryote ribosomer, men typisk binder de meget svagt sammenlignet med deres binding til prokaryote ribosomer. Antibiotika som hæmmer proteinsyntesen binder ofte til én ud af tre dele af ribosomets aktive site; E-site, P-site eller A-site. Makrolider, som f.eks. erythromycini, og aminoglycosider er eksempler på antibiotika, der hæmmer proteinsyntesen ved hhv. at forhindre ribosomal translokation og ved at ændre formen på ribosomet, hvilket forhindrer codon-anticodon hydrogenbindinger.

Antibiotikaresistens

Antibiotika er effektivt, fordi de udnytter de cellulære og molekylære forskelle mellem bakterier og eukaryote celler og hæmmer livsnødvendige processer i bakterier. Mange bakterier har udviklet mekanismer til at modstå effekten af antibiotika. Der er generelt to måder, hvorpå bakterier kan udvikle resistens:

- 1) Bakterier kan udvikle resistens gennem random mutationer i normale gener
- 2) Bakterier kan udvikle resistens ved at modtage et resistensgen fra en anden bakterie ofte via konjugation

Resistensudviklingen er en af nutidens største trusler mod vores sundhed, og selvom vi ikke fuldt ud kan undgå udviklingen af resistens, kan vi sagtens arbejde hårdere for at regulere brugen af antibiotika, mens vi forsat leder efter nye stoffer (mere om antibiotikaresistens i kapitel 10).

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

Biologiske spørgsmål:

- 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 det første skal man selvfølgelig sikre sig, at stoffet ikke er giftigt overfor mennesker. Derudover skal stoffet helst kunne bibeholde dets aktivitet, hvis det anvendes peroralt (f.eks. i pilleform), da det er den mest simple administrationsvej sammenlignet med f.eks. intravenøs behandling. 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. Vi lærte allerede fra Alexander Flemings arbejde, at dette kan være en vanskelig proces. Det 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. En af de måder, man kan gøre dette på, er ved at søge lidt dybere indsigt i den bakterie, der producerer stoffet - lære den lidt bedre at kende så at sige. *Acremonium chrysogenum* er f.eks. kendt for at producere stoffet cephalosporin C (et β -lactam-antibiotika). I tilfælde af, at man isolerer en bakterie, der er nært beslægtet med *Acremonium*, vil det være oplagt at undersøge, om de aktive stoffer deler nogle af de samme egenskaber som cephalosporiner. På samme måde vil man kunne prioritere først at undersøge de antibiotikaproducerende bakterier fra ens jordprøve, der tilhører en slægt eller en art, der ikke umiddelbart forbindes med produktionen af kendt antibiotika. Så er sandsynligheden nemlig større for at finde et nyt stof.

Klassificering af mikrober

Begrebet taksonomi bruges indenfor biologien til at navngive og inddele levende organismer i grupper baseret på delte karaktertræk. Grupper med delte fysiske egenskaber vil ofte (men ikke altid) også dele en evolutionær historie. Disse grupper er opbygget hierarkisk og inkluderer ofte syv taksonomiske niveauer; Domæne, rige, klasse, orden, familie, slægt og art. Historisk set har forskere altid klassificeret mikroorganismer på baggrund af deres fænotype f.eks. morfologiske karakteristika samt ved brug af biokemiske tests, der f.eks. kan røbe tilstedeværelsen af bestemte enzymer. I slutningen af det 20. århundrede fik vi dog adgang til en helt ny værktøjskasse, da vi pludselig fik adgang til teknologier, der tilladte sammenligning af DNA sekvenser mellem organismer dvs. sammenligning af organismers genotype. Da DNA er det genetiske arvemateriale, kan det indenfor fylogenen bruges som en model for evolutionære hændelser ved at studere DNA sekvensvariation og nedarvning gennem generationer. Det er netop også mutationer (arvelige ændringer i DNA-sekvensen), der danner grundlag for Darwins definition af evolutionen.

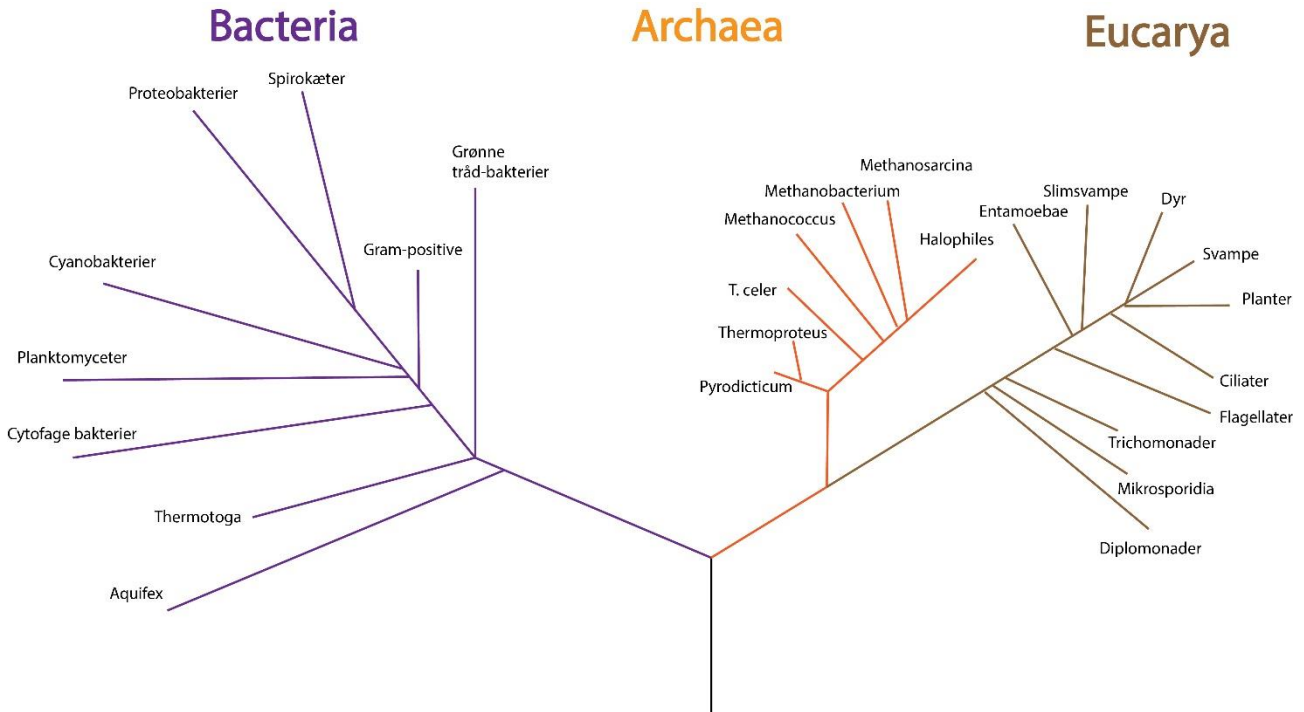
Selvom det i dag er muligt at sammenligne hele genomer er sådan en sammenligning omfattende, da bakteriers genomer kan være op til flere millioner basepar. Derfor vælger forskere ofte at sammenligne bestemte "markør gener", som findes i alle mikroorganismer og som er rimelig konserverede. At et gen er 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. Det er derfor vigtigt at huske på, at den bedste taksonomiske identifikation involverer mange forskellige teknikker og analyser. Vi diskuterer i dette kapitel morfologisk og molekylær taksonomisk klassificering, hvorimod biokemisk klassificering beskrives i detaljer i kapitel 11.

Molekylær fylogeni

16S rRNA genet blev først beskrevet som et værktøj til at sammenligne bakterier i 1977 af Carl Woese og George Fox. På daværende tidspunkt havde man udelukkende klassificeret mikrober på baggrund af deres morfologiske egenskaber, hvilket faktisk er en svær opgave, da bakterier har langt færre anatomiske egenskaber sammenlignet med deres biokemiske egenskaber. Woese var også specielt interesseret i bakteriers slægtskab, og da han var frustreret over manglende værktøjer til dette formål, forsøgte han sammen med Fox at finde en helt ny måde at anskue problemstillingen på. Ideen med at bruge DNA sekvenser var revolutionerende. Én ting, som gør DNA særligt værdifuldt som sammenligningsgrundlag, er det faktum, at DNA er alle levende organismers arvemateriale. Derudover deler alle levende organismer homologe versioner af SSU generne, som rent evolutionært ændrer sig meget meget lidt, hvilket gør det til god og stabil platform til at studere evolution. For første gang nogensinde havde forskere nu en enkelt markør, som de kunne bruge til at sammenligne slægtskabet mellem alle levende væsner. Dette forårsagede drastiske ændringer i det vi kalder for "Livets træ". Ved sammenligning af 16S rRNA gen sekvenser og 18S rRNA gen sekvenser stod det pludselig klart, at *alt* liv er organiseret i tre domæner; Archaea, Bacteria og Eucarya. Den videnskabelige verden blev slået bagover, da det pludselig stod klart, at arkæer – som rent morfologisk ligner bakterier – er ligeså forskellige fra bakterier, som eukaryoter er. Det er desuden tankevækkende, at alle bakterier og arkæer samt de fleste eukaryoter (med undtagelse af planter, dyr og svampe) er mikroskopiske størrelser. Vi lever virkelig på en mikrobiel planet!

Fylogenetiske træer er forgreningsdiagrammer, der ofte er baseret alene på genotypisk data, og som netop skildrer evolutionære hændelser mellem organismer. Vi kalder dette for molekylær fylogeni. Forgreningspunkter i et fylogenetisk træ skildrer fælles stamformer, og grenlængden beskriver slægtskabsforholdet mellem organismer - altså hvor tæt beslægtet organismer er ved nedarvning. Mange af de organismer, der histo-

risk set er blevet klassificeret på baggrund af fænotypisk data, er i dag blevet reklassificeret på baggrund af genotypisk data, så der er bedre sammenhæng mellem taksonomi og fylogeni.



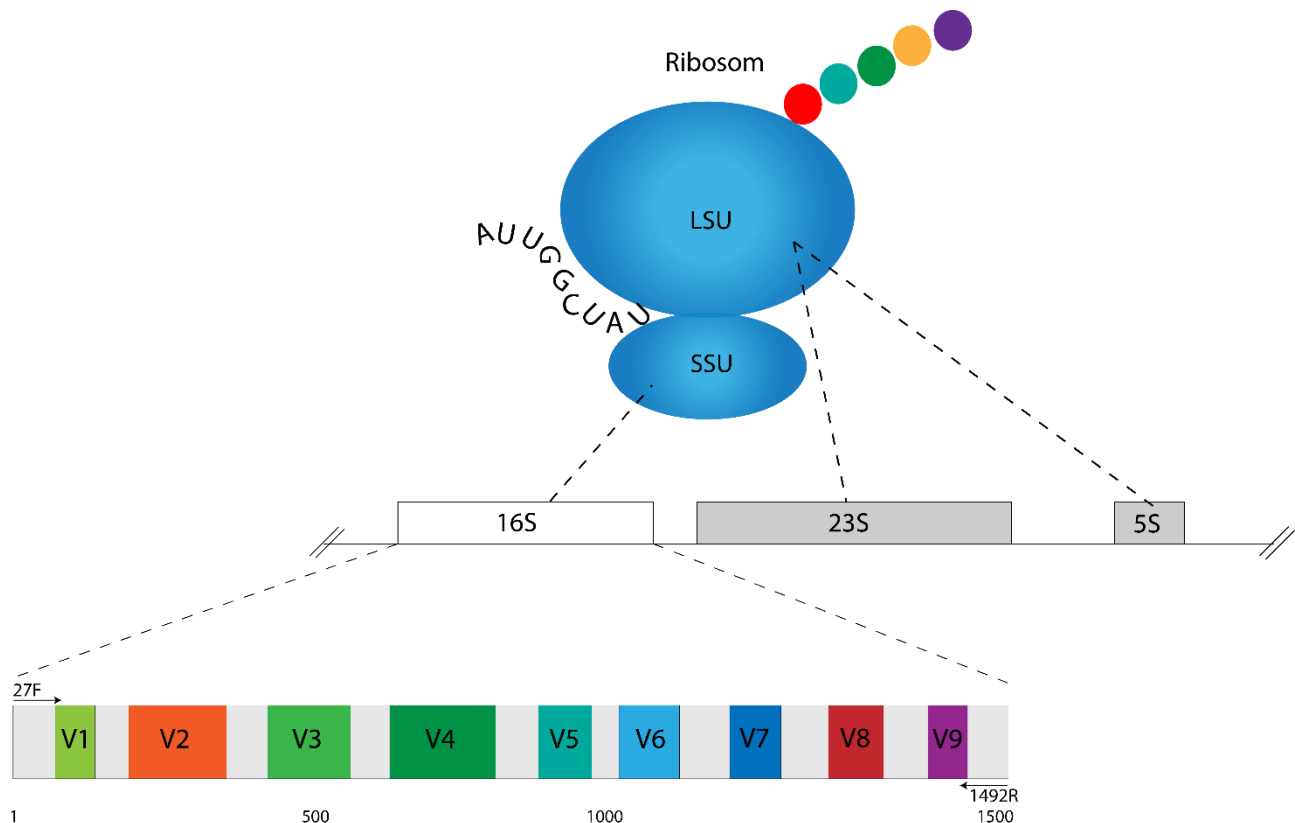
Figur 8-1. Livets Træ.

Der findes andre markørgener end 16S rRNA genet, men det er typisk dét gen, man bruger, når man skal identificere et ukendt isolat. 16S rRNA genet består af ni variable områder og otte konserverede områder. De konserverede områder af genet er meget ens i alle bakterier (hvilket gør det muligt at designe universielle primere til genet), hvorimod de ni variable områder er artsspecifikke og kan betragtes som bakteriens signatur. Dette gør 16S rRNA genet til en rigtig god fylogenetisk markør.

Hvor SSU sekvenser tidligere blev anvendt til at forstå, hvor tæt beslægtet forskellige organismer er, bliver 16S rRNA gen analyse i dag især anvendt til at identificere ukendte isolater. Det kan lade sig gøre, fordi vi har databaser som f.eks. Genbank, der giver os adgang til en samling af flere millioner kendte 16S rRNA gen sekvenser. Dette udnytter vi, når vi skal prøve at identificere ukendte isolater på baggrund af deres 16S rRNA gen sekvens. Efter sekventering af et ukendt isolat kan vi uploade sekvensen på GenBanks hjemmeside, og ved hjælp af algoritmer som BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) kan vi få en hurtig sammenligning mellem vores sekvens og databasen. Et match med databasen kan derfor hjælpe os med at identificere vores bakterie.

16S rRNA gen sekvens data

DNA-sekvensteknologier har udviklet sig meget de sidste årtier; der er i dag flere forskellige måder at anskaffe sig en DNA sekvens af enten et gen eller et helt genom. Fælles for alle metoderne er, at det er nødvendigt at få dannet rigtig mange kopier af den DNA-sekvens, man gerne vil undersøge (vi kalder den template DNA – som en skabelon). Polymerase kæde reaktion (kaldet PCR efter det engelske navn Polymerase Chain Reaction) er den teknik, der oftest benyttes, når man skal amplificere (kopiere) en template DNA-sekvens. Vi kan designe PCR primere, der er komplementære til konserverede steder på 16S rRNA genet. Husk på, at det konserverede områder af genet ofte er ens i alle bakterier, og derfor kan vi bruge de samme primere til at amplificere en bred vifte af forskellige organismer. Kopierne vil også indeholde 16S rRNA genets variable områder, som er artsspecifikke, og det er disse signaturområder, som gør det muligt for os at bestemme, hvad det er for en bakterie, vi har isoleret.



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.

Morfologisk karakterisering af isolater

Som tidligere nævnt er 16S rRNA sekvens data særligt brugbart til indledningsvist at tildele en ukendt organisme en taksonomisk klassificering. Men man kan styrke identifikationen ved at bruge flere metoder. Herunder præsenterer vi mikroskopi, som en metode til at identificere væsentlige morfologiske egenskaber. Biokemiske (metabolske) tests kan også hjælpe med at identificere en organisme, men disse vil blive diskuteret i kapitel 11.

Mikrober i mikroskopet

Det 17. århundredes pionererne indenfor mikroskopi var også pionerer indenfor biologien. Deres udvikling af kraftige linser gjorde det muligt for dem at få et nærgående syn på den mikroskopiske verden.

Robert Hooke var en engelsk videnskabsmand og arkitekt. Han var manden bag den videnskabelige bestseller "*Micrographia*" fra 1665, der skildrer Hookes observationer fra mikroskopet i form af detaljerede tegninger af en flues øje samt planteceller i et stykke kork. Hooke introducerede begrebet "celle", da korkcellernes vægge mindede ham om rummene (engelsk: cells) i et kloster.

Hooke inspirerede hollænderen Antonie van Leeuwenhoek, som ofte omtales som "mikrobiologiens fader". Leeuwenhoek blev kendt for sit skarpe syn og sine færdigheder i forbindelse med fremstilling af linser. Efter at have læst "*Micrographia*" kombinerede han sine egne færdigheder med sin nye viden fra Hookes værk til at fremstille et enkeltlinse-mikroskop, som muligvis har haft en meget kraftig forstørrelse mellem 200x og 500x. Han var meget hemmelighedsfuld omkring sine teknikker, og færre end 10 af hans mikroskoper findes stadig i dag. Leeuwenhoek var så avanceret en opfinder, at det tog videnskabsmænd mere end 150 år at udvikle mikroskoper, der var lige så kraftige som hans. Han var den første til at observere og dokumentere encellede organismer som bakterier og protozoer – han kaldte dem "wee animalcules". Han observerede plak fra sine egne tænder og konstaterede, at det indeholdte hundredevis af bakterier med forskellige former. Leeuwenhoek sendte hyppigt breve til Royal Society i London med detaljerede beskrivelser af sine fund – nogle så detaljeret, at vi i dag ved, hvilke arter hans observerede i sit mikroskop.

Mikroskopi har udviklet sig meget siden de første visualiseringer af mikroskopisk liv. Dog er vi stadig den dag i dag begrænset til kun at kunne skelne mellem objekter, der er større end 0,2 μm ved brug af et lysmikroskop. Mere avancerede teknikker som elektronmikroskopi kan skelne mellem mindre objekter som f.eks. virus eller cellulære komponenter. Denne teknik kan producere billeder med en ufattelig detaljegråd af objekter helt ned til 0,005 μm .

Farvning af bakteriers cellevæg

Ved at farve bakterier forbedrer det vores evne til at se forskellige formerne på celler. Bakterier kan have mange forskellige former, men den mest udbredte form er kugleformet - også kaldet cocci (flertal) eller coccus (ental) - og stavformet - også kaldet bacilli (flertal) eller bacillus (ental). Farven binder til komponenter i cellen, som ellers ville være transparente under mikroskopets lys. Bakteriers cellevægge er opbygget af et net af kulhydrater, lipider og proteiner. Den strukturelle komponent er en kryds-linket polymer af sukre og aminosyrer kaldet peptidoglycan. Peptidoglycanlaget beskytter bakterien og giver dem deres karakteristiske form. En af de mest klassiske farvningsteknikker kaldes Gram-farvning. Gram-farvning blev udviklet i slutningen af 1800-tallet som en hjælp til at visualisere bakterier i biopsier, og det er siden blevet et værdifuldt værktøj til at differentiere mellem de to dominerende cellevægsopbygninger.

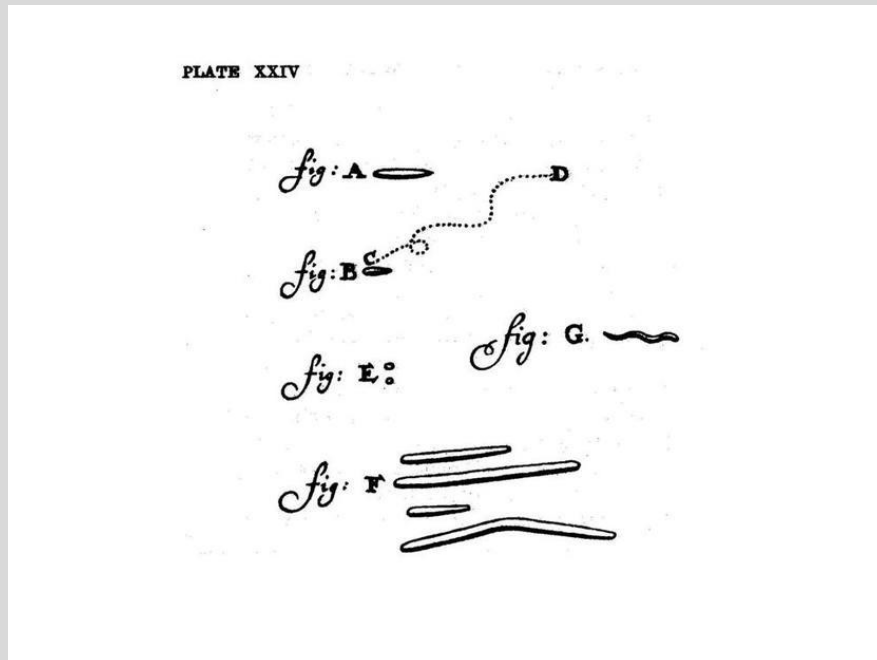
Ved Gramfarvning benytter man to typer farvestof, krystalviolet farve og safranin, som hhv. er violet og pink. I Gram-positive bakterier er peptidoglycanlaget meget tykt (>20 nanometer) og udgør det yderste cellevægskomponent. Gram-positive celler kan holde på rigtig meget krystalviolet farve i dette lag. Når den krystalviolette farve danner et kompleks med jod, er cellerne bedre til at modstå udvaskning af farven end Gram-negative bakterier. Dette medfører, at Gram-positive celler forbliver violette selv efter farvning med safranin. Gram-negative bakterier har derimod et tyndere peptidoglycanlag (10 nanometer) og har derudover også en ekstra ydre membran. På grund af det tynde peptidoglycanlag er den krystalviolette farve mere tilbøjelig til at blive vasket helt væk i Gram-negative celler. Disse celler vil derefter blive farvet pink, når safranin anvendes som den anden farve.

Mikrobiologer kan udvinde meget information om isolaters fysiologi ved at kunne differentiere mellem Gram-positive celler og Gram-negative celler under et mikroskop. Derudover medfører Gram-farvning en hurtig og bred gruppering, som kan hjælpe med at klassificere en bakterie. Gram-positive og Gram-negative bakterier udgør de to største grupper af bakterier.

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.

Milepæle inden for mikrobiologi



Leeuwenhoek's første skildring af "wee animalcules", som han observerede i mikroskopet. Dette betragtes som den første illustration af en bakterie.

Foto: University of California Museum of Paleontology



Maleri af Antonie van Leeuwenhoek af Jan Verkolje.

Foto: https://en.wikipedia.org/wiki/Antonie_van_Leeuwenhoek

Øvelse 8: Indledende identificering af antibiotikaproducerende bakterier

Biologiske spørgsmål:

- 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 molekylære 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 i en kultur, producerer den enormt mange forskellige metabolitter. Det første skridt, når man skal undersøge et potentielt nyt antibiotikum, er at få adskilt det aktive stof fra alle de andre "kontaminanter" i kulturen. Oprensningsprocessen indebærer ofte en lang række forskellige separationssteps, hvor det ønskede stof separeres fra andre stoffer baseret på stoffets fysiske eller kemiske egenskaber. Mange metoder separerer forskellige stoffer ved at udnytte stoffers polaritet og interaktion med forskellige solventer. Kontaminanter, der kemisk minder meget om det aktive stof, er typisk de sværeste at fjerne. Et eksempel er enantiomerer, hvilket er betegnelsen for to molekyler, der har den samme kemiske formel og det samme bindingsmønster, men som har forskellig stereo-kemi. De er spejlbilleder af hinanden. Kun ét molekyle er aktivt, men det deler størstedelen af sine kemiske egenskaber med sit "inaktive" spejlbillede, hvilket besværliggør oprensningen.

Hvad er organiske molekyler

Organisk kemi startede som en betegnelse for "livets kemi". Det var dengang man troede, at dette var forskelligt fra kemien i et laboratorium. Siden er organisk kemi blevet betegnelsen for den gren indenfor kemien, der beskæftiger sig med molekyler, der indeholder kulstof. Organiske forbindelser finder vi i alt fra føde og medicin til brændstof og plast. Derfor spiller organisk kemi en meget vigtig rolle i vores daglige liv.

De organiske molekyler, vi møder på vores vej, stammer enten fra levende ting, fra dannelsen af råolie for millioner af år siden eller fra laboratorier, hvor syntesekemikere kan fremstille organiske molekyler ud fra simple byggesten. I gamle dage forbandt man organiske molekyler fra naturen med æteriske olier, som kunne udvindes af planter ved destillation eller syreekstraktion. Eksempler på disse er mentol – et smagsstof fra mynte; *cis*-jasmone – en duft fra jasmin blomsten; og kinin – et af de aktive stoffer (mod malaria) som udvindes af barken fra cinchona træer. De fleste organiske stoffer er farveløse, men nogle er farvede og kaldes pigmenter. Indigo er et pigment, som særligt bruges til at farve cowboybukser blå, og karoten er pigmentet, der giver gulerødder deres karakteristiske farve.

Organiske molekyler findes i mange former; krystaller, olier, voks, væsker eller gas. Kendte eksempler er f.eks. sukkerkrystaller, men også petroleum, der er en blanding af farveløse, flygtige og brændbare organiske forbindelser heriblandt benzin.

Hvad er sekundære metabolitter

De makromolekyler, som er fælles for alle levende væsner (nukleinsyrer, proteiner, lipider, og kulhydrater), er produkter af livsnødvendige processer kaldet den primære metabolisme. Derudover har mange celler evnerne til at udføre mere specialiserede kemiske processer. Disse processer – og stofferne der produceres – er ikke livsnødvendige for cellen, men de menes at kunne give cellen en fordel i dens miljø f.eks. en kompetitiv fordel eller mulighed for kommunikation med andre celler. Disse stoffer kaldes sekundære metabolitter, og vi har allerede stiftet bekendtskab med et par stykker i forbindelse med vores nye viden om antibiotika. Størstedelen af den antibiotika, vi kender i dag, produceres nemlig som sekundære metabolitter i slutningen af en kulturs eksponentielle vækstfase.

Sekundære metabolitter kan variere meget i deres størrelse og kompleksitet. De kan rangere fra meget små molekyler som f.eks. penicillin G til meget store polyetherforbindelser som brevetoxin, som produceres af alger i det, der betegnes for "rødt tidevand", og som er giftigt både for fisk og de efterfølgende led i fødekæden.



Milepæle inden for mikrobiologi

Dorothy Crowfoot Hodgkin var en britisk kemiker, som arbejdede med teknikken røntgenkrystallografi – en teknik til at bestemme 3D strukturen af et biomolekyle. Hun løste strukturen af penicillin og viste, at penicillin indeholder en β -lactamring. Hodgkin løste også strukturen af vitamin B₁₂, hvilket gav hende Nobelprisen i kemi i 1964. Det britiske Royal Society fejrede deres 350-års jubilæum ved at lancere en række frimærker med minder gennem tiden – et af dem var med et billede af Hodgkin og hendes vitamin B₁₂.

Foto: http://www.paleophilatelie.eu/description/stamps/uk_2010.html

Hvordan isolerer eller ekstraherer vi sekundære metabolitter?

Vi har behov for en række separationsteknikker for at kunne isolere det antimikrobielle stof. Disse separationsteknikker baseres ofte på fysiske eller kemiske egenskaber ved stoffet som f.eks. størrelse, polaritet, opløselighed eller affinitet. Der findes rigtig mange mulige separationsteknikker – nogle er forholdsvis billige og simple og kan anvendes i stor skala, mens andre kræver dyre instrumenter og er meget tidskrævende. Hvert enkelt step i processen påvirker ofte valget af det næste step, fordi vi lærer mere og mere om stoffets egenskaber. Som udgangspunkt er det ofte en god ide at starte med en gængs metode, der før har vist sig at være god til isolering af sekundære metabolitter og frasortering af mediekomponenter og primære metabolitter.

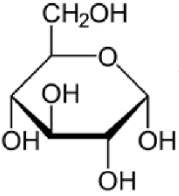

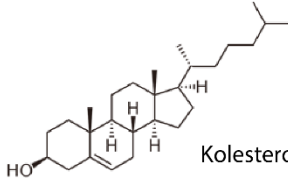
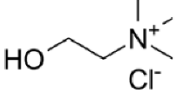
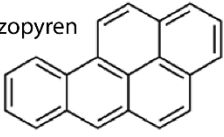
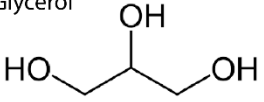

Ekstraktion med organiske solventer

Vi er omgivet af eksempler på kemisk separation af stoffer. I en salatdressing vil olie og eddike f.eks. ikke blandes. De vil i stedet danne to lag med forskellig densitet og forskellige kemiske egenskaber. Disse to væsker føles også meget forskellig på vores hud. Olie vil sættes sig fast på huden, hvorimod eddike let vil kunne vaskes af. Dette sammenspil er et resultat af en kemisk egenskab kendt som polaritet.

Polaritet definerer fordelingen af elektrondensitet og ladning i et molekyle. Det kommer sig af, at nogle atomer i en binding har en tendens til at holde bedre fast på deres delte elektroner end andre pga. elektronegativitet. Disse forskelle medfører, at nogle molekyler får "poler" med delvist modsatte ladninger; vi kalder molekylerne polære molekyler. Vand er et godt eksempel på et polært molekyle. Hvert vandmolekyle har en delvist negativ ladning på oxygenatomer og delvise positive ladninger på hydrogenatomerne. Atomer i molekyler, der på samme vis fremviser denne fordeling af elektrondensitet (som f.eks. andre vandmolekyler eller vandopløselige molekyler), vil blive tiltrukket af andre atomer med modsat ladning i andre polære molekyler. Disse bindinger er svage sammenlignet med kovalente bindinger, men de er stærke nok til at tiltrække polære molekyler i en prøve og gøre dem opløselige.

Mindre polære stoffer som f.eks. ethylacetat ($\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$ eller EtOAc) vil adskille sig fra vand pga. forskelle i polaritet. Selvom EtOAc i sin struktur har en "pol" med en carbonylgruppe (C=O), er den ikke stærk nok til at associere med vand pga. methyl (CH_3) og ethyl (CH_3CH_2) grupperne. Triglycerider som f.eks. vegetabiliske olier deler også denne egenskab. Andre molekyler som f.eks. detergenter har amfipatiske egenskaber og består dermed af en hydrofil og en hydrofob del. Det gør det nemt for dem at blande sig med begge typer molekyler, hvilket gør det muligt f.eks. at fjerne fedt fra opvasken med vand.

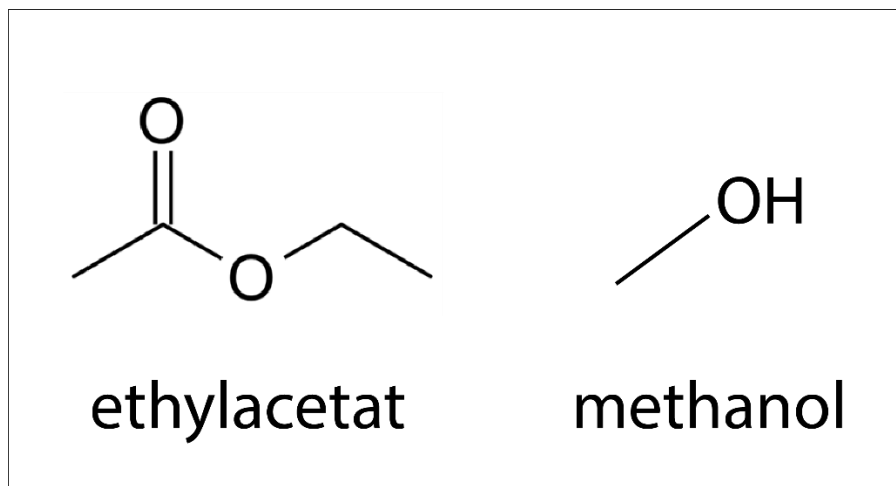
Stoffer produceret af bakterier dækker hele polaritetsskalaen – nogle vil være amfipatiske, mens andre vil være hydrofile eller hydrofobe. Det fleste primære metabolitter som sukre,

Opløselighed	
Kan opløses i vand	Kan ikke opløses i vand
<p>Bordsalt</p> <p>$\text{Na}^+ \text{Cl}^-$</p> <p>Glukose</p> 	 <p>Hexan</p>  <p>Kolesterol</p>
 <p>Choline (neurotransmitter)</p>	<p>Benzopyren</p> 
<p>Glycerol</p> 	 <p>Triethylamin</p>

Figur 9-1. Oversigt over stoffers opløselighed

aminosyrer og peptider har hydrofile egenskaber, fordi celler er fyldt med vand. Vand er "universal-solventet" i celler, som holder metabolitter og ioniske forbindelser i opløsning, så de kan bruges af cellen. Det første step i oprensningen af aktive stoffer vil derfor være at fjerne de fleste af cellens komponenter og se, om aktiviteten er bibeholdt. Mange små molekyler, deriblandt antibiotika, vil have både hydrofile og hydrofobe områder. Hvis vi kan ekstrahere de ønskede molekyler i et mindre polært solvent som f.eks. EtOAc, vil det blive separeret både fra andre molekyler fra cellen samt de vandopløselige næringstoffer fra mediet. Andre solventer som methanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$ eller MeOH) ekstraherer et større spektrum af stoffer pga. evnen til at gøre både polære og upolære stoffer opløselige - deriblandt også vandopløselige stoffer, som komplicerer isoleringen af det aktive stof.

EtOAc og MeOH er bare to ud af en lang række organiske solventer, der bruges til kemisk ekstraktion. Fordi forskellige solventer opløser forskellige typer stoffer, kan opløseligheden røbe noget om stoffets egenskaber, og derfor er det et godt udgangspunkt for en oprenningsstrategi.



Figur 9-2. Venstre: Molekylestruktur af ethylacetat. Dette organiske stof er upolært og bliver ofte anvendt til ekstraktion af andre upolære organiske stoffer. Højre: Molekylestruktur af methanol. Dette stof indeholder en polær hydroxygruppe (-OH), som giver molekylet hydrofile egenskaber. Methylgruppen (-CH₃) er derimod en anelse hydrofob, hvilket gør det muligt for molekylet at opløse både polære og upolære stoffer i varierende grad.

Fra isolat til molekyle

Det vil helt sikkert tage længere end et skoleforløb at oprense rent antibiotika. Men derfor er det stadig værd at tage et hurtigt kig på den proces, der hjælper os med at identificere et stof.

Organiske ekstrakter fra cellekulturer er typisk en kompleks blanding af forskellige stoffer. Denne blanding skal reduceres til kun at indeholde ét enkelt stof – nemlig det aktive stof. Et rent stof er nødvendigt for at vi kan løse strukturen af stoffet. Det kræver tre ting, før vi kan isolere det biologisk aktive molekyle via bioassay-guided isolering. Det kræver et biologisk aktivitetsassay, oprensningsteknikker samt metoder til at bestemme den kemiske struktur af stoffet.

Et biologisk assay bruges til at holde øje med, hvor i processen det biologiske stof befinder sig. Når det rene stof er isoleret, kan vi løse den kemiske struktur ved at benytte teknikker, som kan identificere molekylet baseret på unikke karaktertræk.

En bioassay-guided isolering af et stof tager typisk lang tid, og det fører ofte til isolering af allerede kendte stoffer. Så før et ekstrakt føres igennem hele den proces, benytter man sig af en procedurer, der kaldes dereplikering. Denne proces har til formål *tidligt* at skelne mellem kendte stoffer og ukendte stoffer. Det gør forskeren i stand til at prioritere mellem ekstrakter og fokusere mere på de ukendte stoffer. I dereplikationsprocessen anvendes ofte væskechromatografi/massespektrometri (LC-MS) sammen med statistiske analyser og biologiske assays, der kan give information om stoffets virkemåde. Hvis stoffet i et ekstrakt virker ukendt og det derfor besluttes at arbejde videre med ekstraktet, vil man benytte bioassay-guided isolering.

1. Biologisk assay

Et biologisk assay udføres før oprensningens start samt efter hvert oprensningstrin, så aktiviteten kan følges hele oprensningen igennem.

2. Oprensningsteknikker

Der anvendes ofte teknikker til oprensning af ekstrakter, som falder under kategorien væskechromatografi (LC - fra det engelske liquid chromatography). Automatiserede og brugervenlige LC-systemer findes i stort set alle kemiske forskningslaboratorier. Disse systemer gør det hurtigt og forholdsvis billigt at oprense stoffer fra et komplekst ekstrakt. HPLC-systemer (High Performance-LC) kan med fordel anvendes i tilfælde, hvor oprensning af et stof er mere kompliceret.

3. Teknikker til strukturbestemmelse

Det næste step i processen er at løse strukturen af det stof, der forårsager den biologiske aktivitet. Røntgenkrystallografi giver os groft sagt et billede af den tredimensionelle opbygning af et molekyle, og teknikken kan bruges til at løse strukturen af krystaller. Dog skal der ofte benyttes andre teknikker til at løse strukturen af naturstoffer, heriblandt antibiotika, da naturstoffer ofte produceres i lav koncentration og ikke danner krystaller. Ofte forsøger man som det første at finde molekyleformlen. Til dette formål kan man benytte massespektrometri (MS), som meget nøjagtigt kan fortælle massen af stoffet. Den mest anvendte teknik til at løse strukturen er NMR-spektroskopi (nuclear magnetic resonance). Kulstofatomer og hydrogenatomer i et molekyle kan detekteres ved denne metode. Kulstof og hydrogen opfører sig forskelligt i det stærke magnetfelt i en NMR alt efter, hvor de sidder henne i et molekyle. Disse forskelle kan så sammenlignes med kulstofatomer og hydrogenatomer i kendte molekyler - og så starter ellers det store puslespil med at samle alle atomerne til en struktur.

Hvis stoffet er kendt fra litteraturen, kan strukturen forholdsvis hurtigt løses på denne måde. Det vil måske tage dage eller uger. Hvis stoffet er nyt og strukturen har ligheder med molekyler, vi allerede kender fra litteraturen, kan processen tage uger eller måneder afhængigt af stoffets kompleksitet. I mere komplicerede tilfælde kan tage flere måneder, før man har en struktur f.eks. hvis stoffets opbygning er helt unik og aldrig før set. Når nye antimikrobielle stoffer isoleres, er det særligt interessant at kigge på stoffernes virkemåde. Hvis man isolerer et helt nyt stof, som

tilmed har en helt ny virkemåde, kan dette have enorm indflydelse for opdagelsen af antibiotika og for fremtidig behandling af infektionssygdomme.

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

Biologiske spørgsmål:

- 1) Kan vi isolere antibiotika fra et isolat? Hvordan?
- 2) Hvad kan valget af organisk solvent sige om et antibiotikums kemiske egenskaber?
- 3) Hvordan kan vi vurdere, om det aktive stof er tilstede i ekstraktet?
- 4) Hvad skal vi ellers vide om den biologiske aktivitet, vi observerer?
- 5) Hvordan vil du fortsætte dine undersøgelser af dit ekstrakt?

Kapitel 10: Resistens mod antibiotika

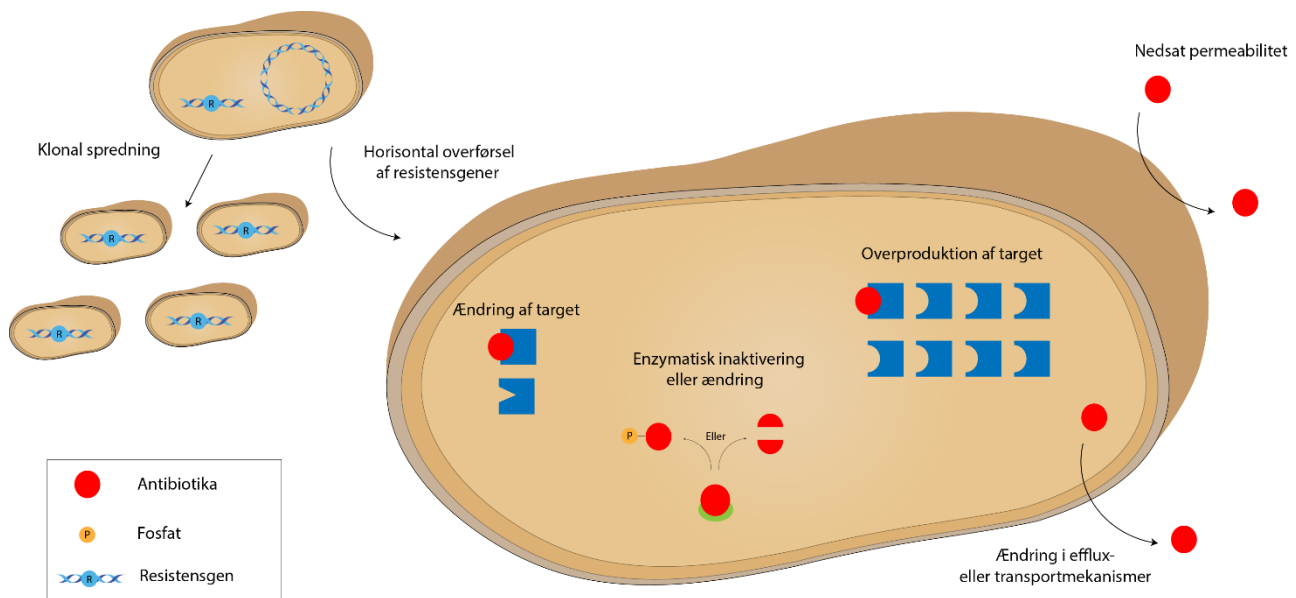
Antibiotikaresistens

Resistensproblematikken er et resultat af udbredelsen af sundhedsskadelige organismer, som er modstandsdygtige over for den antibiotika, vi bruger til behandling af infektioner. Dette betyder, at man ikke længere kan behandle med "førstevalget", men man er derimod nødt til at bruge alternative præparater til behandling af disse infektioner. I nogle tilfælde er man nødt til at bruge antibiotika, som ellers er øremærket de mest genstridige infektioner og derfor er "vores sidste kort på hånden". Når denne slags antibiotika bliver givet til patienten har infektionen muligvis spredt sig og efterladt patienten meget syg og i potentiel livsfare. I de værste tilfælde har vi *ingen* kort på hånden – nogle infektioner er vi simpelthen ikke længere i stand til at behandle. ESKAPE patogenerne er som sådan ikke mere sundhedsskadelige end mange andre patogene organismer, men de repræsenterer størstedelen af de multiresistente bakterier, vi er udfordret af i dag – og dét gør dem særligt farlige! I dag er det ikke bakterierne men derimod bakteriernes tilegnelse af resistensgener, som gør behandlingen af infektioner udfordrende.

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. I dette tilfælde vil ribosomet altså være target for denne type antibiotika. Enhver ændring i cellen, som forhindrer antibiotika i at nå eller interagere med sit target, vil føre til resistens.

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. Vi kalder det "horisontal" genoverførsel for at adskille mekanismen fra "vertikal" genoverførsel, som forårsages, når en celle deler sig ved binær fission og dermed videregiver sine gener til to identiske datterceller. 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.



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

Mutationer, som opstår ved fejl i DNA-replikationen, kan også føre til resistens. For at dette kan ske, skal mutationen medføre en strukturændring af target, så antibiotikummet ikke længere har ligeså god bindingsaffinitet, *men* funktionen af target skal bibeholdes. Husk på at antibiotika går direkte efter strukturer eller funktioner, der er livsnødvendige for cellen. Kun nogle få mutationer kan leve op til disse kriterier.

Antibiotikaresistens i miljøet

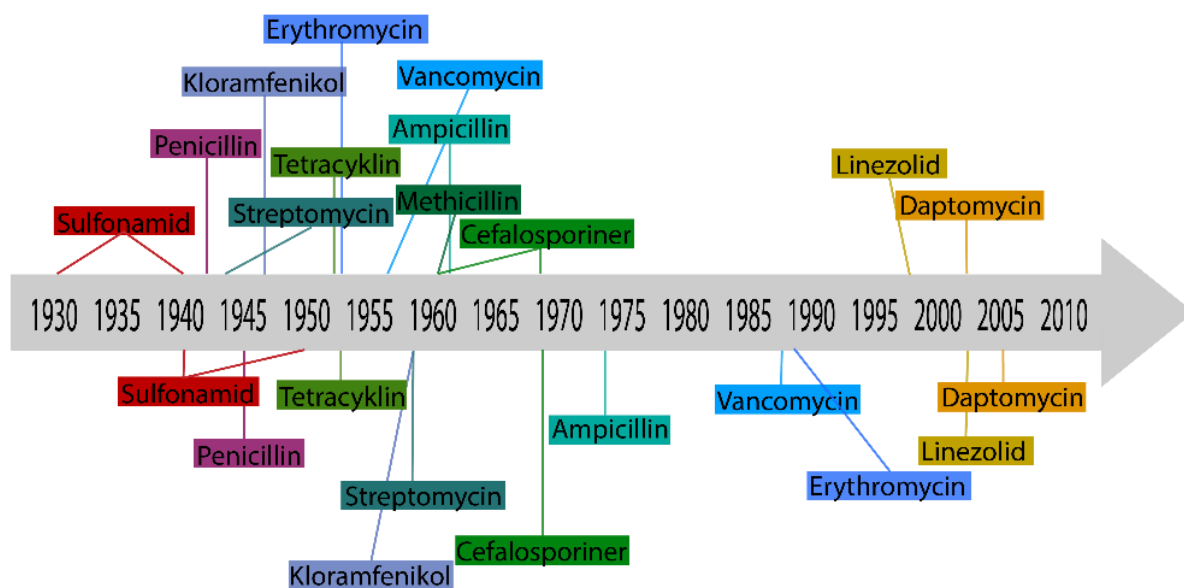
En population af resistente celler kan opstå, hvis der er et selektivt pres, det gør det favorabelt for cellerne at bibeholde den ændring i genomet, der har gjort dem resistente. Dette kan f.eks. være tilfældet med mikrober fra patienter, der behandles med antibiotika. Mikroberne beholder deres resistens, for ellers ville de dø af den antibiotika, som patienten behandles med. Antibiotika-resistente bakterier kan spredes til miljøet via f.eks. affald, og brugen af antibiotika i landbruget medfører endnu et selektionspres for resistente mikroorganismers overlevelse. I mange år har brugen af antibiotika i landbruget været meget omdiskuteret, fordi langt det meste antibiotika blev brugt til at fremme væksten af svin, kvæg og fjerkræ og ikke til behandling af sygdomme. I Europa har brugen af antibiotiske vækstfremmere været forbudt siden 2006, og i 2017 fulgte USA trop.

Historisk set er det relativt kort tid siden, vi begyndte at bruge antibiotika til behandling af infektioner. Bakterier har derimod produceret antibiotika i deres naturlige habitat i årtusinder. Vi har stadig meget at lære om antibiotika i denne kontekst og bakteriernes grunde til at producere disse stoffer i deres naturlige miljø. Måske er antibiotika den ældste form for biologisk krigsførelse? Måske udskiller bakterier antibiotika for at udrydde deres naboer i

kampen om begrænset næring? Det forholder sig normalvis sådan i naturen, at den stærkeste kandidat overlever. Man kunne dermed forestille sig, at de naboer, som evner at overleve denne antibiotika, vil dele sig og videregive deres resistensgener enten i en vertikal eller horisontal genoverførsel. Der er dog kun enkelte veldokumenterede studier, som støtter denne teori. Alternativt spekuleres der i, om resistensgener faktisk beskytter mikroberne fra toksiner produceret af planter og insekter, og om antibiotika er en form for venlig kommunikation mellem mikrober og ikke biologiske våben. Antibiotikas rolle i naturen er i store træk ukendt, men ved hjælp af forskning prøver vi hele tiden at blive klogere på netop dette emne.

Vi ved derimod med sikkerhed, at vi i en klinisk kontekst hyppigt observerer resistente mikroorganismer efter behandling med antibiotika. Overraskende nok ser vi samme tendens for stoffer, som er syntetiske og dermed produceret af kemikere i et laboratorium. Eftersom disse stoffer er syntetiske, har de ikke en evolutionær historie præget af naturlig selektion for resistens. Dette understreger virkelig, at vi skal være forsvarlige med vores brug af antibiotika. Det understreger også nødvendigheden af hele tiden at finde nye stoffer.

Introduktion på markedet



Observeret resistens

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

Er det sandsynligt, at de mikroorganismer, der producerer antibiotika, også selv er resistente? Det virker logisk at tænke, at en mikrobe vil være resistent overfor de stoffer, den selv producerer. Men hvor sandsynligt er det, at den er resistent overfor andre typer antibiotika? Og hvor udbredt er resistens i et naturligt miljø, hvor der tilsyneladende ikke er et

selektionspres? En vigtig pointe i forhold til den hurtige spredning af antibiotikaresistens er det faktum, at resistensgener har en tendens til at klynge sammen i det samme område af bakteriens kromosom. Derfor resulterer horisontal genoverførsel ofte i overførslen af resistens overfor mange typer antibiotika - selv uden selektionspres for mange af resistensgenerne.

Referencer

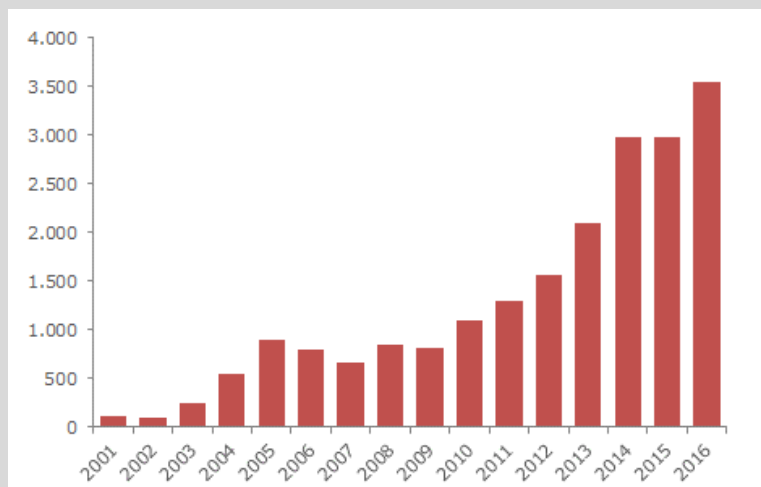
Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010) Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251-259.

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

Kampen mod antibiotikaresistens

Den hastige udbredelse af antibiotikaresistens betyder, at vi er dybt afhængige af at finde nye antibiotiske stoffer samt modificere de stoffer, vi allerede har. Dengang penicillin blev opdaget, kunne det nemt anvendes til behandling af hudinfektioner forårsaget af bakterien *Staphylococcus aureus*, men som bakterien udviklede resistens, blev man nødt til at finde andre alternativer. Methicillin er afledt af penicillin, men kan modstå de enzymer, som normalt nedbryder β -lactam-antibiotika (β -lactamaser). Alligevel blev der observeret resistens få år efter, at methicillin første gang blev anvendt til behandling. Antallet af årlige tilfælde af infektioner forårsaget af methicillin-resistent *S. aureus* (MRSA) er steget stødt over de sidste mange år. Stoffet vancomycin bliver nu ofte anvendt til behandling af multiresistente bakterier, selvom det ellers har været et af vores sidste kort på hånden og derfor har været gemt til nødstilfælde. Det syntetiske stof linezolid anvendes endda til meget svære infektioner, som ikke engang vancomycin kan slå ned.



Figur 10-3. Antal årlige tilfælde af infektioner forårsaget af methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Statens Serum Institut, 2017)

Øvelse 10: Test om et isolat er resistent overfor antibiotika

Biologiske spørgsmål:

- 1) Er dine antibiotika-producerende isolater resistente overfor kendt antibiotika?
- 2) Hvis ja, hvad fortæller det om isolatet? Hvordan kan det relatere sig til det antibiotika, den producerer?

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

Biologisk klassificering

Vi mennesker sætter os selv og verden omkring os i kontekst ved at klassificere ting baseret på delte karaktertræk som f.eks. fysisk fremtræden, funktion eller oprindelse. Ved at klassificere planter kan vi f.eks. hurtigt danne os et overblik over de planter, som er gode for os og de planter, som er giftige. Carl Linnæus er manden bag begrebet taksonomi og han pionerede klassificering af organismer baseret på delte fysiske karakteristika. Han inddelte omhyggeligt organismer i taksonomiske grupper og introducerede begrebet binominalnomenklatur, hvilket henviser til en systematisk navngivning af alle organismer med både henvisning til slægt og art. Charles Darwin var derimod fortaler for klassificering baseret på nedstamning og slægtsforhold. Hvad enten vi kigger på morfologi eller genetiske ligheder, så afspejler hvert klassifikationssystem forskellige mønstre af evolution, tilvænnning til miljø og anvendelse.

Lige gyldigt hvilket klassifikationssystem vi bruger, er det vigtigt at kende til de kriterier, der er med til at skelne mellem organismer. Anvendelsen af molekylær fylogeni er blevet et standard værktøj til at klassificere bakterier baseret på genetisk slægtsskab, men det støttes ofte af morfologisk og biokemisk karakterisering. Mikrobiologer kigger på mange egenskaber og karaktertræk, når de skal klassificere og identificere bakterier f.eks. struktur og funktion af vigtige biomolekyler; cellernes form, størrelse og farvning, cellernes metabolisme og DNA-sekvenser.

I denne sektion vil vi gennemgå nogle af de metoder, der særligt anvendes i kliniske laboratorier til biokemisk karakterisering og identificering af patogene bakterier isoleret fra patienter. Metoderne anvendes også i forskningslaboratorier til at fastslå taksonomiske og fylogenetiske forhold, fordi man ved brug af flere metoder kan opnå en bedre forståelse for delte karaktertræk, evolutionær historik og tilvænnning til miljøet.

Kliniske laboratorier og diagnose

Når patienter skal diagnosticeres og behandles for en infektion skal identifikationen af de patogene bakterier gå hurtigt og være troværdig. Klassiske metoder er baseret på grundlæggende mikrobiologiske principper omkring bakteriernes respons på specifikke ændringer i deres miljø. F.eks. kan forskellige vækstmedier påvirke, hvordan bakterien vokser og hvilke stoffer, den producerer. Man anvender to typer vækstmedie til at undersøge dette;

et selektivt medie, som fremmer vækst af nogle bakterier, men ikke andre, og et differentieringsmedie, som gør at vi visuelt kan skelne mellem forskellige typer bakterier.

På hospitaler bruger man ofte et selektivt medie til at identificere humane patogene bakterier. Bakterier kan f.eks. isoleres fra kropsvæsker (f.eks. blod eller urin), bylder, eller andre inficerede områder på kroppen. Disse prøver udplades på forskellige typer specialiseret vækstmedie, som har forskellige formål. For at identificere methicillin-resistente bakterier, kan der anvendes et selektivt vækstmedie, der indeholder methicillin. Dette vækstmedie vil tillade resistente bakterier at danne kolonier, mens det vil hæmme væksten af følsomme bakterier. Eksempler på selektive medier kan også være vækstmedier, der mangler en essentiel aminosyre, og dermed vil hæmme væksten af de bakterier, der ikke er i stand til at syntetisere dette næringsstof selv. Differentieringsmedie kan derimod hjælpe med at skelne mellem forskellige grupper af bakterier pga. ændringer i bakteriens eller mediets fremtoning – ofte et produkt af forskelle i bakteriers biokemiske processer.

Specialiseret medie og enzymologi

Gramfarvning (beskrevet i kapitel 8) gør det muligt for os at opdele bakterier i to store grupper: Gram-positive bakterier og Gram-negative bakterier. Andre test kan gøre det samme og endda bidrage med endnu mere information om mikrobens biokemi. MacConkey Agar er et specialiseret vækstmedie, som kan skelne mellem forskellige Gram-negative bakterier – særligt dem, der findes i mavetarmkanalen på mennesker. Dette vækstmedie indeholder krystalviolet farve og galdesalte, som ødelægger Gram-positive bakteriers cellevæg og på den måde inhiberer væksten af Gram-positive bakterier. Mange Gram-negative bakterier som f.eks. *E. coli* findes i vores mavetarmkanal som en del af vores naturlige tarmflora. Andre Gram-negative bakterier som f.eks. *Salmonella* og *Shigella* er berygtede patogene bakterier, som kan medføre madforgiftning og gøre os dødeligt syge. Brugen af MacConkey agar gør det muligt for os at skelne mellem disse bakterier, fordi vi kan udtrække information om bakteriernes evne til at fermentere kulhydrater. Der er tilsat en pH-indikator til vækstmediet, som gør det muligt visuelt at se, om en bakterie producerer syre (et biprodukt af bakteriens fermentering). Hvis en bakterie producerer syre, vil farven på mediet omkring bakterien skifte fra den oprindelige farve til rød/pink. *E. coli* fermenterer laktose fra vækstmediet og vil dermed udskille syre og få agaren til at fremstå rød/pink. De farlige bakterier *Shigella* og *Salmonella* fermenterer derimod ikke laktose, og de vil derfor opretholde en neutral pH, som ikke forårsager et farveskift. MacConkey agar er dermed *både* selektivt og differentierende, og dette vækstmedie giver os både information om bakteriens cellevægsopbygning og bakteriens evne til at fermentere laktose.

Triple Sugar Iron (TSI) test er et anden metode, der kan skelne mellem tarmbakterier baseret på deres evne til at anvende forskellige stoffer i deres metabolisme. TSI mediet bruger

vi til at klassificere bakterier baseret på deres evne til at fermentere sukre (glukose, sukrose og laktose) til H_2S (hydrogensulfid, et biprodukt af anaerob digestion) samt deres evne til at gro hhv. med og uden tilstedeværelsen af ilt. I denne metode er vækstmediet støbt i rør i stedet for petriskåle. Bakterier prikkes ned i agar-røret, hvor de vil begynde at bruge sukre under aerobe forhold i overfladen og under anaerobe forhold nederst i røret. En pH indikator ændrer mediets farve fra rødt til gult, hvis der produceres syre (et biprodukt af fermenteringen). *Escherichia* og *Klebsiella* er kendte for at fermentere laktose, og de vil f.eks. blive ved med at sænke pH-værdien længe efter at glukosen og sukrosen er opbrugt. Siden de begge er fakultativt anaerobe, vil de fermentere sukre både med og uden tilstedeværelsen af ilt, hvilket vil få hele røret til at fremstå gult. *Citrobacter* og *Salmonella* fermenterer derimod kun sukre under anaerobe forhold og frigiver H_2S . Derfor vil det kun være bunden af røret, der vil være gul, og der vil dannes sort præcipitat fra reaktionen mellem H_2S og jern i mediet.

På samme vis kan vi ved hjælp af en stivelses-test skelne mellem de bakterier, der kan hydrolysere stivelse (en forgrenet polymer opbygget af glukoseenheder) og de, der ikke kan. I denne metode dyrkes bakterierne på vækstmedie tilsat stivelse. Når kolonierne er vokset frem, overhældes agarpladen med en opløsning med jod, som normalt er rød, men som bliver blå, når den danner komplekser med stivelse. På den måde er denne opløsning en effektiv indikator for tilstedeværelsen af stivelse. En bakterie, der kan hydrolysere stivelse som f.eks. *Bacillus subtilis*, vil udskille amylaser, som nedbryder stivelsen i mediet omkring kolonien. Når agarpladen så overhældes med jodopløsningen, vil området omkring kolonierne fremstå rødt, fordi alt stivelsen er blevet nedbrudt af den analyse-positive bakterie. Resten af pladen vil fremstå blå, fordi der stadig er stivelse i mediet. *Streptococcus* og *Staphylococcus* er begge ikke i stand til at hydrolysere stivelse, og de kan derfor bruges som kontroller.

Ved at teste en bakteries evne til at bruge forskellige stoffer i sin metabolisme, kan vi indirekte screene efter tilstedeværelsen af bestemte enzymer, som er unikke for bestemte taksonomiske grupper. Bakterier er udstyret til at kunne overleve i forskellige miljøer med forskellige energi- og kulstofkilder. De er også udstyret til at kunne håndtere forskellige mekaniske, kemiske og miljømæssige forhold, som truer deres eksistens. F.eks. brintoverilte (H_2O_2) er en stærk oxidant, som let kan slå følsomme celler ihjel. Brintoverilte bliver derfor brugt af mange organismer som en forsvarsmekanisme mod patogene bakterier. Mange bakterier har dog udviklet en evne til at modvirke brintoverilte med enzymet katalase. *Staphylococcus*, som dem der findes på vores hud, eller *Bacillus*, som typisk findes i jord, er begge katalase-positive og producerer dermed dette enzym. En bakterie testes positiv for tilstedeværelsen af katalase ved først at udsætte bakterien for en 3% brintoverilteopløsning og derefter observere, om der dannes bobler. Når katalase reagerer med brintoverilte, dannes der nemlig vand og ilt.



Når man arbejder med generelt velstuderede bakterier, kan disse biokemiske tests give os meget information og give os en ide om bakteriens identitet. I klinisk sammenhæng kan sundhedspersonalet bruge disse tests til at komme med kvalificerede bud på en slægt og dermed også foreslå en behandling for patienten. Hvis man gerne vil identificere bakterien på art-niveau (eller hvis det ikke tyder på at være en velkendt og velstuderet bakterie) er det normalvis nødvendigt at anvende sekventeringsteknologier.

Klassisk eller moderne fremgangsmåde

De sidste to årtier er sekventeringsteknologier blevet hurtigere, mere troværdige og billigere, hvilket eksponentielt har øget andelen af tilgængelige genomer i online databaser som f.eks. GenBank. 16S rRNA gen sekventering er derfor blevet en meget udbredt metode til at identificere bakterier på slægtsniveau - og mere specifikke primere kan hjælpe os med at identificere bakterier på arts- eller stammeniveau. Hvis vi ved, at vores bakterie har en 16S rRNA gensekvens med mere end 97% lighed med kendt art, så ved vi også, hvilken fænotype, vi kan forvente. Som beskrevet i kapitel 8, så kombinerer forskere typisk morfologiske, biokemiske og molekylære analyser, når de skal identificere en ukendt organisme. Resultaterne vil nogle gange ikke stemme helt overens, hvilket kan være en indikation på, at vi har en ny art eller en ny variant af en kendt slægt. Koblingen af en bakteries fylogenetiske baggrund, morfologi og biokemiske egenskaber er med til at tegne et udførligt billede af organismen og hjælper os med at få indsigt i dens 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

Biologiske spørgsmål:

- 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

Mange forbinder bakterier med sundhedsskadelige organismer, som vi skal passe på og udrydde med gode hygiejneprocedurer. Modsat har fødevarerindustrien lanceret "gode bakterier" eller probiotika som "levende og aktive kulturer" i yoghurt. Denne tvedeling har medført en opfattelse af, at bakterier generelt ikke er til at stole på, men at nogle kan være fordelagtige, hvis de kommer fra den rigtige emballage. Opdelingen i enten "gode" eller "onde" bakterier er dog misvisende. Sandheden er, at langt de fleste bakterier er harmløse og helt essentielle for vores Jordklodes økosystemer. Den dag vi bliver født, flytter bakterierne ind på vores hud og i vores tarmsystem. Her forstærker de vores immunsystem og beriger os med næringsstoffer, som ellers ikke ville være tilgængeligt for os. Nyere forskning indikerer, at tarmbakterier spiller en rolle i forbindelse med at beskytte os mod sygdomme som f.eks. autisme, astma, diabetes, depression og fedme. Den indbyrdes afhængighed mellem bakterier og andre organismer er ikke tilfældig, men det er derimod et produkt af en lang fælles historie præget af co-evolution og sammenspil mellem forskellige arter.

Symbiotiske forhold

Forhold definerer den måde, vi mennesker interagerer med hinanden. De definerer, hvordan vi kommunikerer, hvordan vi har det med hinanden, de aftaler vi laver og de forpligtelser vi har overfor hinanden. De kan vare i kort tid, eller de kan vare hele livet. Som sociale og levende væsner er vi grundlæggende forbundet og afhængige af hinanden.

Symbiose er betegnelsen for et langvarigt og tæt forhold mellem to eller flere arter. Ligesom alle andre forhold kan symbiose have mange forskellige formål for de involverede parter f.eks. at modtage essentiel næring, tilbyde husly og beskyttelse eller udbrede sit afkom. Symbiotiske forhold kan være forskellige, i forhold til om de er fordelagtige eller skadelige for en art versus den anden art. I den ene ende af skalaen findes mutualistiske (gensidige) forhold, hvor begge arter drager nytte af hinanden. Et eksempel er planteædere, der er afhængige af bakterier i tarmen for at kunne nedbryde cellulose – bakterierne får til gengæld et levested og er konstant forsynet med føde. I den modsatte ende af skalaen findes parasitiske forhold, som er til fordel for den ene part men til ulempe for den anden part. Bakterier, der har en observerbar eller målbar effekt på deres vært, kan enten være mutualistiske, parasitiske eller et sted midt imellem.

Bosiddende på eller i en anden organisme

Symbiotiske forhold er ikke kun defineret af deres effekt (fordelagtig eller skadelig), men de er også defineret af, hvor arterne befinder sig i forhold til hinanden. Arterne i et symbiotisk forhold betegnes symbionter. Ectosymbionter lever på overfladen af deres vært, hvorimod endosymbionter lever i værtens væv eller celler.

De fleste forskere er nu enige om, at eukaryote celler er et produkt af en form for endosymbiose. Da Lynn Margulis publicerede en videnskabelig artikel, der understøttede endosymbiont teorien, var mange forskere skeptiske og hurtige til at afvise ideen om, at mitokondrier og grønkorn engang fra "fritlevende prokaryote celler" opslugt af tidlige eukaryote celler. I dag er der molekylært og genetisk bevis for at disse organeller muligvis stammer fra hhv. α -proteobakterier og cyanobakterier. Dermed var symbiose muligvis en af vigtigste evolutionære hændelser i forbindelse med udviklingen af komplekse celler.



Figur 12-1. Venstre: En uldlus tapper saft fra en plante. Højre: En blædskeermyre dækket af ectosymbionterne *Streptomyces*. Blædskeermyrer anvender de antibiotiske stoffer produceret af *Streptomyces* bakterierne til at holde deres "svampe-farme" fri for parasitter. Foto: <https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/09/a-bug-in-a-bug-in-a-bug.html>, https://science-blogs.com/notrocketscience/2009/11/leafcutter_ants_rely_on_bacteria_to_fertilise_their_fungus_g.php

Nogle symbiotiske forhold vil på den lange bane irreversibelt ændre værtens fysiologi, biokemi og genetik. Det humane genom og genomet for *E. coli* har hhv. 21.000 og 4000 gener, der koder for proteiner. Det er enormt store genomer, hvis man sammenligner med genomer fra bakterier, der er meget afhængige af andre medlemmer i et tre-parts symbiotisk forhold. Bakterien *Candidatus Tremblaya princeps* indeholder kun 121 protein-kodende gener, hvilket er et uhørt lavt antal for en levende organisme. *Tremblaya* er en endosymbiont, der lever på uldlus. Uldlusen og *Tremblaya* indgår i et mutualistisk forhold, hvor *Tremblaya* syntetiserer vitaminer og aminosyrer fra den plantesaft, som uldlusen indtager. Derudover er *Tremblaya* også selv afhængig af en endosymbiont nemlig γ -proteobakterien

Moranella. *Moranellas* genom er væsentligt større end *Tremblayas* og dermed kan den syntetisere de livsnødvendige proteiner, som ikke er kodet i *Tremblayas* minimalistiske genom.

Streptomyces har nogle af de største bakterielle genomer, og de er kendt for deres produktion af antibiotiske stoffer. Disse bakterier er også involverede i symbiotiske forhold netop pga. deres bioaktivitet mod patogener. Blædskærermyrer er afhængige af antibiotika-producerende *Streptomyces* for at beskytte deres føde mod at blive inficeret. Myrerne fungerer som små landmænd, der dyrker svampen *Leucoagaricus* for at bruge den som føde. Men denne svamp er tilbøjelig til at blive inficeret med en anden svamp kaldet *Escovopsis*. *Streptomyces* bakterierne lever på myrernes exoskelet som en ectosymbiont og producerer antibiotika, som specifikt inhiberer *Escovopsis*. Dette beskytter myrernes svampe-farm og dermed deres næringsressource, samtidig med at de antibiotika-producerende bakterier får et levested.

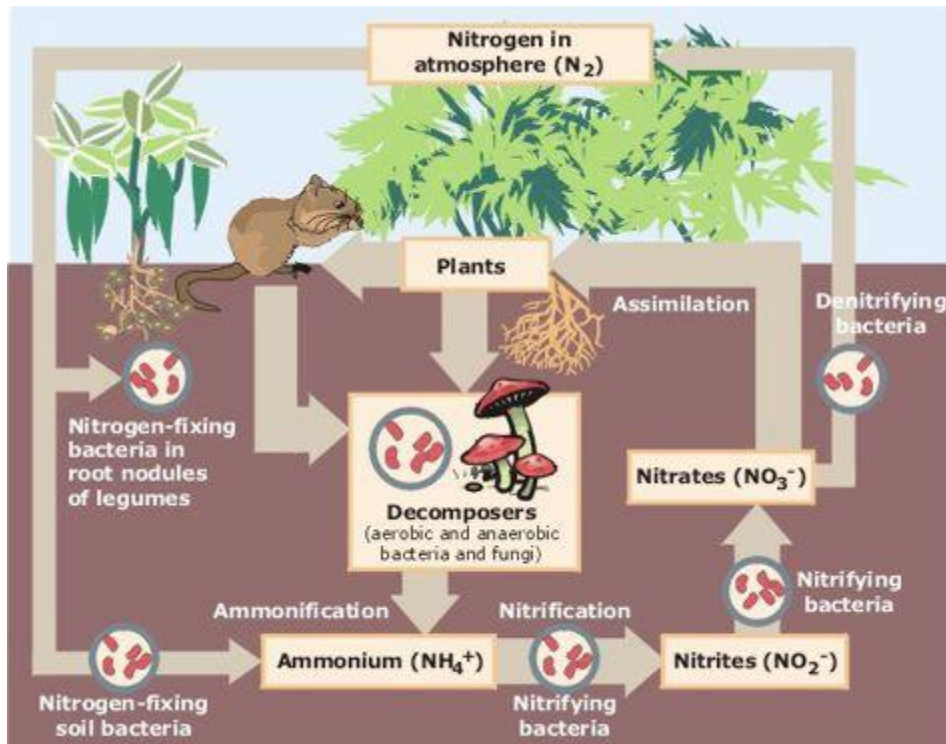
Planter og mikrober

Alle vegne oplever vi, at planter interagerer med mikrober, der enten lever i jorden, på deres overflade eller endda i plantens væv. Enkelte af disse forhold er parasitiske og kan være årsag til enorme tab i landbruget. Arter af den eukaryote mikroorganisme *Pythium* angriber spidserne på planters rødder. Næsten alle planter bliver påvirket af *Pythium*, som, under de rette forhold, kan brede sig meget hurtigt og være meget ødelæggende. Mikrobiologiske sprøjtemidler baseret på f.eks. bakterier bliver med vilje anvendt til at forebygge eller bekæmpe sådanne plantesygdomme. På den måde udnytter vi bakterier til at opretholde balance og til at sikre vores afgrøder.

Bakterier har i årtusinder været brugt til at forbedre vores afgrøder. Kvælstofgas (N_2) udgør ca. 80% af Jordens atmosfære. Kvælstof er en essentiel del af aminosyrer og nukleotider, men kvælstofgas er utilgængeligt for langt størstedelen af alle levende væsner pga. den stabile tripelbinding mellem N-atomerne. Det er enzymet nitrogenase, der via processen kvælstoffiksering kan omdanne N_2 fra atmosfæren til NH_4^+ (ammonium), og gener, der koder for nitrogenaser, er kun fundet i bakterier og arkæer. Kvælstoffiksering er en essentiel del af kvælstofkredsløbet. Ammonium og den deprotonerede form ammoniak (NH_3) kan optages af mange organismer som f.eks. planter og bruges til at danne essentielle biologiske molekyler.

Planter fra ærteblomstfamilien (f.eks. bønner, jordnødder og ærter) er rige på proteiner, og de har derfor et stort behov for kvælstof. Disse planter har udviklet en særligt teknik til at anskaffe deres kvælstof, de huser nemlig mange kvælstoffikserende bakterier kaldet knoldbakterier (Rhizobia) i små rod-knolde. Planten udskiller signalstoffer, som inviterer bakteri-

erne til plantens rodhår (elongerede celler på rodens overflade). Så snart der opstår kontakt mellem plante og bakterie, så vikles bakterien ind i rodhåret, så bakterien indpakkes i rodcellen. Som bakterien koloniserer plantecellen, mister den sin cellevæg og bliver en kvælstoffikserende bakteroid. Disse rod-knolde beskytter bakterierne mod ilt, hvilket er nødvendigt for kvælstoffikseringen. Men cellen har behov for ilt til andre processer, derfor producerer planten et protein kaldet leghæmoglobin, som binder ilt og transporterer det til cellerne udenom nitrogenaserne.



Figur 12-2. Illustration af kvælstofkredsløbet. Bakterier spiller en essentiel rolle i kvælstofkredsløbet ved at fikse kvælstof (omdanne det fra N₂ til ammonium) og dermed gøre det brugbart for planter og dyr. Foto: commons.wikimedia.org

Mikroberne og os

Mikrober udgør ikke kun størstedelen af cellerne og DNA'et i og på vores krop, men de spiller også en stor rolle i forbindelse med vores fordøjelse, immunitet og sikkert også vores opførsel. Hvad enten vi får dem fra ting, vi rører ved, fra yoghurt, fra hinanden eller fra andre arter, så er det ikke helt så simpelt at opdele dem i "gode" og "dårlige" bakterier. Projektet "The Human Microbiome Project" er et amerikansk initiativ, som vil forsøge at karakterisere alle mikroorganismer, der udgør det humane mikrobiom. Atikler forsøger at udfordre det traditionelle syn på bakterier ved at opfordre os til at "pleje" vores mikrobielle flora med "gode" bakterier-fremmende diæter og endda mikrobielle transplantationer. Dog kan bakterier, som beriger vores næring og forebygger koloniseringen af patogener

bakterier i vores tarm, være meget tæt beslægtet med de bakterier, der forårsager madforgiftning og kan føre til omfattende tilbagekaldelser af produkter. Dette er et resultat af, at bakterier, ligesom alle andre organismer, lever i en bestemt tilstand i netop den kontekst, de er i. Mikrober i et konsortium, eller en samling af symbiotiske arter i et mikrobielt samfund, holdes i skak af nabo-organismer, men de udviser meget forskellige fænotyper i isolation. Dette er udfordrende, når man studerer mikrober uden for deres kontekst – både hvis der er tale om en række abiotiske faktorer eller indersiden af en uddrud.

Afsluttende bemærkning

Indenfor mikrobiologien har der været et skifte fra at studere mikrober i renkulturer til at studere blandede mikrobielle samfund og andre former for mikrobielle associationer. Vi ser, at bakterier er påvirket af deres kontekst – både mikroberne omkring dem og det fysiske miljø – og vi kan lære *meget* mere om deres biologi ved at observere deres respons på denne kontekst sammenlignet med at studere dem i isolation. Bakterier har meget anderledes vækstforhold i laboratoriet sammenlignet med i jorden – og de ser også meget anderledes ud. Derudover vil langt de fleste (99%) ikke gro i laboratoriet; vi forstår simpelthen ikke kompleksiteten af deres behov godt nok til at designe nogle vækstforhold, der behager dem.

I vores aktivitetsassays forventede vi kun én form for interaktion: antagonisme, som resulterer i en helt klar inhiberingszone. Men du vil måske se, at din test organisme eller dine isolater i nogle tilfælde ser lidt anderledes ud eller vokser lidt anderledes, når de er i tæt kontakt med hinanden. Måske øger den ene organisme den andens vækst eller måske samarbejder de om at skaffe ressourcer fra mediet. Denne slags interaktioner kunne være omdrejningspunkt for et helt andet mikrobiologisk skoleforløb – nogle forskere vier endda hele deres arbejdsliv til at blive klogere på disse interaktioner. Bare søg på "microbial communities" eller "mixed-species" eller "biofilm" på nettet og du vil finde et væld af ny og interessant forskning på området.

Det er vigtigt at forstå, at jeres fremgangsmåde til at studere og forstå jeres jordbakterier har været meget målrettet. Men mulighederne indenfor forskning er bestemt ligeså talrige og forskelligartede som bakterierne er. Hav det altid in mente, at hver bakterie indeholder et væld af informationer og der bliver flere og flere, jo mere vi studerer dem både i kontekst med andre organismer og andre variabler. I har allerede efter dette forløb opbygget et solidt grundlag til at kunne diskutere mikrober, lære mere om dem i litteraturen og designe flere fremtidige eksperimenter. Det du har lært om dine isolater indtil videre er et produkt af *dine* interaktioner med organismene, og på mange måder er *du* blevet deres kontekst. Det er essensen af forskning. Vores erfaringer efterlader et permanent aftryk på den verden, vi lever i og med dette forskningsprojekt, har du nu efterladt dit.

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., & Spiteller, D. (2009) Candicidin-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.ny-times.com/2012/06/19/science/studies-of-human-microbiome-yield-new-insights.html?_r=0

Øvelse 12: Vurdér dine isolaters aktivitet mod eukaryote celler, deres potentiale i biologisk kontrol og deres økologiske forhold med andre organismer

Biologiske spørgsmål:

- 1) Hvordan vil du undersøge, om fundne antibiotiske stoffer kan bruges til at behandle bakterieinfektioner i mennesker?
- 2) Hvordan vil du undersøge, om antibiotika-producerende bakterier interagerer med planter og andre organismer?
- 3) Hvordan vil du undersøge, om det er muligt at bruge antibiotika-producerende bakterier til biologisk kontrol som f.eks. sprøjtemidler på vores afgrøder?