

Uppdateringar och fördjupningar

augusti 2013

Dessa uppdateringar och förslag till fördjupningsläsning är avsedda att förmedla dynamiken i dagens mikrobiologi, genom att fokusera på specifika delområden och där presentera en del pågående forskning. För att underlätta för studenter att fördjupa sig i dessa områden är texten försedd med källhänvisningar, såväl till sammanfattningsartiklar som till originalarbeten. Sidhänvisningarna avser andra upplagan av "Introduktion till mikrobiologi".

Kapitel 2 Livsmedel

Att hålla mikrobhalten på en rimlig nivå och att undgå möjliga patogener är ett speciellt problem när det gäller livsmedel, speciellt livsmedel som konsumeras utan föregående tillagning. Detta beror på att konventionella steriliserings- och desinfektionsmetoder som regel påverkar kvaliteten på ett oönskat sätt och ibland t.o.m kan göra livsmedlet direkt ohälsosamt. Nyare svenska exempel på problem som kan orsakas av mikrober i livsmedel är två utbrott av kryptosporidios (2010 i Östersund och 2011 i Skellefteå) troligen orsakade av kontaminerat dricksvatten, och tarminfektioner med den nya EHEC-stam (enteroaggregativ *E. coli* O104:H4) som spreds i hela Nordeuropa 2011 från groddar av egyptiska bockhornsklöverfrön. Arbetet med att utveckla nya dekontamineringsmetoder pågår därför ständigt. Här beskrivs kort några aktuella metoder.

(i) *Dricksvatten*. Vatten kan som regel renas tillräckligt genom filtrering, strålning och ev. klorinering, men detta kräver någon form av reningsanläggning, dvs. kostar pengar, vilket är svår genomförbart i stora delar av världen. Men solljus kan användas för att reducera mikrobhalten i vatten. Detta görs med en enkel teknik som i princip består i att vattnet fylls i stora genomskinliga plastflaskor som sedan får stå i solen upp till två dygn, varvid halten patogener ofta reducerats väsentligt. I en ny sammanfattningsartikel¹ redogör McGuigan m.fl. för dagsläget beträffande verkningsmekanismen (huvudsakligen uppvärmning och UV-strålning) och effektivitet mot olika patogener. Växande bakterier och parasiter inaktiverades effektivt, medan endosporer och cystor av parasiter (sid 243) samt virus var mer resistent.

(ii) *Grönsaker och frukt*. Plasma kan definieras som en gas som behandlats så att elektronerna separerats från atomkärnorna. Plasma kan ha antimikrobiell effekt, och om den produceras exempelvis genom elektriska urladdningar vid rumstemperatur kan livsmedel behandlas med plasma vid låg temperatur och atmosfäriskt tryck, vilket utsätter livsmedlet för minimal påverkan. Fernández m.fl.² undersökte inaktivering av (tillsatt) *Salmonella* Typhimurium med plasma av kvävgas. Med bakterier odlade i vanliga labbodlingsmedier och därefter applicerade på membranfilter fann de att bakteriernas tillväxtfas inte spelade nämnvärd roll för inaktiveringskinetiken, och heller inte själva laddningarna i plasman. Genom att jämföra inaktivering på olika livsmedel

¹ McGuigan m.fl. (2012) *J Hazard Mat* 235–236:29

² Fernández m.fl. (2013) *Food Microbiol* 33:24

vars ytor inokulerats med *Salmonella Typhimurium* kunde författarna föga förvånande se att "släta" ytor dekontaminerades effektivare än ytor med mycket veck och fåror, men också på deras "sämsta" objekt (potatis) uppnåddes en log-enhets reduktion efter 15 minuter. På jordgubbar uppnåddes två log-enheters reduktion på samma tid, och på sallad nästan tre log-enheter. Metoden verkar alltså potentiellt kunna ge bra antimikrobiell behandling av livsmedel med förhållandevis släta ytor, men mycket återstår att undersöka angående verkningsmekanismerna.

Högt tryck (200–900 MPa) resulterar i avdödning av vegetativa celler vid kylskåps- eller rumstemperatur så att mer av livsmedlets ursprungliga egenskaper bevaras, även om olika livsmedel naturligtvis påverkas i olika grad av trycket³. Allt eftersom metoden får ökad användning ökar tyvärr också bakteriers resistens mot högt tryck. Hos *E. coli* O157:H7 (EHEC) beror detta på mutationer som leder till ökad RpoS-aktivitet⁴ (σ^S , sid 115) eller påverkar cAMP-CAP-regleringen⁵ (sid 116). Hur det senare fungerar är ännu oklart.

(iv) *Endosporer*. Högt tryck kan inaktivera också endosporer, men då krävs som regel temperaturer upp till 45–65 °C.⁶ Den viktigaste faktorn för inaktivering av *Bacillus*-endosporer vid högt tryck verkar vara att dipikolinsyra då frisätts⁷ (sid 50); sådan frisättning är normalt ett första steg vid germinering. Olika metoder har kommit till användning för att öka möjligheterna för sporererna att germinera, vilket då förstås ökar deras känslighet. Sarker m.fl.⁸ sammanfattar erfarenheter med olika sådana metoder.

Också synligt (blått) ljus kan inaktivera endosporer. Vid försök med små (3 ml) omrörda flytande kulturer av bakterier (*Bacillus cereus* och *Clostridium difficile*) och ljuskällan 2 cm från kulturens yta avdödades sporer med upp till 4 log-enheter efter bestrålning (50–100 kJ cm⁻²) vid 405 nm.⁹ Det är oklart hur ljuset verkar, men förekomsten av porfyriner (kemiska föreningar av samma typ som hem i hemoglobin) i bakterierna var viktiga för effekten. Dessa skulle kunna fotoexciteras och reagera med syre, och därvid bilda hydroxylradikaler och singlettsyre (sid 71).

Kapitel 3 Membranvesiklar

Membranvesiklar (MV), små "blåsor" som knoppas av från ett cellulärt membran, är kända från såväl bakterier som från arkéer och eukaryoter, men med lite olika beteckningar; de kallas yttermembranvesiklar (OMV, "outer membrane vesicles") hos gramnegativa bakterier och avstötta mikrovesiklar (SMV, "shedding microvesicles") hos eukaryoter. Här används den gemensamma beteckningen membranvesiklar.

Genom att deras innehåll härrör från cellens cytoplasma eller periplasma kan vesiklarna överföra enzymer, toxiner, kommunikationssignaler och annat till andra celler, och till skillnad från andra sekretionssystem möjliggör membranvesiklar export

³ Patterson m.fl. (2007) i Doona och Feeharry (red) *High pressure processing of foods*. Blackwell Publishing, s. 1.; Belletti m.fl. (2013) *Food Microbiol* 35:34; Goyal m.fl. (2013) *J Dairy Sci Technol* 2:12; Singh och Ramaswamy (2013) *J Food Res* 2:11

⁴ Vanlint m.fl. (2013) *Int J Food Microbiol* 163:28

⁵ Vanlint m.fl. (2013) *Int J Food Microbiol* 166:65

⁶ Silva m.fl. (2012) *Food Microbiol* 32:206

⁷ Reineke m.fl. 2013 *Int J Food Microbiol* 162:55

⁸ Sarker m.fl. (2013) *Crit Rev Microbiol* doi: 10.3109/1040841X.2013.788475

⁹ Maclean m.fl. (2013) *Photoche Photobiol* 89:120

av olösliga substanser.¹⁰ OMV kommer ifrån yttermembranet, medan grampositiva bakteriers, arkéers och eukaryoters MV och SMV knoppas av från cellmembranet. Hos samtliga organismer verkar homologa proteinkomplex, nödvändiga för transport (ESCRT, "endosomal sorting complex required for transport"), vara inblandade. Processer som påverkas av vesikelavsöndring är bl.a. kapselbildning, interaktion med andra mikrober (exempelvis via kvorumsignalsubstanser och DNA), utsöndring av virulensfaktorer som toxiner (t.ex. LPS från gramnegativa celler) till värdceller och stimulering av specifikt immunförsvar hos värdorganismen. Även antigenpresentation som kan leda till stimulering av det specifika immunförsvaret hos värdorganismen kan bero på vesikelbildning.¹⁰ Bland exempel som studerats på senare år kan nämnas:

(i) *Kapselpolysackarid A*. Denna kapselkomponent hos *Bacteroides fragilis* exporteras från bakteriecellerna i membranvesiklar.¹¹ Kapselsackariden är känd för att orsaka immuntolerans (avsaknad av immunreaktion), något som hindrar utveckling av inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD) och Crohns sjukdom. Detta är alltså till fördel för värdorganismen.

(ii) *Virulensfaktorer*. Peptidaser och fytaser och också ett fytotoxin (coronatin) utsöndras i yttermembranvesiklar från *Pseudomonas syringae* pv tomato T1 (en växtpatogen).¹²

(iii) *Inflammation*. Någon komponent i yttermembranvesiklar från patogena (enterotoxigen *E. coli*) såväl som icke-patogena *E. coli*, troligen LPS, kan initiera inflammation i humana endotelceller bland annat genom att orsaka uppreglering av interleukin-6 och TNF- α .¹³

(iv) *Hydrolytiska enzym*. OMVer från frilevande myxokocker innehåller hydrolaser som lyserar en annan gramnegativ bakterie när vesikeln smälter samman med dess cellvägg.¹⁴ Detta har en naturlig funktion i bakteriens levnadssätt som predator på andra bakterier. Såväl frilevande som aggregerande myxobakteriers OMVer innehåller signalsubstanser och andra protein som påverkar andra myxobakterier i närheten.¹⁴

Kapitel 4 Bandad järnmalm

En väsentlig del av jordens totala järnmalmsförekomst består av s.k. bandad järnmalm, prekambrika sedimentära bergarter bestående av tunna (mm- till cm-tjocka) lager av järnoxider omväxlande med järnfattiga lager av skiffer eller flinta. Förekomsterna kan sträcka sig över tusen kilometer med tjocklek från några centimeter till flera hundra meter. Tidigare hypoteser har förklarat förekomsten med att de uppkommit i djuphavet genom oxidation av lösligt tvåvärt järn, huvudsakligen med vulkaniskt ursprung, till olösliga oxider av trevärt järn. Ett problem med denna hypotes är att den prekambrika atmosfären sannolikt hade $\leq 0,001$ % av dagens syrehalt och därför huvudsakligen var reducerande snarare än oxiderande. Experimentella data stöder inte heller att järnet skulle kunnat fotooxideras (medierat exempelvis av UV-strålning) under prekambrika

¹⁰ Deatherage och Cookson (2012) *Infect Immun* 80:1948; Kulp and Kuehn (2010) *Annu Rev Microbiol* 64:163; MacDonald och Kuehn (2012) *Res Microbiol* 163:607

¹¹ Shen m.fl. (2012) *Cell Host Microbe* 12:509

¹² Chowdhury och Jagannadham (2013) *Biochim Biophys Acta* 1834:231

¹³ Sault m.fl. (2013) *J Surg Res* doi: 10.1016/j.jss.2013.05.035

¹⁴ Whitworth (2011) *Adv Appl Microbiol* 75:1

betingelser. En vanlig hypotes har varit att anaeroba fototrofa bakterier (sid 65) använt lösligt tvåvärt järn som elektrongivare och därvid oxiderat det till trevärt järn, vars oxider och hydroxider är olösliga. Direkt stöd för detta har dock saknats, liksom idéer om hur den bandade strukturen uppkommit.

Fru m.fl.¹⁵ har nyligen undersökt sedimentära bergarter i Egeiska havet utanför Grekland. Kemisk analys av bergarterna visar att de bildats vid mycket låga syrehalter. Forskarna beskriver väl bevarade fynd av fossila mikrober i järnbanden vilka morfologiskt liknar de nu levande anaerobt fotoferrotrofa (= använder tvåvärt järn som elektronskälla och ljus som energiskälla) α -proteobakterierna i arten *Rhodomicrobium vanielii*, som liksom de fossila mikroberna har prosteka (sid 46) och förökas genom knoppning från prostekans distala ände. Genom att de nybildade cellerna inte alltid frigörs helt från modercellen vid avknoppningen kan sammanhängande nätverk av bakterier uppkomma. De fossila cellerna är inlagrade med hematit (järnoxid med bruttoformeln Fe_2O_3). Till skillnad från aeroba litotrofa järnoxiderande bakterier, där den bildade järnoxiden lagras in i strukturer som bakterien sedan kan kvitta sig med, kommer nu levande *R. vanielii*-celler vid fototrof tillväxt med järn som elektrongivare att helt omges av de bildade järnoxiderna, vilket resulterar i att cellerna till slut "kvävs" och dör. Om de fossila bakterierna i bandjärnmalmen växte på likartat sätt skulle detta kunna förklara hur forskarna idag kunnat hitta så välbevarade fossil i bergarterna; bakterierna omges på alla håll av utfällda järnoxider. Forskarna kunde visa att den bandade strukturen i de fossila sedimenten var förknippad med förekomst av ett tredimensionellt nätverk av bakterier, förbundna med varandra via trådar motsvarande prostekor i storlek. De postulerade därför att bakteriekolonin växte tills så mycket hematit omgav cellerna att varken ljus eller Fe^{++} kunde tränga igenom. Detta resulterade i att bakterierna dog, varefter ett mörkt, järnrikt lager återstod. Det sedimentlager som bildades omedelbart efter att bakterierna slutat växa var då fattigt på såväl mikrober som järnoxider, och därför ljusare. Så länge Fe^{++} tillfördes från geotermala källor fanns möjligheter att etablera en ny biofilm med fotoferrotrofa bakterier, varefter historien upprepades.

Självklart innebär inte detta att forskarna har visat att *Rhodomicrobium vanielii* skapat den bandade järnmalmen. Forskarna har dock kunnat lägga fram en plausibel hypotes för hur anaeroba fotoferrotrofa knoppande bakterier kunnat skapa en struktur med omväxlande lager av järnoxidrika och järnfattiga sediment i anaeroba prekambrika hav. Små bakterier kan åstadkomma mycket när de är många!

Kapitel 5 Oanpassat genuttryck

Naturligt urval och tävlan mellan organismer "borde" leda till att bakteriers genuttryck är väl anpassat till den miljö de lever i och att gener som har en gynnsam effekt på tillväxten uttrycks i hög grad medan gener som är oväsentliga eller skadliga har ett lägre genuttryck. Ett klassiskt exempel är enterobakteriernas *lac*-operon, som bara uttrycks när laktos är den bästa tillgängliga näringskällan (sid 116). Price m.fl.¹⁶ har nyligen undersökt detta mer systematiskt hos fyra olika bakterier: *Shewanella oneidensis* (organotrof med god förmåga till anaerob respiration), *Zymomonas mobilis* (fakultativt respiratoriska/fermenterande bakterier med begränsad förmåga att bryta ned kolhydrater; producerar etanol), *Desulfovibrio alaskensis* (organotrof som respirerar enkla organiska föreningar med sulfat som elektronnottagare) och *Escherichia coli*. De

¹⁵ Fru m.fl. (2013) *Nature Comm* doi: 10.1038/ncomms3050

¹⁶ Price m.fl. (2013) *Molecular Systems Biology* 9:660, doi10.1038/msb.2013.16

kom fram till den överraskande slutsatsen att hos tre av dessa fyra var inte genregleringen särskilt väl anpassad till tillväxtförhållandena.

S. oneidensis, vildtyp och olika transposonmutanter, odlades i olika typer av medier med en av åtta olika kolkällor, aerobt eller anaerobt och med eller utan vissa toxiska betingelser (CuCl₂, NaNO₂, nalidixinsyra eller surt pH). Genuttrycket studerades genom hybridisering av cDNA (sid 222) framställt från RNA som isolerats från odlingarna. Genom att jämföra levnadsdugligheten (fitness) parvis för mutant och vildtyp under givna betingelser, och mäta nivån på vildtypens uttryck av respektive gen kunde forskarna se att gener som var "skadliga" under åtminstone några av de testade betingelserna (mutanten växte där signifikant bättre än vildtypen) ofta hade ett högt genuttryck under alla de studerade tillväxtförhållandena. När forskarna jämförde uttrycket av gener som var viktiga för levnadsdugligheten under en av de testade levnadsbetingelserna men inte en annan fann de att uttrycket ändrades åt "rätt" håll (lägre uttryck där funktionen inte var väsentlig för tillväxt) för knappt två tredjedelar av generna, medan det ändrades åt motsatt håll (högre uttryck där produkten inte bidrog till tillväxten) för en dryg tredjedel, och många av de gener vilkas uttryck varierade mest beroende på levnadsomständigheterna var inte väsentliga för tillväxt under någon av omständigheterna. Gener som inte var lokaliserade i varandras fysiska närhet men vilkas produkter deltog i samma metaboliska väg var heller inte samreglerade i nämnvärd utsträckning. Sammanfattningsvis visade sig knappt hälften av *S. oneidensis*-generna vara suboptimalt reglerade, och bara fem procent var reglerade på ett "ändamålsenligt" sätt. Liknande resultat erhöles vid mindre omfattande försök med *Z. mobilis* och *D. alaskensis*. Däremot visade sig *E. colis* genuttryck vara reglerat "ändamålsenligt", i förhållande till odlingsbetingelserna.

Forskarna visade alltså att under laboratorieförhållanden är genuttrycket hos tre av de fyra studerade bakterierna inte särskilt väl anpassat till levnadsomständigheterna, men hur generellt detta är, eller hur det är i naturen, ger inte deras försök någon information om. Många fler bakterier behöver undersökas för att Price och medarbetares resultat¹⁶ ska kunna utvärderas.

Kapitel 6 Nya bakteriefyla

Att mångfalden av encelliga organismer är avsevärt större än vad som studerats i renkultur är ingen nyhet idag (se sid 143ff). Att inte behöva gå längre än till närmaste diskbank för att kunna beskriva nya fyla av bakterier kanske ändå låter osannolikt? Men det är just vad McLean m.fl.¹⁷ gjort: De undersökte en bakteriell biofilm från diskbanken på ett lokalt sjukhus med en en-cellsmetagenomisk metod (dvs. metagenomisk undersökning baserat på DNA från enstaka celler) de utvecklat. Analysen visade på förekomst av bakterier tillhörande över trettio olika kända grupper, huvudsakligen bakteroideter och flavobakterier, och gav också drygt 1 Mb unika sekvenser från en bakterie som betecknats TM6SC1, vilket de anser troligen representerar 90 % av denna icke-odlade bakteries genom. Knappt hälften av generna liknade sekvenser som beskrivits i databaser. TM6SC1 hör till kandidatfylumet TM6 ("kandidat" eftersom inga medlemmar kunnat odlas), som definierats baserat på SSU (16S)rRNA-sekvensanalys. Sekvenser som hänförts till TM6 har påträffats med låg frekvens i många olika miljöer i flera världsdelar, men en vanlig miljö verkar vara vattenledningar. Fylogenetisk analys av TM6SC1-SSUrRNA visar att dess närmaste släktingar troligen finns i fylumen Aquificales (sid 129) och Acidobacteria (ej medtaget i läroboken).

¹⁷ McLean m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E2390

Analys av genomets kodande kapacitet visar att bakterien troligen har gramnegativa cellväggar och kan bilda någon form av sporer. Bakterien saknar troligen flageller, men kan eventuellt röra sig med de ryckiga rörelser som involverar typ IV-pili. Energikällan kan vara komplexa kolhydrater som spjälkas delvis externt och metaboliseras intracellulärt via pentosvägen. Avsaknad av gener kodande för fullständiga biosyntesvägar för aminosyror, purin- och pyrimidinbaser samt porfyriiner gör det troligt att bakterien tar upp dessa från omgivningen. Här måste man dock hålla i minnet att funktionen hos mindre än hälften av generna kunde härledas genom databasjämförelser; TM6SC1 kan ha andra gener kodande för dessa funktioner. Den ringa genomstorleken, tillsammans med avsaknaden av fullständiga biosyntesvägar och förekomsten av gener vilkas närmaste homologer är eukaryota (amöbor), kan tyda på att TM6SC1 lever i symbios med andra organismer. Denna utvecklade encellsmetagenomik kommer säkerligen att signifikant öka möjligheterna att studera bakterier utan att odla dem.

Kapitel 7 Liv i extrem kyla

Vad för bakterier kan leva i extrem kyla, och hur klarar de av att leva där? Några nya rapporter visar på en stor biodiversitet, och förvånande egenskaper.

(i) *Antarktis*. Sjön Vostok under Antarktis is är en av världens största insjöar, och fyra kilometer glaciäris ovanpå den har isolerat sjöns innehåll upp till 20 miljoner år. Ryska forskare har borrar sig ned mot sjöns yta till den nyis ("accretion ice"), mer än tvåhundra meter tjock, som bildas överst i sjön då glaciären rör sig över vattenytan (de undviker att borra sig ned till flytande vatten för att inte riskera att kontaminera detta, och diskuterar eventuell föreliggande kontaminering av sina borrhärdar ingående). De har nyligen rapporterat metagenomiska studier av fyra iskärnor från nyis ca 3,5 km under glaciärytan.¹⁸

Analysen visade på 3 369 unika sekvenser. Av dessa var 3 169 från bakterier, varav drygt hälften visade $\geq 97\%$ sekvensidentitet med sekvenser i GeneBank; mer än hälften av dessa var från andra metagenomiska studier och representerade bakterier som inte odlats. De flesta identifierade bakteriesekvenserna hörde till Firmicutes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria och Bacteroides. Sex procent av alla unika sekvenser kom från eukaryoter, de flesta svampar men också en del andra mikroorganismer och en del artropoder. Bara två sekvenser härrörde från arkéer, vilket kanske var lite förvånande med tanke på hur vanliga arkéer är i Antarktis djuphav.

Analys av identifierbara gensekvenser visade att heterotrofi var vanligt, men såväl koldioxidassimilering som fotosyntes (igen kanske förvånande med tanke på djupet under glaciären) var väl representerat, liksom alla steg i kvävetets kretslopp. Likheterna var, föga förvånande, störst med sekvenser från psykrofila och psykrotrofa organismer. Det mest spännande är förstås de icke-identifierade sekvenserna – finns här spår efter urtida organismer som inte finns någon annanstans idag, eller okända köldanpassningar? Utan tvekan kommer det mer data från denna forskargrupp när de analyserat sina iskärnor mera.

(ii) *Arktis*. Från andra änden av jordklotet kommer lite mera data om en extremt psykrotrof bakterie.¹⁹ *Planococcus halocryophilus* Or1 (en icke-sporulerande firmikut).

¹⁸ Shtarkman m.fl. (2013) *PLOS One* 8(7) doi:10.1371/journal.pone.0067221

¹⁹ Mykytczuk m.fl. (2013) *ISME J* 7:1211

För att kunna odla bakterierna vid temperaturer under fryspunkten tillsatte forskarna glycerol till 7 % till mediet. I detta medium växte *P. halocryophilus* Or1 vid $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ med generationstider på 40–50 dagar, jämfört med en timme vid den optimala tillväxttemperaturen $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Forskarna kunde inte åstadkomma ett odlingsmedium som förblev flytande under $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, men genom att inkubera bakterierna i (steriliserade) jordprov från permafrostlagren med ^{14}C -acetat och mäta producerad ^{14}C - CO_2 kunde de påvisa aktiv metabolism ända ned till $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vid dessa låga temperaturer omgavs cellväggen av en "skorpa" av peptidoglykan och extracellulära polysackarider, medan cellmembranet förvånande nog huvudsakligen innehöll mättade fettsyror (sid 70); hur detta membran kan bibehålla fluiditet vid så låga temperaturer är oklart. Proteinernas aminosyrasammansättning resulterade i maximal flexibilitet. Hela 17 % av genomet var repetitivt, med många kopior av exempelvis gener som kodade för upptag av osmolyter (ämnen som ökar det osmotiska trycket, sid 69), men också av gener inblandade i celldelning, fettsyrsyntes, oxidativ stressrespons och transkriptionsreglering. Genkopiorerna var inte helt identiska, vilket resulterade i produktion av isoenzymer (varianter av ett och samma enzym) vilka kan skilja sig något från varandra avseende optimala förhållanden, och därmed finjustera bakteriens anpassningsförmåga. Forskarna menar att kombinationen av proteinflexibilitet och denna genvariation sannolikt är vad som gjort det möjligt för bakterien att hantera såväl osmotisk stress som köldstress, och kan innebära att permafrostlagren i Arktis hyser ett mer aktivt mikrobiellt ekosystem än tidigare ansett.

Kapitel 8 Bakterieinfektioner

För att bättre kunna bekämpa infektionssjukdomar behövs bättre insikter i hur organismerna evolverar, och mer kunskap om organismernas utveckling och interaktion med andra organismer. De studier som beskrivs nedan ger några smakprov på nyare forskning rörande dessa aspekter.

(i) *Tuberkulosbakterier*. *Mycobacterium tuberculosis* har idag endast människa som värd, men den närbesläktade *M. bovis* infekterar nötkreatur och ingår i det vaccin (BCG-vaccin) som ger viss immunitet mot tuberkulos hos människa. En gängse hypotes har varit att kreatursbakterien har gett upphov till människans patogen.

Genomundersökningar visar dock att *M. bovis*-stammarna grenat ut mitt i *M. tuberculosis*-klustret, och visar betydligt mindre inbördes variation än de stammar som orsakar human tuberkulos.^{20, 21} Detta tyder på att patogenen rört sig från människa till nötkreatur i stället för tvärtom, och dess ursprung förblir okänt. Jämförelser mellan olika moderna stammar av tuberkelbakterien visar att deras sista gemensamma stamform fanns för 5 000–40 000 år sedan, och att de humana stammarnas troliga ursprung är på Afrikas horn.²¹

(ii) *Aktivering av kolerabakterier*. Påvisande av kolerabakterier i naturliga miljöer kompliceras av att bakterien ofta befinner sig i en vilande form som inte går att odla på laboratoriemedier (VBNC, sid 82). Det är känt att vilande kolerabakterier kan aktiveras vid passage genom ett däggdjurs mag-tarmkanal. Vad är det som aktiverar bakterierna? Bari m.fl.²² har nyligen visat att två olika kvorumsignal-molekyler (autoinducerare, sid

²⁰ Veyrier m.fl. (2011) *Trends Microbiol* 19:156

²¹ Blouin m.fl. (2012), *PLoS One* 7 doi:10.1371/journal.pone.005284

²² Bari m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 9926

67), CAI-1 och AI-2, från kolerabakterier var för sig eller gemensamt kan aktivera vilande bakterier. Vilande celler var kockoida och omslutna av ett hölje. Vid aktiveringen förändrades bakteriernas form så att de blev vibrioner. Det finns många olika sorters bakterier (och också arkéer, se texten till kap. 11) som bildar AI-2, medan CAI-1 bara bildas av bakterier i släktet *Vibrio*. Om en människa får i sig kolerabakterier som befinner sig i viloformen kan bakterier i människans normala mag-tarmflora ha producerat AI-2, vilket då kan resultera i att kolerabakterierna aktiveras och kolera uppkommer. Man kan också tänka sig att andra bakterier i miljön bildar AI-2 och då kommer alltså de vilande bakterierna i vattnet att aktiveras och ge sjukdom hos människor som kommer i kontakt med det smittade vattnet. Bari m.fl.²² fann också att tillsats av autoinducerarna till anrikningsmediet signifikant ökade möjligheterna att detektera *V. cholerae* i naturliga vattendrag, rimligtvis för att de inducerades till aktiv växt och därmed kunde påvisas genom odling. Förbättrade möjligheter att detektera bakterien kan förbättra möjligheterna att förebygga koleraepidemier.

(iii) *Hjälpsamma bakterieinfektioner?* α -proteobakterien *Wolbachia* deltar i många symbioser med flercelliga eukaryoter (sid 152). Zhang m.fl. har studerat hur bakterien påverkar en av sina värdar, myggan *Aedes aegyptii* som är en av vektorerna för denguevirus (sid 275).²³ Det var känt sen tidigare att *Wolbachia*-infektion ledde till reducerad cytosinmetylering av myggornas DNA, och skyddade myggorna från denguevirus. Zhang m.fl. kunde nu visa att myggans uttryck av sin enda cytosinmetylasgen, *AaDnmt2*, reducerades efter *Wolbachia*-infektion. Forskargruppen har tidigare visat att en av eventuellt flera små reglerande RNA-molekyler (sid 120) hos myggan, miRNAt aae-miR-2940, ökar i mängd efter *Wolbachia*-infektion²⁴. Nu²³ kunde de visa att denna RNA-molekyl i sin tur nedreglerade *AaDnmt2*-genen. På detta sätt ledde *Wolbachia*-infektionen till att lägre mängd cytosinmetylas bildades i myggans celler, och att myggans DNA blev undermetylerat. Graden av cytosinmetylering påverkar i sin tur uttrycket av många mygggener, däribland sådana som påverkar både bakteriens och virusets replikation; med undermetylerat DNA hindrades denguevirusreplikationen medan *Wolbachia*-replikationen stimulerades.

Det beskrivna systemet är förstås högtintressant i de delar av världen där *Aedes*-myggor sprider denguefeber. *Wolbachia* har ju visat sig kunna spridas mycket snabbt i nya insektpopulationer (sid 153); kanske kan bakterien där reducera spridningen av denguevirus?

Kapitel 9 Antibiotika och antibiotikaresistens

Stora problem med antibiotikaresistens gör att forskning kring verkningsmekanismer och nya bekämpningsmetoder är mycket aktiv.

(i) *Verkningsmekanismer.* För en del år sedan väckte det mycket uppmärksamhet när några forskare visade data som tydde på att bakteriocida (sid 188) antibiotika verkade via reaktiva syreformer (ROS).²⁵ Bland annat visade de att tiourea, som hämmar bildandet av ROS, reducerade den bakteriocida effekten av dessa antibiotika under aeroba förhållanden. En annan forskargrupp fann att antibiotikagenererade hydroxylradikaler till och med var effektiva mot persisterande mykobakterier, vilkas

²³ Zhang m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:10276

²⁴ Hussain m.fl. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:9250

²⁵ Kohanski m.fl. (2007) *Cell* 130:797; Kohanski m.fl. (2010) *Mol Cell* 37:311

motståndskraft mot antibiotika var förknippad med reducerad syrehalt i deras omgivning.²⁶ Det är väl känt att ROS kan orsaka stora skador på makromolekyler inklusive DNA, men det är också väl känt att bakteriocida antibiotika fungerar också under anaeroba betingelser, så ROS är uppenbart inte hela sanningen. Dessutom kan den ökade mutationsfrekvensen orsakad av oxidativa skador på DNA också resultera i utveckling av antibiotikaresistens.²⁷ Två nya rapporter^{28 29} visade att bakteriocida antibiotika som fluorokinolonerna ciprofloxacin och norfloxacin visserligen resulterade i produktion av ROS, men att dessa reaktiva syreformer inte var nödvändiga för den bakteriocida effekten. Tiourea reducerade den bakteriocida effekten också under anaeroba förhållanden.²⁹ I en tredje undersökning sågs ingen ökning av halten väteperoxid (en ROS-form) när bakterier behandlades med bakteriocida antibiotika som norfloxacin under aeroba förhållanden. I denna undersökning gav norfloxacin likväl bakteriocid effekt under såväl aeroba som anaeroba förhållanden.³⁰ Syrets och dess mer reaktiva formers roll i bakteriocidi är uppenbart fortfarande oklar.

Nya rön visar att makrolider (sid 202), som tidigare trots hämma all proteinsyntes hos bakterier, i stället hämmar selektivt: vissa peptidkedjor kan lämna det makrolidhämmade ribosomkomplexet, och makrolider med starkare avdödande effekt släpper igenom fler peptidkedjor än sådana med svagare effekt.³¹ Detta tyder på att det är obalans bland bildade proteiner snarare än total hämning av proteinsyntesen som orsakar dessa antibiotikas bakteriostatiska effekt.

(ii) *Nya antimikrobiella substanser.* Bakteriociner (sid 156) är ofta mycket effektiva mot andra bakterier, och kan vara såväl smalspektriga som bredspektriga. Eftersom de har delvis andra verkningsmekanismer och andra receptorer än antibiotika, kan de utgöra ett alternativ vid antibiotikaresistens.³²

Lipoteikoinisyra (LTA, sid 40) är en universell beståndsdel av grampositiva bakteriers cellväggar, men hittills är bara ett antibiotikum (daptomycin) känt som påverkar dess syntes, och bakterier har visat sig snabbt utveckla resistens mot detta. Efter screening av ett bibliotek av små molekyler för föreningar med aktivitet mot grampositiva men inte mot gramnegativa bakterier, har Richter m.fl.³³ funnit en LTA-hämmare (förening 1771) som blockerar ett av enzymen i LTA-biosyntesvägen. Föreningen har testats på möss infekterade med en annars letal dos av meticillinresistent *Staphylococcus aureus*. Testmössen överlevde då signifikant bättre än obehandlade möss. Föreningen verkar därför lovande för utveckling av behandlingar mot infektioner med grampositiva bakterier.

En likartad screening för molekyler som hämmade biofilmbildning hos mykobakterier ledde Wang m.fl. till en förening (TCA-1), som hade bakteriocid effekt mot *Mycobacterium tuberculosis*, oberoende av stammarnas känslighet för vanliga antituberkulosantibiotika (sid 206).³⁴ TCA-1 visade sig nedreglera enzym förknippade med etablerandet av persistens hos mykobakterierna, vilket leder till förhoppningen att detta ämne kan göra utvecklingen av nya antituberkulosmedel möjlig.

²⁶ Grant m.fl. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109:12147

²⁷ Wang m.fl. (2013) *J Biomol Struct Dyn* 31:729

²⁸ Ricci m.fl. (2012) *J Antimicrob Chemother* 67:589;

²⁹ Keren m.fl. (2013) *Science* 339:1213

³⁰ Liu och Imlay (2013) *Science* 339:1210

³¹ Kannan m.fl. (2013) *Cell* 151:508

³² Cotter m.fl. (2013) *Nature Rev Microbiol* 11:95

³³ Richter m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3531

³⁴ Wang m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E2510

Kapitel 10 Bränsle för en överbefolkad värld

Dagens biobränslen är till stor del baserade på växter som alternativt skulle kunnat utnyttjas till människoföda (exempelvis majs, raps, palmolja), eller produceras på jordar som alternativt skulle kunnat användas för odling av ätbara växter eller bevarande av viktiga biotoper och habitat. Biobränsle producerat av mikroorganismer är därför ett attraktivt alternativ som idag är föremål för omfattande forskning. Ett annat alternativ är människoföda producerad av mikroorganismer, vilket också skulle frigöra mark för andra ändamål.

Framför allt cyanobakterier, men också en del grönalger, rödalger och kiselalger, används för denna typ av försök eftersom de är fotoautotrofer som lever i vatten och därmed inte kräver vare sig åkerareal eller organiska kolföreningar. Dock kräver de förstås tillgång till övriga grundämnen, där framför allt fosfor idag är en begränsande faktor.

Ducat m.fl. beskrev nyligen genetisk modifiering av cyanobakterien *Synechococcus elongatus* så att denna producerar och exporterar massiva kvantiteter sukros.³⁵ Mängderna blir så stora (upp till 80 % av den totala biomassan; 36 mg sukros per liter kultur och timmes belysning) att sukros från denna cyanobakterie kan bli ett ekonomiskt lönsamt alternativ till sockerrör och sockerbetor, vilket då förstås skulle frigöra åkerareal för andra grödor. Ett intressant alternativ vore att använda den producerade sukrosen som energikälla för jäst, där stammar redan finns utvecklade som kan konvertera sukros till etanol med mer än 95 % utbyte; förbränningsmotorer för etanol finns ju redan tillgängliga.

Såväl svampar som alger och bakterier kan producera lipider som kan utvinnas som olja av liknande sammansättning som vegetabiliska oljor.³⁶ Svamparna och bakterierna i fråga är heterotrofer, men fototrofa grönalger kan producera olja utan att organiska kolföreningar behöver utnyttjas; dock behövs högre CO₂-halt än atmosfärens för effektiv oljeproduktion. Här finns en spännande möjlighet att kombinera minskning av koldioxidutsläpp med produktion av biobränsle: industriutsläpp av CO₂ kanaliseras till dammar med fototrofa grönalger som assimilerar koldioxiden till brännbar olja.³⁷

Howard m.fl. beskrev nyligen försök att gentekniskt modifiera de bränslemolekyler mikroorganismer kan producera för att i slutänden åstadkomma ett bränsle som strukturellt och kemiskt liknar dagens fossila bränslen (huvudsakligen *n*-alkaner, *iso*-alkaner och *n*-alkener med olika kedjelängd) och därmed minska kostnaderna för anpassning till dagens förbränningsmotorer efter produktionen.³⁸ De använde av praktiska orsaker *E. coli* som värd för de modifierade syntesvägarna, och fick inte särskilt bra utbyte, men arbetet visar ändå att sådana förändringar är genomförbara.

Även i en hypotetisk värld utan fossila bränslen finns det användning för flytande (eller gasformiga) bränslen, exempelvis för att buffra oregelbunden produktion av förnyelsebar energi och för att använda motordriven utrustning på platser utan elnät (inte minst fartyg och flygplan). Forskningsprojekt har därför startats för att undersöka om bakterier kan använda elektrisk ström som energikälla vid koldioxidassimilering.³⁹

³⁵ Ducat m.fl. (2013) *Appl Environm Microbiol* 78:2660

³⁶ Xu m.fl. (2012) *Biofuels Bioprod Bioref* 7:65

³⁷ Tang m.fl. (2011) *Bioresource Technol* 102:3071

³⁸ Howard m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:7636

³⁹ Conrado m.fl. (2013) I Lee (red.) *Adv Biofuels Bioprod*, Springer, pp 1037–1064

Detta är inte så världsfrämmande som det kanske låter; det är väl känt att bakterier kan använda elektroder som elektronmottagare vid respiratorisk energiutvinning (sid 62). En kort notis förra året⁴⁰ visar att konceptet är möjligt, men mycket återstår innan en storskalig teknik utvecklats.

Kapitel 11 Biofilm hos arkéer

Hur liknar och skiljer sig arkébiofilmer från bakteriella biofilmer (sid 92)? Orell m.fl. har nyligen sammanställt kunskapen om detta.⁴¹

Själva biofilmen verkar bildas på samma sätt som hos bakterier: arkéerna binder till en fast yta via arkeller (arkéflageller), pili och andra utskott, och utsöndrar makromolekyler som bildar en matrix som skyddar mikroorganismerna, ger bättre bindning till ytan och håller kvar vatten och extracellulära enzymer i biofilmen. Sammansättningen av denna matrix är fortfarande förhållandevis okänd, men polysackarider har påträffats i flera fall, liksom DNA. Senare kan biofilmarkéer brytas loss från biofilmmassan på samma sätt som bakterier och sprida sig till andra ställen. Biofilmer av arkéer har påträffats i bl.a. havsvattnet vid Antarktiskis, vattenflöden från högalpina glaciärer, surt vatten från gruvor och i alkaliskt sjövattnet. Liksom bakterierna verkar arkéerna bilda blandade biofilmer vilket ger möjligheter för symbios, exempelvis mellan metanotrofa euryarkéer och sulfatreducerande bakterier (sid 233). Metanogena arkéer ingår också i bakteriella biofilmer hos människan, företrädesvis i mag-tarmkanalen, munnen och slidan.

Liksom hos bakterier verkar det finnas ett samband mellan motilitet och förmåga att bilda biofilm; mutanter som förlorat motiliteten har försämrade förmåga att bilda biofilm. Kvorumreglering via signalmolekyler av typen AI-1 (hos bakterier involverade i artspecifik kommunikation), acylerade homoserinlaktoner, förekommer hos en del euryarkéer, såväl metanogener som halofiler. Signalmolekylerna är bäst studerade hos metanogenerna, där de till skillnad från hos bakterier är karboxylerade. Homoserinlaktoner är termolabila, och forskarna har inte funnit gener i termofila arkéers genom som kodar för enzymer i syntesvägen för homoserinlaktoner. Däremot producerar den termofila krenarkéen *Pyrococcus* en kvorumsignalmolekyl av typen AI-2 (hos bakterier involverade i kommunikation mellan arter, se texten om *V. cholerae* till kapitel 8), en borinnehållande furanon som är mer termostabil. Huruvida denna medverkar i reglering av biofilmbildning är dock ännu oklart.

Det är dock relativt få arkéer hos vilka AI-1-lik eller AI-2-lik signalmolekyler påträffats; de saknas t.ex. hos den mycket välstuderade och genomsekvenserade biofilmbildande krenarkéen *Sulfolobus*. Transkriptionsfaktorer i Lrs14-familjen har implicerats i reglering av *Sulfolobus* biofilmbildning, men det är oklart om någon kvorumreglering förekommer. Det verkar onekligen som om arkéernas repertoar när det gäller biofilmbildning är större än bakteriernas, och mycket spännande återstår att utforska.

Kapitel 12 Sexuell fortplantning hos *Penicillium*

Penicillium chrysogenum (sid 251) är den svamp som producerar penicillin. Trots att svampen studerats i mer än hundra års tid har forskare först nu kunnat beskriva dess sexuella fas.⁴²

⁴⁰ Li m.fl. (2012) *Science* 335:1596

⁴¹ Orell m.fl. (2013) *Annu Rev Microbiol* 67:337

Böhm m.fl. har via genomstudier funnit gener för parningstyperna (sid 239) MAT1-1 och MAT1-2 i genomet hos olika stammar av *Penicillium chrysogenum*, och med hjälp av denna information kunnat bestämma parningstyp hos tidigare kända svampstammar.⁴² Forskarna spred sedan stammar med olika parningstyp på ett fast medium innehållande havremjölsextrakt och biotin. På ytor där svampstammar med olika parningstyp kommit i kontakt med varandra var det sedan möjligt att isolera askosporer från bildade rekombinanter. Dessa gav upphov till svampar som visade på kombinationer av föräldrarnas egenskaper; evidens för att rekombination ägt rum.

Forskarna konstruerade med gentekniska metoder en deletant Δ MAT1, vilken som förväntat var steril och inte kunde producera rekombinanter tillsammans med en fertil MAT1-2-stam. Δ MAT1-stammen visade ändrat uttryck av ett stort antal mRNA-molekyler jämfört med stammar som uttryckte någon version av MAT1-genen. Närmare undersökningar visade att MAT1 förutom att reglera parningstypen också reglerar bildningen av penicillin och hyfstrukturen, som har betydelse för utvinningen av penicillin vid storskalig odling. Med kunskap om den sexuella fasen hos denna svamp är det nu möjligt att korsas in nya egenskaper på ett relativt enkelt sätt i de penicillinproducerande svampstammarna, t.ex. för att göra dem lättare att odla och optimera bildningen av penicillin.

Kapitel 13 Virus – våra "vänner" och "fiender"

Här beskrivs några nya exempel på hur virus kan ha såväl positiva som negativa effekter för människan. Se också texten om *Aedes aegypti*, *Wolbachia* och denguevirus till kapitel 8.

(i) *Spontan fagterapi*. Fagterapi brukar innebära att en patient behandlas med fager som kan angripa de infekterande bakterierna. Men fager verkar också vara en del av vårt vanliga försvar.

Slemhinnor (mukosa) är de viktigaste etableringsområdena för bakterier (sid 166). På slemhinnor hos många organismer är förhållandet mellan bakteriofager och bakterier fyra gånger högre än utanför slemhinnorna. Många fager i human slemhinna kodar för proteiner med domäner som liknar hypervariabla immunoglobuliner. Sådana är involverade i celladhesion hos många organismer. Hoc-proteinet (ett kapsidprotein) hos fagen T4 innehåller till exempel fyra sådana domäner. Barr m.fl. har nyligen visat att Hoc-proteinet gör det möjligt för fagen att binda selektivt till glykoproteiner i slemmet.⁴³ Det är viktigt att poängtera att denna bindning alltså sker via kapsiden, medan fagerna binder till sina värd bakterier med svansfibrer som är lokaliserade i deras motsatta ände. Bindningen till mukuset förbättrar möjligheterna för fagerna att interagera med bakterier som fastnar i slemmet. När forskarna jämförde slemhinna med respektive utan fager i slemmet fann de att slemhinna med bundna fager innehöll färre bakterier, och dessutom förekom det mindre celledöd i själva slemhinnan. Fagerna verkar alltså ha skapat ett "antimikrobiellt lager" utanpå slemhinnan som reducerar bakteriekolonisationen där och skyddar underliggande vävnad från infektioner. Framtida forskning får visa hur detta eventuellt kan utnyttjas i fagterapeutiska sammanhang.

⁴² Böhm m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:1476

⁴³ Barr m.fl. (2013) *Proc. Natl Acad Sci USA* 110:10771

(ii) *Nytt coronavirus*. Virus evolverar snabbt, och nya former uppkommer ständigt. I 2012 års uppdatering beskrevs nya influensavirus. 2013 har sett ett nytt coronavirus (sid 275) sprida sig.

I juni 2012 drabbades en man i Saudiarabien av lunginflammation, som så småningom kunde karakteriseras som orsakad av ett nytt coronavirus.⁴⁴ Mannen avled knappt två veckor senare. Fram till juli 2013 har ca 80 fall konstaterats infekterade med det nya viruset (varav ungefär hälften lett till dödsfall), alla med kopplingar till arabstaterna.⁴⁵ Det nya viruset (först kallat HCoV-EMC) har nu fått beteckningen MERS (egentligen MERS-CoV; Middle East respiratory syndrome coronavirus).⁴⁶ Det är nära besläktat med ett coronavirus som isolerats från fladdermöss.

Raj m.fl.⁴⁷ har identifierat den receptor som viruset utnyttjar vid infektionen. COS-7-celler (en cellinje med ursprung i apnjurvävnad) är okänsliga för MERS men blir känsliga om mänskligt DPP4 (dipeptidylpeptidas 4; ett välkänt receptorprotein på mänskliga celler) eller DPP4 från fladdermus uttrycks i dem. Detta visar att DPP4 är receptor för viruset. Utskott på virusytan binder DPP4. DPP4 finns hos många däggdjur, förutom fladdermöss och människor också andra primater och tamdjur. Hos människor uttrycks proteinet i djupt liggande lungvävnad på ungefär samma ställen som den receptor som SARS-viruset utnyttjar. Detta kan förklara varför MERS ger allvarliga lunginfektioner. Antikroppar mot DPP4 hindrade bindning av MERS till mänskliga bronkialceller.

Samma virus kan alltså infektera både människor och fladdermöss, men hur är det med andra djurs känslighet och vilken är virusets naturliga värd? Detta behöver utredas för att klarlägga risken för spridning från djur till människa. Hur vanlig är infektionen hos människa? Studier av utbrotten i Mellanöstern har visat att viruset kan spridas från människa till människa.⁴⁸ Finns det personer som har antikroppar mot viruset men inte uppvisat sjukdomssymtom? Om så är fallet kan infektionen vara mera spridd än man hittills känt till. Man behöver också starta arbete med att utveckla botemedel som antivirala läkemedel och vaccin mot infektionen. En möjlighet skulle därvid kunna vara att försöka minska uttrycket av DPP4 hos människor eller hitta en hämmare som kan binda till virusutskottet.

⁴⁴ Zaki m.fl. (2012) *New England J Med* 367:1814

⁴⁵ Perlman (2013) *New England J Med* 369:466

⁴⁶ deGroot m.fl. (2013) *J Virol* 87:7790

⁴⁷ Raj m.fl. (2013) *Nature* 495:251

⁴⁸ Assiri m.fl. (2013) *New England J Med* 369:407