



Mikrobiologer ser bakterier i kortene

Morten Harmsen, Claus Sternberg, Janus A. Juul Haagenen, Anders Folkesson, Anne Louise Viborg Frost, Søren Molin, Institut for Systembiologi

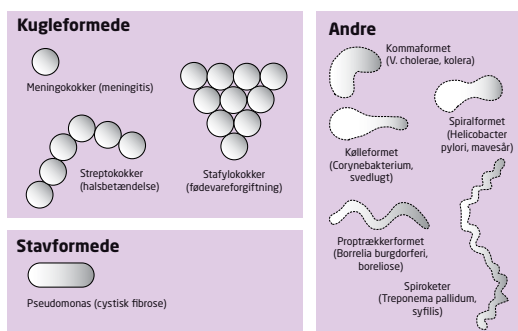
Siden Alexander Fleming opdagede penicillin og dermed de moderne antibiotika, har vi troet, at dødelige infektioner tilhørte historien. Men en udbredt brug af antibiotika har ført til fremkomsten af mange antibiotikaresistente bakterier. Bakterierne beskytter sig blandt andet mod medicinen ved at klumpe sig sammen i slimede biofilm, som især er et stort problem på hospitalerne og hos patienter med kroniske infektioner. For at kunne bekæmpe biofilm må forskerne vide mere om, hvorfor og hvordan filmen dannes. Ny viden inden for mikrobiologien og udviklingen af nanoteknologiske mikroskoper hjælper forskerne i kampen mod de ubehagelige og sygdomsfremkaldende bakterier.

Det første liv, der opstod på jorden for mere end 3 milliarder år siden, har formentlig lignet de organismer, vi i dag kalder bakterier. Vi kan også være temmelig sikre på, at det sidste liv, der vil findes på vores klode, når alt andet er forsvundet på grund af klimaændringer, meteorer og forurening, også vil være bakterier. Resten af jordens organismer har derfor altid måttet leve sammen med disse primitive væsener på godt og ondt. Bakterier findes overalt på jordkloden, selv i de mest ugæstfrie områder som ved varme kilder (*figur 1*), på havbunden, i det saltrige røde hav og ved de iskolde poler. Derfor er det heller ikke overraskende, at antallet af bakterier er langt større end nogen anden type organisme – det anslås, at der findes 5×10^{30} bakterier på jorden! Til sammenligning er vi blot 6,6 milliarder mennesker, altså $6,6 \times 10^9$.



Figur 1. Bakterier findes overalt på jorden. Til venstre ses en kogende varm kilde. De smukke farver stammer fra termofile ('varmeelskende') bakterier, der laver fotosyntese om dagen og fikserer nitrogen om natten. De lyserøde striber i gejseren på billedet til højre er kemotrofe bakterier, der får energi fra de kemikalier (sulfider), som de spiser.

Bakterier kan have mange udformninger, men er oftest stavformede eller kugleformede. På figur 2 ses nogle forskellige bakterieformer. De fleste stavformede bakterier har en størrelse på omkring 1 mikrometer ($1 \mu\text{m} = 1/1000 \text{ mm}$) i tværsnit og er et par μm lange. En terning, der har sidelængden 1 mm, vil således rumme omkring 500 millioner celler, hvis de ligger tættest muligt. Ofte er tætheden dog noget lavere – for eksempel indeholder et gram muldjord omkring 40 millioner bakterier.



Figur 2. Bakterier kan have mange udformninger. På billedet ses eksempler på forskellige former. I parentes er angivet eksempler på bakterier og sygdomme, som de fremkalder.

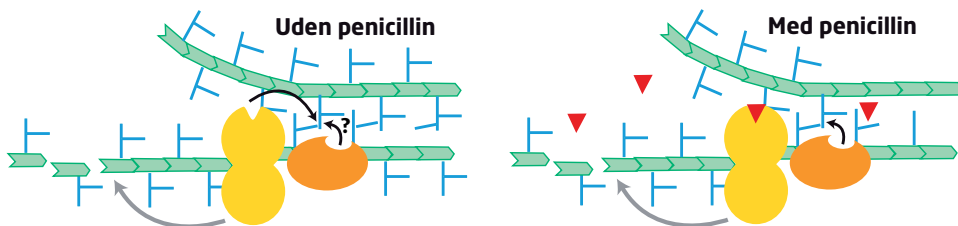
Enkeltvis er bakterier altså objekter i nanoskala, og hvis man vil studere dem som individer, er man derfor nødt til at anvende nanoteknologiske metoder. Dette gælder i endnu højere grad, hvis man vil have information om den enkelte bakteriecelles byggesten, som i realiteten ofte er enkelte proteiner eller molekylære overfladestrukturer. Hidtil har dette været temmelig vanskeligt, og man har derfor været henvist til at undersøge mange celler på en gang, men i de seneste år er det ved hjælp af forskellige nanoteknologiske værktøjer, såsom Atomic Force Mikroskopi og elektronmikroskopi (kapitel 2) blevet muligt at observere et utal af detaljer vedrørende bakteriers levevis. At se bakterier efter i kortene

er blevet en ny udfordring med meget lovende perspektiver for at forstå disse på en gang primitive og dog komplekse organismers livsudfoldelser. I dette kapitel fortæller vi om, hvordan visse bakterier takket være deres særlige levevis og deres evne til at modstå antibiotikabehandling kan blive alvorlige trusler for os mennesker. Takket være ny viden og nye teknikker er der dog gode muligheder for, at vi kan løse en del af disse problemer.

Kampen vi ikke kan vinde

De fleste mennesker bliver i løbet af livet ramt af en infektionssygdom, der kræver behandling med antibiotika, og vi tager det for givet, at vi bliver behandlet og helbredt. Men sådan har det ikke altid været. Det er faktisk kun inden for de seneste 60 år, at antallet af mennesker, som dør af bakterielle infektioner, har været faldende.

Antibiotika er naturlige stoffer produceret af mikroorganismer, der bruger dem som kemiske våben mod konkurrerende mikroorganismer. Antibiotika har sammen med vaccinationer været et af det tyvende århundredes store opdagelser og har været med til at øge middelalderen med 20 år i de industrialiserede lande. Mange har den opfattelse, at bakterielle infektioner i dag er ufarlige og noget, som vi nemt behandler, men i de seneste år er lægerne stødt på et voksende antal modstandsdygtige bakterier. I det følgende afsnit forklarer vi, hvorfor dette sker, og gennemgår de mekanismer, som gør bakterierne modstandsdygtige.



Figur 3. Penicillins virkning. Uden penicillin ▼ samarbejder det gule og orange proteinkompleks om at danne cellevæggen. Penicillin blokerer dannelse af ny cellevæg ved at ændre formen på det gule protein.

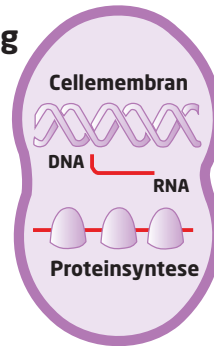
Hvordan virker antibiotika?

Antibiotika virker ved at hæmme specifikke biokemiske processer i bakterier. Deres virkningsmekanismer kan inddeles i fire kategorier: Blokering af dannelse af cellevæg (figur 3), hæmning af nukleinsyresyntesen – det vil sige dannelsen af ny DNA og RNA – hæmning af proteinsyntesen samt dannelsen af folinsyre. Folinsyre, der er et vitamin, er nødvendig for bakteriernes evne til at danne nye celler (figur 4).

Da de biokemiske processer, der hæmmes, kun findes i bakterierne, er antibiotika mere eller mindre uskadelige for mennesker. Som man kan se af denne korte beskrivelse af antibiotika, ser det ud til, at vi har mange effektive våben mod infektioner af bakterier.

Figur 4. Oversigt over biokemiske processer, som antibiotika hæmmer. Til venstre ses de biokemiske processer i cellen. Til højre ses, hvilke antibiotika der påvirker hvilke biokemiske processer.

Cellevæg



Cellevæg dannelse:

Penicillin
Cephalosporin
Carbapenem
Daptomycin
Glycopeptider

Dannelse af arvemasse (DNA):

Fluorokinoloner

Dannelse af RNA og protein:

Rifampin
Makrolider
Klorafenikol
Tetracyclin
Aminoglycosider

Dannelse af Folsyre:

Sulfonamider
Trimethoprim

Bakterierne slår igen

Kort efter at penicillin var blevet kendt og alment benyttet i 1950'erne, dukkede der flere gådefulde sygdomstilfælde op, hvor behandlingen med dette antibiotikum ikke virkede. Man opdagede, at *Staphylococcus aureus* (stafylokokker) ikke var følsomme over for penicillin. Resultatet var, at en epidemi spredtes på hospitaler over hele verden. Hvordan kunne dette ske?

Naturlig udvælgelse er nøglen til, hvordan bakterier hurtigt tilpasser sig nye betingelser. Bakterier formerer sig hurtigt og gennemgår derfor mange cellegenerationer hver dag. I nogle celler opstår der små forandringer (mutationer) i deres arvemasse. Hvis en sådan mutation forandrer den biokemiske reaktionsvej, som et antibiotikum hæmmer, kan det bevirke, at bakterien bliver modstandsdygtig. Hvis bakteriekolonien efterfølgende udsættes for antibiotika, får de forandrede celler i kolonien en fordel sammenlignet med de oprindelige celler – de kan formere sig videre trods tilstedeværelsen af antibiotikum i modsætning til alle de mange ikke-muterede celler (figur 5). Den naturlige udvælgelse vil hurtigt få den forandrede bakterie til at sprede sig. Det paradoksale er altså, at vi har brug for antibiotika for at helbrede infektionssygdomme, men jo mere de bruges, desto flere muterede og resistente bakterier opstår der.

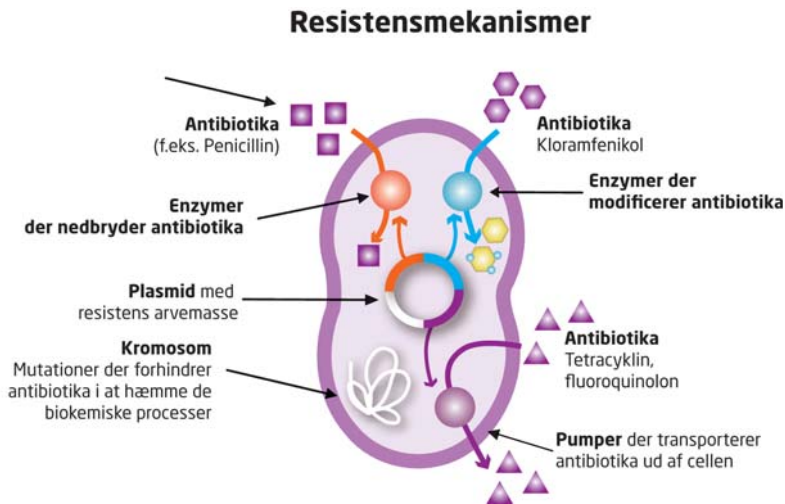


Figur 5. Undersøgelse af antibiotikaresistens. Baktierers antibiotikaresistens kan undersøges ved at tilsætte antibiotika til et vækstmedie (agar). Kun bakterier med resistens over for det tilsatte antibiotikum, vokser. På billedet er de hvide pletter bakteriekolonier med antibiotikaresistens.

Forskellige typer resistens

Den eksakte mekanisme for, hvordan en bakterie mister sin følsomhed over for antibiotika, afhænger af hvilken bakterie og antibiotika, der benyttes. Ofte forandrer mutationer i bakteriens gener den biokemiske proces, som antibiotikumet hæmmer, og derved mister det sin virkning, men der findes også andre veje til udvikling af antibiotikaresistens.

For eksempel kan cellemembranen forandre sig, så den bliver mindre gennemtrængelig for antibiotika. Dette sker ofte samtidigt med, at bakterien producerer molekulære pumper, der hurtigt kan pumpe antibiotika ud af cellen. Bakterierne kan også danne enzymer, der enten nedbryder antibiotikummet eller ændrer det, så det ikke virker (*figur 6*). Modstandsdygtige bakterier kan give deres resistens videre til andre bakterier ved at sprede de gener, som koder for enzymerne. På den måde opstår der lynhurtigt en omfattende modstandsdygtighed i en bakteriekoloni. Endelig er der en ny resistensmekanisme, som vi først i de seneste år har fået øjnene op for: Bakterier kan opnå midlertidig resistens ved at leve i multicelle-samfund – i de såkaldte biofilm.



Figur 6. Resistensmekanismer. Skematisk tegning af de forandringer, der kan opstå i bakterier, og som gør dem resistente over for antibiotika.

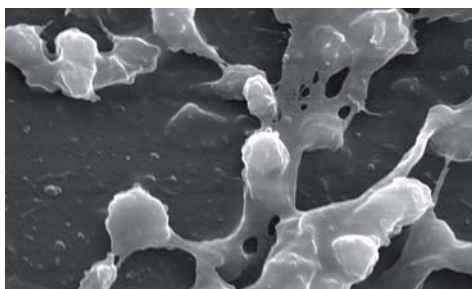
Biofilm

I mange år troede både forskere og læger, at bakterier udelukkende levede som enkeltceller, uafhængige af hinanden. Imidlertid opdagede man, at bakterier beskytter sig selv imod mange ubehagelige påvirkninger udefra ved at klumpe sig sammen. Bakterier, der lever på denne måde, danner en såkaldt biofilm – altså klumper af bakterier i en tynd slimet film. Eksempler på biofilm fra hverdagen er belægninger eller slimede overflader på tænder, fordærvede madvarer, akvarier, vandlåse, badebroer og på bunden af skibe (*figur 7*). Bakterier er en uundgåelig og livsnødvendig del af vores krop. For hver menneskecelle er der 10 bakterier eller ca. 1 kg i alt, hvis man kunne tage dem alle ud af kroppen og veje dem. Størstedelen af disse bakterier findes på huden eller i fordøjelseskanalen, fortrinsvis i tyktarmen, hvor de er med til at nedbryde kostfibre og holder andre skadelige bakterier borte. Men også resten af kroppen er beboet af bakterier, for eksempel i næse og svælg, på tænderne og alle andre steder, hvor der er lunt og fugtigt. Som regel er bakterierne klumpet sammen i biofilm og helt uskadelige eller som beskrevet ligefrem gavnlige.



Figur 7. Biofilm vokser alle vegne, hvor der er fugtigt og lunt, som i vandlåsen under køkkenvasken (venstre) og i akvarier (midten). De er samtidig et alvorligt problem hos patienter med eksempelvis indopererede katetre. På billedet yderst til højre, ses et kateter udtaget fra bugspytkirtlen. Patienten døde af blodforgiftning forårsaget af biofilmbakterierne.

Desværre er bakterier ikke altid ufarlige. Vi kan stadig rammes af infektionssygdomme, og især biofilminfektioner er et stort problem. Bakterier er op til tusind gange bedre beskyttet, når de sidder i en biofilm, og er derfor svære at udrydde med antibiotika. De modstandsdygtige biofilm finder man blandt andet hos patienter med kroniske sår, langvarige lungeinfektioner og hos patienter med implantater, for eksempel hjerteklapper og katetre (figur 7). De ansvarlige bakterier – for eksempel *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* og stafylokokker (figur 8) – er meget svære at udrydde, da bakterier i biofilm som sagt er godt beskyttet både mod antibiotika og også mod kroppens eget immunforsvar.



Figur 8. Biofilm med stafylokokker (elektronmikroskop).

De senere års nye viden om bakteriers antibiotikaresistens i forbindelse med biofilm har stimuleret interessen for at forstå, hvad der er så specielt ved at vokse i en biofilm. I det følgende afsnit kan du læse om det alvorlige problem med biofilm i lungerne hos patienter med cystisk fibrose, og om hvordan forståelsen af biofilmdannelsen hjælper lægerne med at behandle patienterne.

***Pseudomonas aeruginosa*, den klatrende bakterie**

Pseudomonas aeruginosa (figur 9) er en bakterie, der har fået stor opmærksomhed blandt forskere i hele verden. Bakterien er blandt andet kendt for sin rolle i udvikling af biofilm i lungerne hos patienter med den arvelige sygdom *cystisk fibrose*. Det slimlag, som normalt dækker cellerne i luftvejene og er med til at rense lungerne, er hos patienter med cystisk fibrose meget sejt og tykflydende. Patienterne har svært ved at hoste det tykke slim op, som derfor er et ideelt sted for *Pseudomonas*-bakterier, der uforstyrret kan kolonisere slimhinderne og danne biofilm.



Figur 9. *Pseudomonas aeruginosa* (brune) (elektronmikroskop).

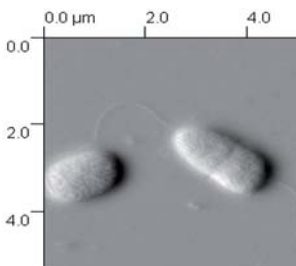
Kroppens kamp for at fjerne bakterierne medfører et konstant bombardement fra immunforsvaret på de inficerende bakterier. Desværre beskytter biofilmen bakterierne imod disse angreb, og da de i høj grad også er modstandsdygtige over for antibiotikabehandling, har de gode chancer for at blive i lungerne. Resultatet er, at lungevævet gradvist bliver nedbrudt på grund af immunforsvarets kamp mod bakterierne. Efter nogle år vil enden til at optage ilt i lungerne være kraftigt nedsat, og det medfører både nedsat livskvalitet og oftest en tidlig død.

Dannelsen af en biofilm

P. aeruginosa lever som to forskellige typer celler, når den etablerer sig som biofilm i laboratoriet, nemlig en bevægelig og en ikke-bevægelig celletype. Netop samspillet mellem disse to typer af celler har stor betydning for, hvordan *P. aeruginosa* biofilmen udvikler sig.

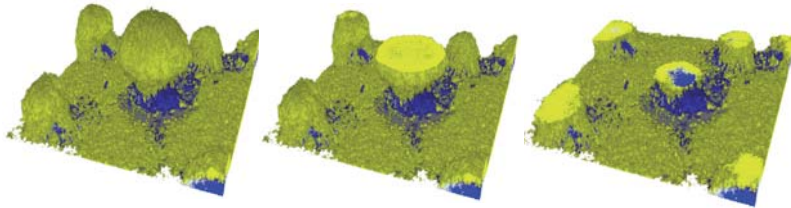
Dannelsen af biofilm sker i flere faser: Når en væske strømmer over en overflade, binder molekyler fra væsken sig til overfladen og danner derved en 'kemisk film'. Da den kemiske film ofte består af stoffer, som bakterier kan udnytte som fødekilde eller som 'klæbemolekyler', tiltrækker og binder den kemiske film bakterier fra væsken. I første omgang binder bakteriecellerne sig kun løst til overfladen, men på et tidspunkt binder de sig permanent. De celler, der nu sidder fast, deler sig og danner ganske små kolonier bestående af op til tusindvis af ubevægelige celler. Mikrokolonierne udvikler sig så længe, der er næring i det omgivende miljø.

Andre celler på overfladen bevæger sig rundt, idet de har nogle meget tynde 'nanohår' på celleoverfladen kaldet flageller, der gør dem i stand til at 'kravle' (figur 10). Efter et stykke tid er hele overfladen dækket.



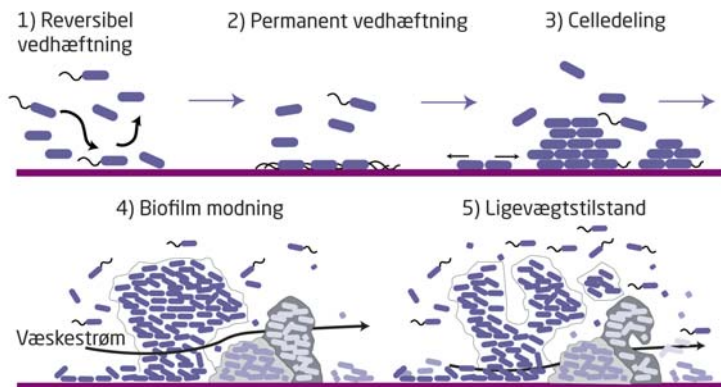
Figur 10. *P. aeruginosa*-bakterier med flageller.

På et tidspunkt begynder den bevægelige population at kravle op oven på mikrokolonierne af ikke-bevægelige bakterier. Til sidst ses den modne biofilm, som nu består af paddehattelignende mikrokolonier med en stilk af den ikke-bevægelige celletype og oven på en hat af den bevægelige cellepopulation (figur 11). Imellem paddehattene dannes der et net af kanaler, som tilfører bakterierne næring og ilt.



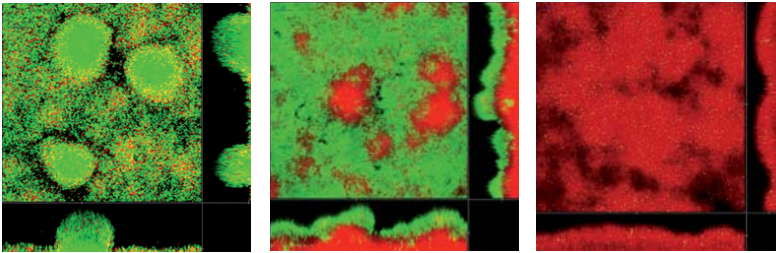
Figur 11. Dannelsen af paddehattelignende strukturer i biofilmen. De blå områder er ikke-bevægelige bakterier, som de bevægelige (gule) bakterier kravler op oven på, formentlig fordi der er flere næringsstoffer og ilt på toppen.

Grunden til, at de bevægelige celler klatrer op på toppen af de dannede mikrokolonier, er sandsynligvis, at de her har bedre levevilkår end nede i bunden af biofilmen, da der er en højere koncentration af ilt og næringsstoffer på toppen. Når paddehatten er fuldt udviklet, løsriver enkelte celler eller hele områder af biofilmen sig, formentlig på grund af lokale områder med manglende ilt eller næringsstoffer. De løsrevne celler etablerer sig og danner nye biofilm andre steder. Hele processen er beskrevet skematisk i figur 12.



Figur 12. De fem stadier i biofilmdannelsen. Bakterierne starter med at binde sig løst til overfladen (trin 1), men på et tidspunkt ændrer de deres vedhæftning til at blive permanent (trin 2). Samtidig med vedhæftningen deler cellerne sig, og klumpen af bakterier vokser (trin 3) og modnes til en fuldt udviklet struktur (trin 4). Til sidst opnås ligevægtstilstand mellem voksende bakterier, de, der sætter sig fast, og de der slipper taget i biofilmstrukturen (trin 5).

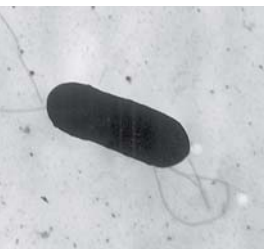
Forsøg har vist, at det med en behandling, der kombinerer to antibiotika, faktisk er muligt at ramme både den centrale del af paddehatten, altså stilken, og selve paddehatten. Forklaringen er, at nogle antibiotika virker på langsomt voksende celler, som findes i stilken, mens andre er effektive mod aktivt og hurtigt voksende celler, som sidder i toppen af paddehatten. Opdagelsen af, at antibiotika-cocktails er meget effektive mod biofilm (figur 13), er således et godt eksempel på, at de grundlæggende undersøgelser af biofilm i laboratoriet er vigtige for at give os nye våben til bekæmpelse af alvorlige infektioner. Der er dog desværre altid nogle enkelte celler, der overlever kombinationsbehandlingen, enten fordi de er resistente, eller fordi de ikke befinder sig i nærheden af de kanaler, hvorigennem medicinen bliver transporteret. Efter antibiotikabehandlingen vil de overlevende bakterier kunne danne en ny biofilm, hvilket desværre betyder, at en patient aldrig slipper helt af med infektionen. Derfor er det også så vigtigt at blive ved med at studere bakterier i biofilm, så vi kan lære mere om mekanismerne.



Figur 13. Kombinationsbehandling. Det kan være nødvendigt at kombinere flere typer antibiotika for at slå alle bakterierne i en biofilm ihjel. Antibiotikas virkning undersøges med 'Live-dead' farvning, hvor cellerne farves med to fluorescerende farvestoffer. Grønt binder til DNA i alle celler, mens rødt kun farver døde celler. Således kan man skelne mellem døde (røde) og levende (grønne) celler. Til venstre ses en behandling med ciprofloxacin, hvor kun få celler er døde (røde). I midten ses en behandling med colistin, hvor cellerne i de nederste lag i biofilmen er døde. En kombinationsbehandling med de to antibiotika (til højre) slår alle celler ihjel.

Bakterieinfektioner under luppen

Når man studerer bakterier i biofilm, kræver det helt andre metoder, end når bakterierne svømmer frit rundt i en suppe af næringsstoffer. Som tidligere nævnt er bakterieceller i en biofilm mere modstandsdygtige over for antibiotika end celler, der svømmer rundt i væske. Samtidig reagerer cellerne i en biofilm også forskelligt på antibiotikabehandlingen, som beskrevet ovenfor. Ved at anvende forskellige fluorescerende farvestoffer er det muligt at se i et mikroskop, hvilke bakterier, der er blevet slået ihjel af behandlingen, og hvilke der stadig er levende (figur 13). Metoden kan bruges til at afgøre, hvor i biofilmen et antibiotikum virker, og hvis man sammenligner sådanne observationer med andre undersøgelser af cellernes opførsel, kan man finde ud af, hvorfor så mange bakterier i en biofilm ikke er følsomme over for antibiotika. I det følgende afsnit beskrives det, hvordan forskerne ved hjælp af mikroskopi og farvningsmetoder har afsløret, hvordan den farlige bakterie *Listeria monocytogenes* danner biofilm.



Listeria monocytogenes – når bakterier går i døden for hinanden

Listeria monocytogenes er en lille, men meget hårdfør organisme. Bakterien er udbredt i naturen, men findes også i mange fødevarer, hvor den er årsagen til alvorlige madforgiftninger. *Listeria* findes primært i oste- og mælkeprodukter, men også i andre typer af fødevarer som eksempelvis leverpostej, kødpålæg og fisk. Endelig findes den i tarmen hos 10 % af befolkningen.

Listeria monocytogenes er en hårdfør bakterie, der:

- vokser ved temperaturer mellem 1 og 45° C og derfor også på køl
- vokser ved høje saltkoncentrationer
- vokser med og uden tilstedeværelse af ilt
- tåler udtørring og frysning

Kilde: Danmarks Fiskeriundersøgelser

Bakterien forårsager Listeriose, som er en alvorlig sygdom, der især rammer ældre og personer med nedsat immunforsvar, som har spist fødevarer med et højt indhold af bakterien.

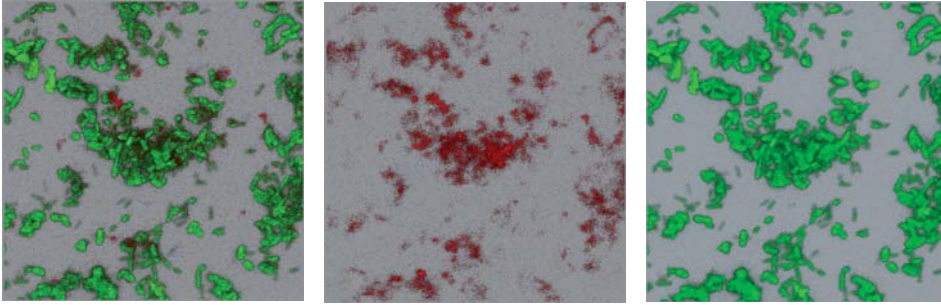
Bakterien vokser gerne i mad, der indeholder meget salt, men mere problematisk er det, at bakterien også vokser ved køleskabstemperatur til forskel fra mange andre bakterier. Dens ultimative forsvarsmekanisme er dog nok, at den bliver siddende fast på overflader, selv under rengøring. Det skyldes formentlig, at den ud over at kunne klistre til overflader, også kan klistre til andre nabobakterier: Den danner altså biofilm og øger derved sin forsvarsevne.

Overførslen af *Listeria* sker ved dårlig hygiejne i forbindelse med fremstilling eller tilberedning af madvarer. Der er heldigvis ikke mange tilfælde af infektioner med *Listeria* om året, men til gengæld kan konsekvenserne ved smitte være meget alvorlige, da man kan udvikle blodforgiftning eller meningitis, og gravide kvinder risikerer at abortere. Op til 30 % af infektionerne har dødelig udgang. I de senere år er der i gennemsnit registreret 40 tilfælde af smitte om året her i Danmark, men desværre ser det ud til, at antallet af tilfælde er stigende, og i 2006 blev der registreret 53 tilfælde.

For at bekæmpe *Listeria monocytogenes* er forskerne nødt til at opklare, hvordan bakterierne sidder fast på overflader og danner de stærke bindinger til hinanden. Når man ved mere om dette, kan man måske finde metoder til at opløse biofilmen og dermed gøre bakterierne sårbare over for rengøring.

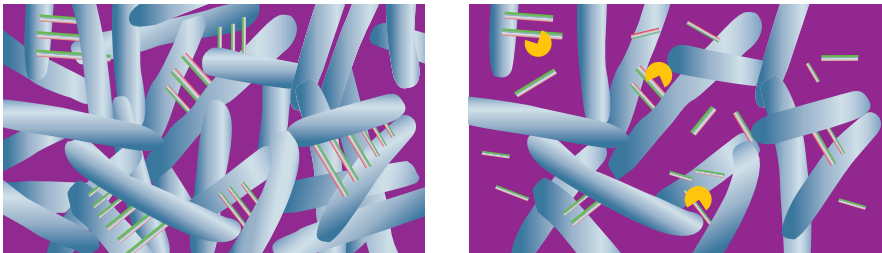
Fra andre bakterier ved man, at det normalt er sukkerstoffer, proteiner og DNA, der udgør det skelet, som holder sammen på biofilm. DNA klistrer godt til overflader, men det kan også klistre godt til bakterieceller og er derfor en vigtig bestanddel af biofilmen. Ved at fjerne DNA eller nogle af de andre molekyler er det muligt, at man kan ødelægge strukturen i filmen så meget, at bakterierne helt slipper taget i hinanden.

Ved hjælp af mikroskopi og farvningsmetoder kan man se, at der er DNA i *Listeria*-biofilmen (figur 14). Men hvor kommer dette DNA fra? Ved sammenligning af DNA fra biofilm med DNA isoleret direkte fra bakterierne kan vi se, at biofilmens DNA kommer fra døde *Listeria*celler.



Figur 14. DNA i biofilm. Bakterierne i en *Listeria*-biofilm holdes sammen af et netværk af celler og DNA. På billedet til venstre ses, hvordan DNA (rødt) ligger koncentreret mellem bakterierne (grønne). Billederne i midten og til højre viser henholdsvis DNA og celler hver for sig.

For at fjerne DNA må man anvende enzymet DNase, som klipper DNA i stykker. Når enzymet tilsættes en biofilm af *Listeria*celler, bliver denne straks opløst, og bakterierne bliver løsrevet fra overfladen (figur 15). De døde bakteriers DNA stabiliserer altså biofilmen, og man kan derfor sige, at nogle af bakterierne må dø, for at andre kan klistre sammen til en biofilm.



Figur 15. DNases virkning. Til venstre ses en *Listeria*-biofilm bestående af celler og DNA, som begge klistrer til overfladen. Til højre ses DNases virkning (det gule protein) på biofilmen. Enzymet klipper DNA-strengene i stykker, hvorefter strukturen i biofilmen opløses og cellerne slipper taget i hinanden og overfladen.

Det ser således ud til, at der ved hjælp af enzymet DNase er fundet en løsning på problemet med biofilm i fødevarerindustrien. Forhåbentlig vil metoden i fremtiden forhindre forurening af fødevarer med denne bakterie.

Atomic Force Mikroskopi til biologiske undersøgelser

For mange infektionssygdomme eksisterer der stadig en lang række spørgsmål som ikke er opklarede endnu. Når mikrobiologiske forskere vil se inficerende bakterier i kortene, er det ofte som at søge i blinde, blandt andet fordi bakterier er så små, at man kun lige kan skimte den enkelte bakterie i et lysmikroskop. Både med et almindeligt lysmikroskop

og med fluorescensmikroskopet er det desuden svært at lave skarpe billeder af prøver, der består af flere lag som eksempelvis en biofilm. I stedet bruger forskerne et konfokalmikroskop, der udelukker lys fra lag, som ikke er i fokus. Det betyder, at man kan analysere en prøve lagvis og bagefter rekonstruere dens tredimensionelle struktur. Men også konfokalmikroskopet er begrænset af bakteriernes ringe størrelse. I stedet har *elektronmikroskopet (kapitel 2)* i en årrække været et værdifuldt instrument til at studere den enkelte bakterie tættere på, men ulempen ved at bruge det er, at man kun kan undersøge kemisk behandlede – og derfor døde – celler. Hvis man vil se meget små detaljer hos en bakteriecelle, for eksempel på cellens overflade, og bakterien samtidig skal være levende, er der behov for helt nye instrumenter. Her kommer nanoteknologien os heldigvis til hjælp.

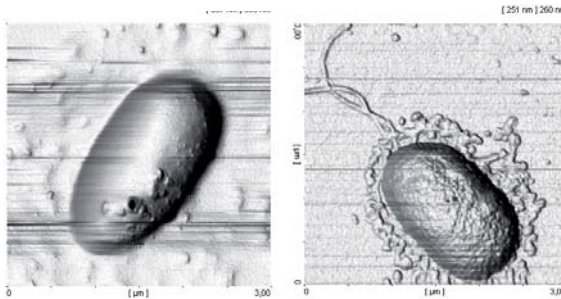
Atomic Force Mikroskopet (AFM) (kapitel 2 og figur 16) er udviklet til analyse af overflader helt ned til atomar skala, det vil sige, at man i princippet kan adskille og se enkelte atomer. Metoden var tænkt til analyse af uorganiske materialer så som silicium til brug i computerchips. I dag er det imidlertid muligt at bruge AFM til at undersøge biologiske materialer, hvilket har åbnet mikrobiologernes øjne for mikroskopet. Med et AFM kan man se selv de mindste nanostrukturer på bakteriernes overflader (*figur 17*). Uheldigvis fungerer AFM – ligesom elektronmikroskopet – bedst på indtørrede præparater, hvilket betyder, at bakterierne dør og således også mister deres oprindelige overfladestruktur.



Figur 16. Atomic Force Mikroskop. Prøven lægges ned i midten af apparatet. Billedet øverst til højre viser mikroskopet vendt om – nålen (ikke synlig) befinder sig for enden af en lille siliciumbjælke, der er monteret i midten

af den guldbelagte holder.

Metoden med at indtørre bakterierne kan dog stadig anvendes til mange formål. For eksempel kan man undersøge overfladen af bakterier behandlet med antibiotika. Ved at sammenligne resultatet med en prøve af ubehandlede bakterier kan man finde de ændringer, som skyldes antibiotikummet. Således er effekten af det antimikrobielle peptid Colistin blevet undersøgt på bakterien *Pseudomonas aeruginosa*. Efter få minutter kan man se effekten af Colistin som huller i bakterien og delvis opløsning af cellens overflade (figur 17).



Figur 17. AFM billeder af *Pseudomonas aeruginosa*. På billedet til venstre kan man se en bakterie, der er blevet gennemhullet af Colistin. Til højre ses en celle udsat for samme behandling, hvor cellemateriale rundt om bakterien er indtørret.

Helt optimalt ville det dog være, hvis man kunne se på bakterierne i live, hvorfor vi bliver nødt til at finde metoder til at studere cellerne i væske. Det store problem er, at bakterierne skal ligge helt fast på overfladen, da AFM-nålen på grund af sin fysiske kontakt med prøven ellers skubber til bakterierne. Som nævnt i afsnittet om biofilm sætter bakterierne sig naturligt fast på mange overflader, men denne naturlige binding er ikke stærk nok til at modstå de kræfter, som nålen påvirker cellerne med. Derfor må der tages forskellige kemiske metoder i brug, der udnytter, at bakterierne, som har en negativt ladet overflade, binder sig til en positivt ladet overflade samt kan danne bindinger mellem molekyler på celleoverfladen og en kemisk behandlet glasoverflade, for eksempel en tynd film af gelatine.

Som olie i vand

Når bakterierne befinder sig i en væske, er deres overflade meget blød og kan nærmest sammenlignes med en dråbe olie i vand. Det er derfor en stor udfordring at bruge AFM på bakterier i væske, selvom de er sat fast på en overflade. En af de vigtigste faktorer for at kunne tage AFM-billeder af bakterier i væske er, at den arm, som nålen sidder på, skal være meget blød. Ellers er der risiko for, at bakterierne skræbes fri fra overfladen, eller at cellemateriale rives af cellen og giver et forkert indtryk af cellens form. Desuden må nålen kun lige røre bakterien, igen for at undgå at ødelægge cellen. Det betyder alt sammen, at nålen har svært ved at holde sig på overfladen af bakterien og at AFM metoden derfor ofte er ustabil. Når forskerne alligevel bruger den, skyldes det, at metoden giver en masse værdifuld information om, hvordan bakterier binder sig til overflader og danner biofilm. Hvis man sætter bakterierne fast på AFM-nålen, og fører den ned mod en overflade, vil bakterierne af sig selv begynde at sætte sig fast på overfladen. Når man efter et stykke tid

prøver at trække nålen væk fra overfladen, holder bakterierne fast i både overfladen og AFM-armen, så den bøjer. Den kraft, der skal til for at rive nålen løs, aflæses og bruges som et mål for bakteriens evne til at binde sig til en overflade. Med denne metode kan man både undersøge, hvad det er, der får bakterierne til at sætte sig fast, og sammenligne forskellige overfladers tilbøjelighed til at danne biofilm.

AFM blev ikke udviklet for at undersøge biologiske fænomener, men endnu engang viser historien, at store gennembrud kan komme fra de mest uventede kanter. Mange andre nanoteknologiske opfindelser og metoder kan som AFM bruges til biologiske undersøgelser. For eksempel kan nanopartikler med vedhæftede sensormolekyler bruges til at måle iltkoncentrationer og pH. Det er derfor ikke mærkeligt, at biologer oftere og oftere henvender sig til fysikere og kemikere for at hente inspiration og praktiske løsninger på biologiske spørgsmål. Omvendt er mange fysikere og kemikere også begyndt at interessere sig for biologiske problemer, der giver helt nye anvendelsesmuligheder for deres viden og metoder. Denne stigende tværfaglighed er noget af det mest interessante, der sker indenfor naturvidenskaben i disse år.

Perspektiver

Med denne korte beretning om bakterier ønsker vi at pege på nogle af fremtidens biologiske udfordringer – herunder infektionssygdomme, som i dag ikke kan behandles. Hvis vi skal forstå livets mangfoldighed for at kunne beskytte og bevare så meget som muligt af denne og samtidig reducere truslerne fra de naturlige fjender, som for eksempel bakterier, så skal biologerne i større udstrækning forene kræfterne med fysikere, kemikere, matematikere og ingeniører. Det er i krydsfeltet mellem disse discipliner, at fremtidens biologer vil finde svar på nogle af de store biologiske spørgsmål, og det er herfra, vores børn og børnebørn skal hente inspiration til at imødegå de problemer, som fremtiden bringer.



Kapitlets forfattere. Bagerst fra venstre: Ph.d.-studerende Morten Harmsen, Professor Søren Molin, Adjunkt Anders Folkesson, Lektor Claus Sternberg. Forrest fra venstre: Post.doc. Janus A. Juul Haagensen, Civilingeniør Anne Louise Viborg Frost.