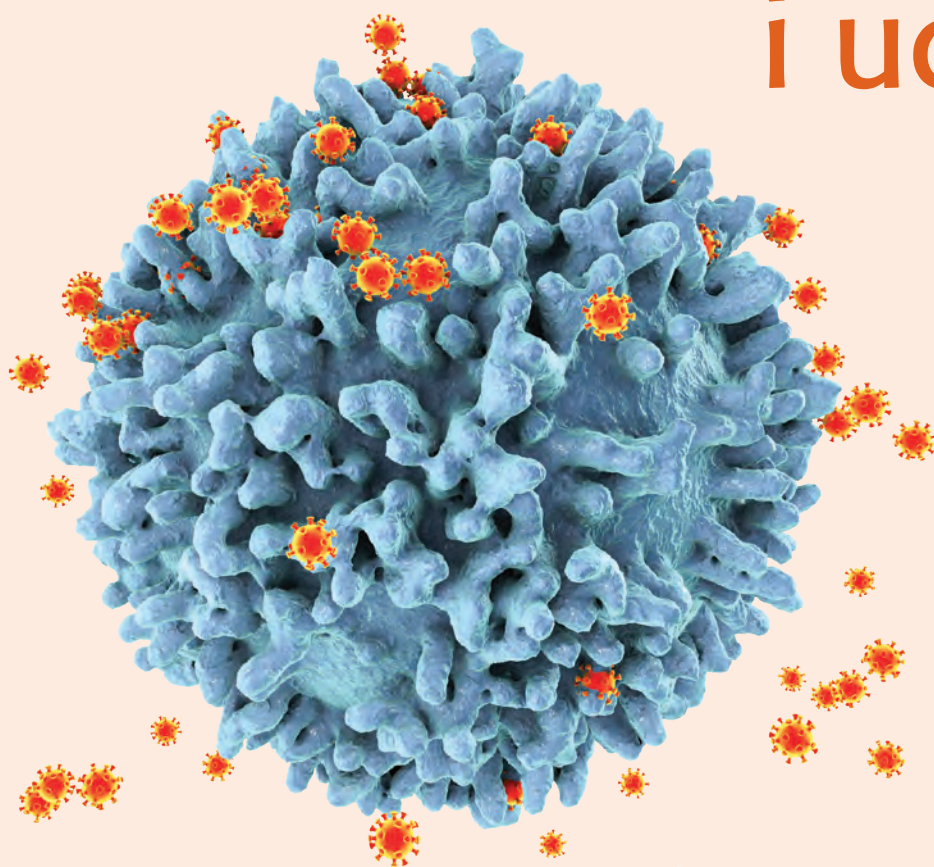


Biologi

i udvikling

Mikrobiologi



Frank Grønlund Jørgensen

nucleus 

Biologi i udvikling B-niveau
Mikrobiologi

© 2017 Frank Grønlund Jørgensen og Nucleus Forlag ApS

Kopiering fra denne bog må kun finde sted på institutioner eller virksomheder der har indgået aftale med Copydan Tekst & Node, og kun inden for de rammer, der er nævnt i aftalen.

Forlagsredaktion: Marianne Frøsig

Billedredaktion: Frank Grønlund Jørgensen & Birthe Møller Nielsen

Illustrationer:

Henning Dalhoff: Figur 108, 111, 118, 124-126, 128.

Elin Steffensen, Griffle: Figur 106-107, 112, 115, 117, 119-123.

Frank Grønlund Jørgensen: Figur 127.

Omslag: Birthe Møller Nielsen, Frank Grønlund Jørgensen og Elin Steffensen.

Grafisk tilrettelægning: Elin Steffensen, Griffle.

1. udgave, 1. oplag 2017

ISBN 978-87-90363-94-9

Udgivet af Nucleus – Foreningen af Danske Biologers Forlag ApS

www.nucleus.dk

Trykt hos Specialtrykkeriet Arco A/S

Printed in Denmark 2017

Forfatter

Frank Grønlund Jørgensen

M

IKROBIOLOGI

Mikrobiologi er den gren af biologi der beskæftiger sig med *mikroorganismer* altså de organismer der er for små til at kunne ses med det blotte øje. Alle prokaryoter er mikroorganismer, men der findes også mange eukaryote mikroorganismer som fx gærsvampe, se figur 104.

Mikrobiologi – et historisk overblik

I og med at mikroorganismer ikke kan ses med det blotte øje, blev de først opdaget relativt sent i forhold til mange andre organismer. I 1674 lykkedes det for Antonie van Leeuwenhoek ved hjælp af et hjemmelavet mikroskop at se og beskrive individuelle mikroorganismer, se figur 105. I løbet af en tiårig periode beskrev han bl.a. sædceller og bakterier.

Barselsfeber og håndhygiejne

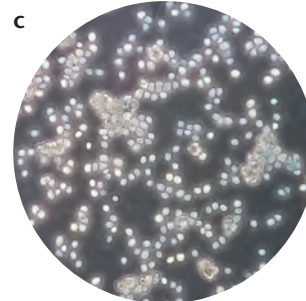
Vi skal helt op til midten af 1800-tallet før bakteriers årsag til mange sygdomme blev anerkendt.

Et af de store helbredsproblemer i den periode var den såkaldte barselsfeber der hvert år kostede et stort antal mødre livet. Risikoen for at dø af barselsfeber var markant højere på flere fødeafdelinger end den historisk havde været ved hjemmefødsler, men man kendte på daværende tidspunkt ikke årsagen til den højere dødelighed.

Et indirekte, men vigtigt skridt på vejen til løsning af problemet kom fra den ungarske læge Ignaz Semmelweis. Semmelweis var ansat på et hospital i Wien fra 1846-1849. Hospitalet havde siden 1833 haft to forskellige fødeafdelinger. I starten blev de to fødeafdelinger drevet på samme måde, men det ændrede sig i 1841 hvorefter den før-



b



Figur 104. Fotos af almindelig bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*).

a. Gær købt i supermarked.
b. Kolonier af gærceller på YEPD-agar.

c. Enkelte gærceller set i lysmikroskop.

ste afdeling blev tilset af lægestuderende, mens den anden blev tilset af jordemorstuderende.

Semmelweis var optaget af at forstå årsagerne til sygdommen, og han undersøgte bl.a. forskellen i dødelighed i de to forskellige klinikker på hospitalet i Wien før og efter 1841, se figur 106 side 98. Semmelweis beskriver en situation hvor en mandlig kollega dør af barselsfeberlignende symptomer efter at have skåret sig i fingeren under en obduktion. Denne episode leder ham til ideen om at sygdommen må skyldes et ukendt stof, der kan overføres fra dødt væv til levende mennesker. Semmelweis kaldte det giftigt ligstof. I modsætning til de jordemorstuderende udførte de lægestuderende også obduktioner af lig.

Semmelweis' hypotese var at de sygdomsfremkaldende partikler blev overført via de lægestuderendes hænder fra



Figur 105. Kopi af Leeuwenhoeks hjemmelavede mikroskop. Mikroskopet er ganske lille og håndholdt. Objektet anbringes foran linsen, og man ser gennem linsen fra den anden side.

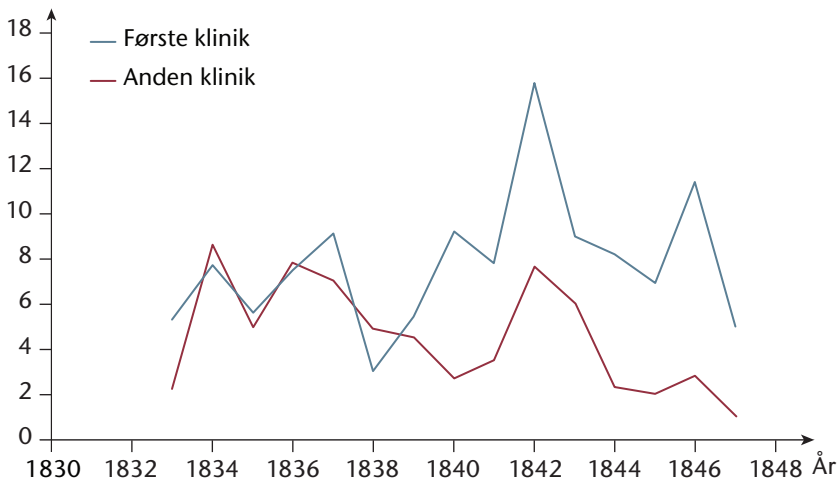
lig til de kvinder, de hjalp på fødeafdelingen. Derfor indførte Semmelweis i 1847 en regel om at de lægestuderende altid skulle vaske deres hænder i en klorkalk-opløsning før de tilså kvinderne på fødeafdelingen. Dødeligheden i den første fødeklínik faldt umiddel-

bart derefter til et niveau svarende til den anden fødeklínik på hospitalet, se figur 107.

Semmelweis' data ser ud til at vise en sammenhæng mellem indførsel af bedre håndhygiejne og risikoen for at kvinder dør af barselsfeber, og data ser derfor ud til at understøtte hans hypotese. Semmelweis' ideer passede dog ikke med tidens gængse forståelse af sygdom, og da han ikke kunne fremvise det sygdomsfremkaldende stof og derfor heller ikke redegøre tilfredsstillende for en mulig årsagssammenhæng, mødte hans ideer stor modstand blandt hans kollegaer. Vigtigheden af håndvask og hygiejne blev derfor ikke i første omgang alment accepteret.

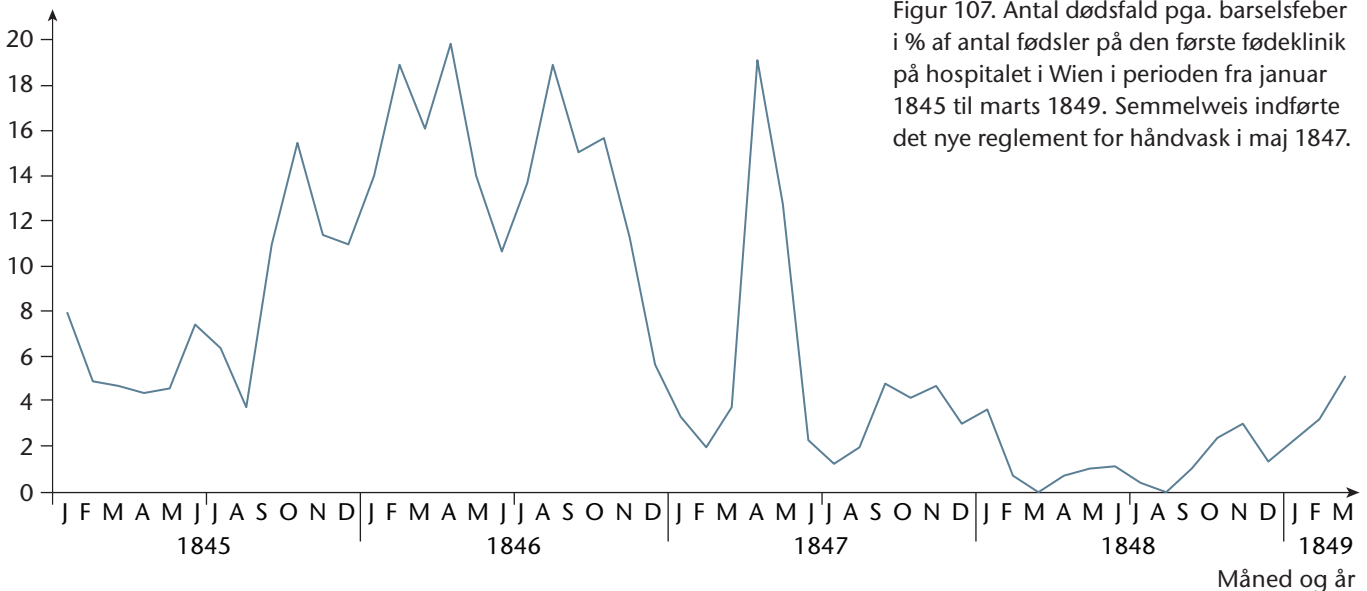
I dag bruges forskellige desinfektionsmidler rutinemæssigt på alle hospitaler, prøv eventuelt selv at undersøge effekten af håndsprit eller andre desinfektionsmidler. Semmelweis stoppede på hospitalet i marts 1849, og først mange år senere, efter Semmelweis' død i 1865, blev mikroorga-

Dødsfald af barselsfeber (%)

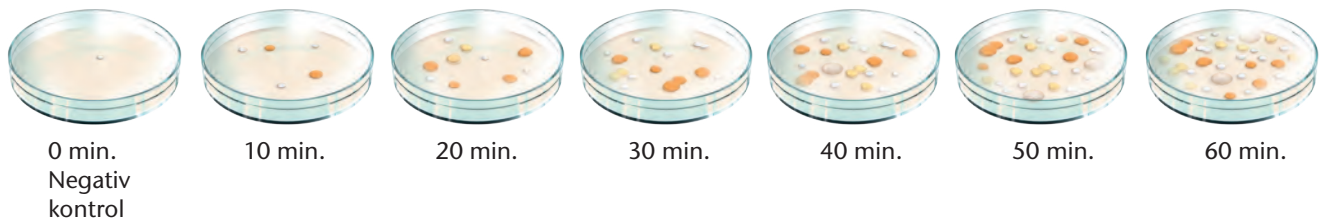


Figur 106. Antal dødsfald pga. barselsfeber i % af antal fødsler på de to forskellige fødeklínikker på hospitalet i Wien i perioden fra 1833 til 1847. Semmelweis blev ansat i 1846. Fra 1841 blev den første klínik tilset af lægestuderende mens den anden klínik blev tilset af jordemorstuderende.

Dødsfald af barselsfeber (%)



Figur 107. Antal dødsfald pga. barselsfeber i % af antal fødsler på den første fødeklínik på hospitalet i Wien i perioden fra januar 1845 til marts 1849. Semmelweis indførte det nye reglement for håndvask i maj 1847.



Figur 108. Resultater fra kimfaldsforsøg i et klasselokale. Er der en sammenhæng mellem den tid agarpladen har været udsat for luften i lokalet og antallet af kolonier?

nismers sygdomsfremkaldende rolle og hygiejnens vigtighed anerkendt af lægevidenskaben. Blandt de mange videnskabsfolk der bidrog til denne erkendelse, var især Robert Koch og Louis Pasteur.

Pasteurisering, kimfald og vaccination

Louis Pasteur var en af datidens største videnskabsmænd. Han var medvirkende til at afkræfte teorien om spontan genese ved at vise at bakterievækst i en steriliseret væske kan opstå på grund af kimfald fra luften, se figur 108 og læs mere i Biologi i udvikling C-bog side 13.

Pasteur arbejdede også med forskellige gæringsprocesser og opfandt en metode til at behandle mad og drikkevarer så man mindsker risikoen for skadelig bakterievækst. Metoden kaldes i dag for *pasteurisering* og består i at man opvarmer fødevarer, typisk til mellem 60 og 80 °C i kortere eller længere tid. Derved dræbes de fleste skadelige mikroorganismer uden at fødevarens smag og ernæringsværdi forringes, hvilket typisk vil være tilfældet ved en kogning. Pasteurisering er en væsentlig årsag til at mange typer mad og drikkevarer har en relativ lang holdbarhed, se figur 109. Pasteurs arbejde var med til at fremme ideen om at mikroorganismer er årsag til mange forskellige sygdomme, og han var også en af de første der arbejdede med ud-

vikling af vacciner til bl.a. miltbrand og rabies (hundegalskab), læs mere om vacciner i kapitlet Immunsystemet side 53f.

Sygdomsfremkaldende bakterier

Robert Koch er ophavsmand til Kochs postulater. De fire postulater lyder i en let moderniseret udgave:

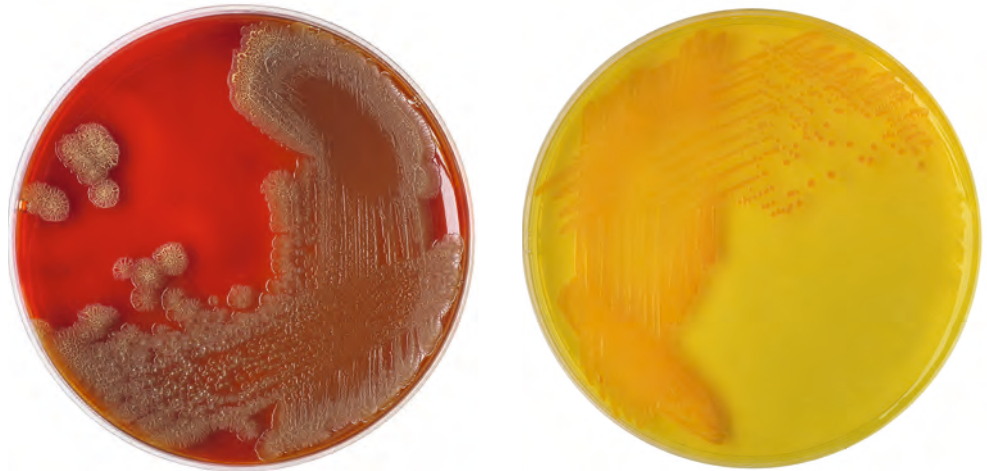
- Mikroorganismen skal findes i rigelige mængder i alle organismer der lider af sygdommen, men ikke i raske organismer.
- Mikroorganismen skal kunne isoleres fra den syge organisme og dyrkes i renkultur.
- Mikroorganismen fra den dyrkede renkultur bør forårsage sygdom når den introduceres i en rask organisme.
- Mikroorganismen skal kunne genisoleres fra den syge testvært og være identisk med den originale mikroorganisme.

Postulaterne forklarer hvordan man kan påvise en årsagssammenhæng mellem infektion med en mikroorganisme og en bestemt sygdom. Vi kender flere eksempler på infektionssygdomme hvor et eller flere af postulaterne ikke rigtigt passer, men hvor vi alligevel accepterer at der er en årsagssammenhæng. I forhold til det første postulat ved vi, at man kan være bærer af en mikroorganisme uden at denne forårsager sygdom, mens mikroorga-

Figur 109. Øl og mælk er eksempler på drikkevarer der ofte er pasteuriseret.



Figur 110. Kolonier af den kolerafremkaldende bakterie (*Vibrio cholerae*) på henholdsvis blodagar og TCBS-agar.



nismen i andre situationer vil resultere i sygdom. Der er også mange mikroorganismer vi ikke er i stand til at dyrke i renkultur, og flere forskellige typer af bakterier kender vi kun fordi vi har fundet deres DNA. Læs mere om hvordan man isolerer og dyrker bakterier i renkultur på side 101f.

Udfordringerne til trods fungerer postulaterne alligevel som vigtige overordnede principper inden for mikrobiologi og infektionsbiologi. Kochs laboratorie er også kendt for at have udviklet faste dyrkningsmedier til bakterier, og det er her de første agarbaserede dyrkningsmedier bliver lavet, se figur 110. Agarpladen blev hurtigt et vigtigt værktøj og var medvirkende til at Robert Koch og hans kollegaer kunne isolere og renyrke de forskellige bakterier der forårsager miltbrand, tuberkulose og kolera, og demonstrere deres sygdomsfremkaldende egenskaber.

Der er bakterier alle vegne

Da de fleste bakterier primært former sig aseksuelt, er det biologiske artsbegreb ikke særlig godt til at definere hvornår to bakterier tilhører samme

art. Mange meget forskellige bakterier kan udveksle gener med hinanden fx ved hjælp af plasmider, og artsbarrieren er derfor ikke på samme måde begrænsende for genoverførsel som den er hos de fleste planter og dyr. Bakte-riearter er derfor i stedet typisk bestemt ud fra genetisk lighed og fysiologiske egenskaber.

Bakterier er ekstremt talrige på jorden. Der er på nuværende tidspunkt kun beskrevet ca. 13.000 forskellige arter, men vi ved at der er mange flere. Typisk kræves det at man er i stand til at isolere og dyrke en bakterie i en renkultur, før man kan beskrive den på tilfredsstillende vis. Der er mange bakterier vi endnu ikke har fundet ud af at dyrke i renkultur, og derfor kender vi dem som nævnt kun ud fra deres DNA. DNA-studier af jordprøver har vist at der muligvis findes mellem få hundrede og flere hundrede tusinde forskellige bakteriearter pr. gram jord, men tallene er stadig meget usikre.

Bakterier er vigtige for vores helbred

De fleste ved at bakterier kan medføre sygdom, men nogle bakterier er også gavnlige for vores helbred. En gennem-

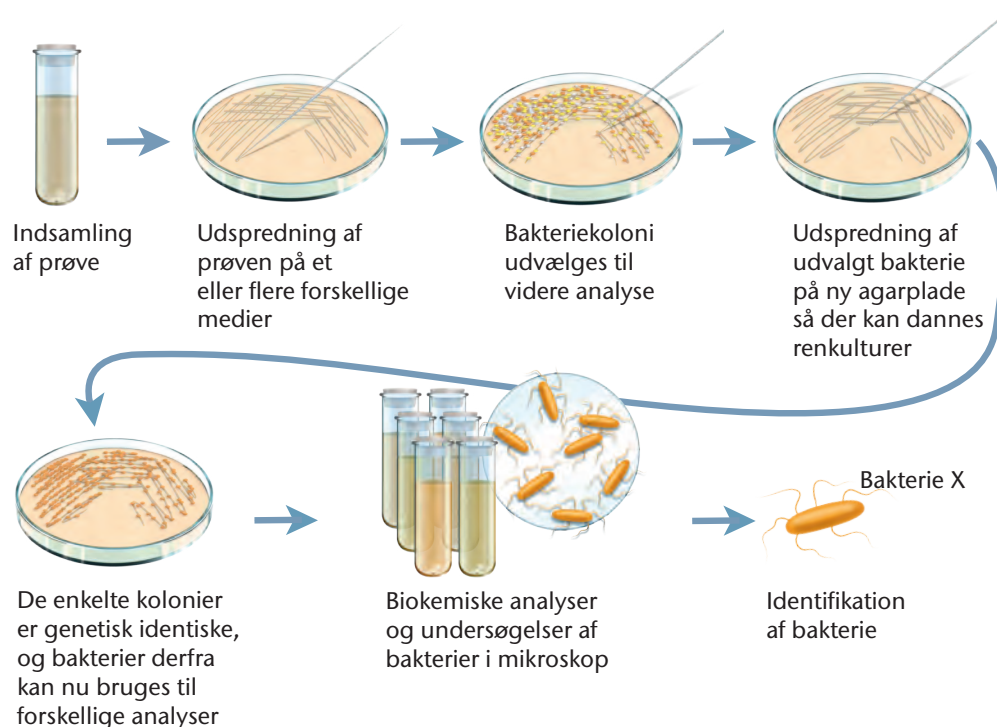
snitlig menneskekrop indeholder ca. 10 gange så mange bakterier som menneskeceller. Bakterierne findes normalt på kroppens indre og ydre overflader, heraf langt de fleste i vores tarmsystem, men der findes også mange bakterier på vores hud og slimhinder. Finder man bakterier i blod eller væv er der tale om en infektion, hvor bakterierne har gennembrudt kroppens ydre forsvarsbarriere, og dem vil immunforsvaret derfor forsøge at bekæmpe.

Der forskes meget i hvordan bakterier påvirker vores helbred. Der findes firmaer der tilbyder at lave DNA-analyser af den bakterielle mangfoldighed i ens afføring. De senere år er flere begyndt at eksperimentere med at lave fæcestransplantationer. Ved en fæcestransplantation overføres tarmbakterier fra en rask til en syg person i

håbet om at bakterierne fra den raske persons tarmsystem kan have en gavnlig effekt på den syge. Flere forsøg har vist lovende resultater, men der er stadig mange uafklarede spørgsmål inden for dette forskningsområde.

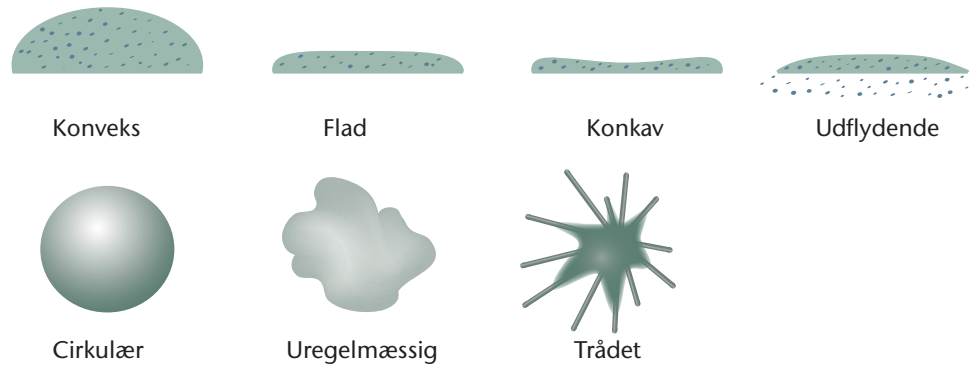
Identifikation af bakterier

I dag benyttes DNA-undersøgelser ofte til at identificere bakterier, men det fungerer bedst hvis den bakterie man undersøger, allerede er kendt og beskrevet med mere traditionelle metoder. Figur 111 viser en oversigt over hvordan en man kan identificere en bestemt bakterie fra en prøve. Først isolerer og dyrker man den i renkultur, og derefter undersøger man bakterierne og bakteriekoloniens form og farve. Desuden undersøger man den med en række biokemiske tests og en række forskellige farveteknikker.



Figur 111. Bakterier kan dyrkes i renkultur og kan derefter identificeres ud fra forskellige diagnostiske tests.

Figur 112. Bakteriekoloniers form er et vigtigt kendetegn. Desuden er farve og tør eller fugtig overflade også vigtige karakteristika.

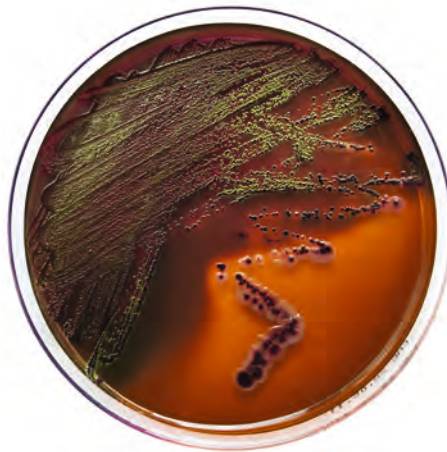


Renkulturer og vækstmedier

Et af de vigtigste redskaber inden for mikrobiologi er isolering og dyrkning af *renkulturer*. Ved hjælp af pladeudspredningsmetoden som er vist i figur 111 side 101, kan man sprede en prøve med bakterier ud over en agarplade. Efter opformering i en passende periode kan man se og arbejde videre med

de enkelte kolonier. Hver koloni består ofte af millioner af identiske bakterier, også kaldet kloner, der er skabt ved hjælp af ukønnet forering. Hvis man vælger en af kolonierne og udspreder bakterierne derfra på en ny plade, kan man skabe en renkultur på den pågældende plade. Hvis prøven indeholder for mange bakterier til at man får individuelle kolonier på pladen, kan man med fordel fortynde prøven før udspredning, læs mere på side 109ff om seriefortyndinger og bestemmelse af bakteriekoncentration i prøver.

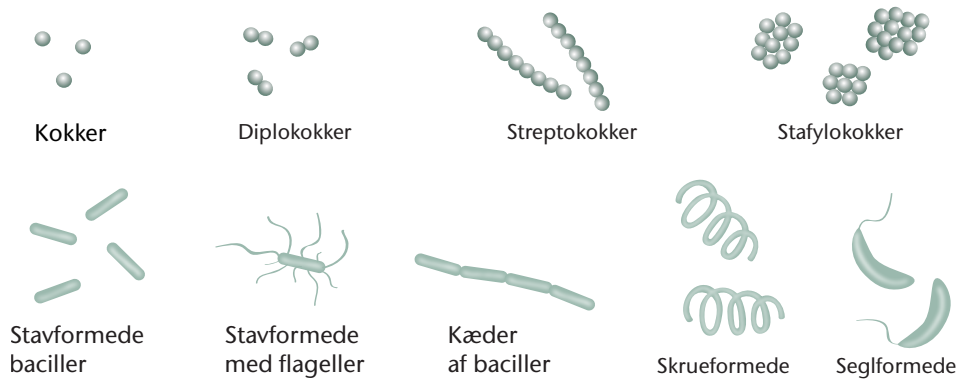
Figur 113. *E. coli*-bakterier får et karakteristisk udseende udstrøget på EMB-agar. Denne agar selekterer for gram-negative bakterier, heriblandt *E. coli*.



Figur 114. To forskellige bakterier udstrøget på en agarplade med MacConkey-agar. MacConkey-agar kan bruges til at skelne mellem bakterier der kan fermentere laktose, og dem der ikke kan. I det første tilfælde fremstår mediet rødligt, og i det andet tilfælde fremstår det gulbrunt. Farven skyldes en pH-indikator i mediet.



Koloniernes størrelse, form, farve og overflade kan bruges til at adskille forskellige typer bakterier fra hinanden. Figur 112 viser eksempler på de mest almindelige kendetegn ved kolonier. Ved at dyrke renkulturer på forskellige næringsmedier kan man også adskille mange bakterier fra hinanden. Det kan fx være næringsmedier der indeholder antibiotika eller andre stoffer, som man ved at nogle, men ikke alle bakterier kan vokse i nærheden af, se figur 113. Det kan også være næringsmedier der mangler et eller flere næringsstoffer, som gør at kun nogle bakterier kan vokse på mediet. Sidst, men ikke mindst, kan det være næringsmedier hvor bestemte bakterier dan-



Figur 115. Ved mikroskopering af bakterier kan deres form og organisering undersøges nærmere.

ner meget genkendelige kolonier eller skaber en særlig farvereaktion i mediet, fordi de enten kan eller ikke kan omdanne et af næringsstofferne i mediet, se figur 114.

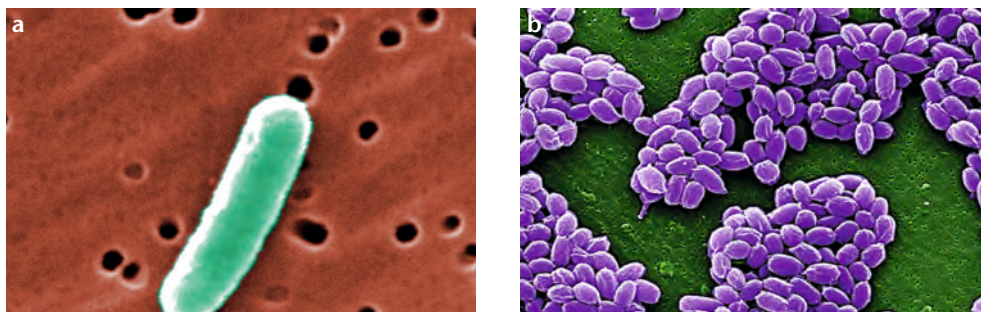
Mikroskopi af bakterier

Ser man på bakterierne i et lysmikroskop ved stor forstørrelse, eller ved hjælp af et elektronmikroskop som kan lave endnu større forstørrelse, så kan man se bakteriernes grundlæggende form og hvordan de organiserer sig. De fleste bakterier er enten kugleformede (*kokker*), stavformede (*baciller*) eller har forskellige former for buet eller snoet form. Kokker og baciller inddeles ydermere efter hvordan de organiserer sig. Figur 115 viser de mest almindelige former og organisationsformer, mens figur 116 viser elektronmikroskopifotos af udvalgte bakterier.

Forskellige farveteknikker er også brugbare til at adskille bakteriearter fra hinanden. En af disse metoder kaldes for gramfarvning. Gramfarvning er en metode til at adskille bakterier på baggrund af den overordnede opbygning af deres cellevæg, så de enten fremstår lilla (grampositive) eller røde (gramnegative), når man ser på dem i et lysmikroskop.

Biokemiske forskelle på bakterier

Bakteriearter er tilpasset forskellige nicher i naturen og er derfor i stand til at udføre forskellige biokemiske reaktioner. Det afgørende er ofte om bakterierne danner et bestemt enzym i et bestemt miljø eller ej, og dette kan udnyttes til at adskille forskellige bakterier fra hinanden. Nogle bakterier er fx *obligat aerobe* og kan altså ikke leve uden oxygen, mens andre er *obligat anaerobe* og kan kun leve og dyrkes i oxygenfrie



Figur 116. Farvede elektronmikroskopifotos af henholdsvis *E. coli*-bakterie og sporer fra miltbrandbakterier.

	Bakterie		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
Mikroskopi og farvning			
Bakterieform og lejrning	Enkeltstående stavformede (bacille)	Enkeltstående eller korte kæder af stavformede (bacille)	Grupper af kokker
Bevægelighed	Bevægelig	Bevægelig	Ikke bevægelig
Gramfarvning	Negativ (rød)	Positiv (lilla)	Positiv (lilla)
Flagel	Ja	Ja	Nej
Enzymtest			
Katalaseaktivitet	Positiv	Positiv	Positiv
Oxidaseaktivitet	Negativ	Negativ	Negativ
Substratspecificitet			
Fermentering af laktose	Positiv	Negativ	Positiv
Fermentering af manitol	Positiv	Negativ	Negativ

Figur 117. Udvalgte karakteristika for tre forskellige bakterier der kan bruges til identifikation. Koloniernes form afhænger af agartypen. Det er ikke vist her, selvom det også bruges i identifikation.

miljøer. Mange bakterier er *fakultativt anaerobe* og kan derfor både leve med og uden oxygen, men de udfører typisk forskellige biokemiske processer i de to miljøer. På grund af bakteriernes evne til at danne forskellige enzymer kan de omdanne forskellige substrater, og dette bruges også til at adskille bakterierne. Figur 117 viser et eksempel på hvordan en kombination af de forskellige metoder kan benyttes til at identificere menneskelige tarmbakterier.

PCR-baserede metoder

Ved hjælp af PCR-teknikken kan man opformere 16sRNA-genet fra bakterier – læs om teknikken i Biologi i udvikling C-bog side 203 ff. Dette gen koder for en del af ribosomets opbygning, og på grund af dets afgørende betydning for organismernes livsfunktioner udvikler genet sig tilpas langsomt til at man kan bruge det til at sammen-

ligne og adskille selv meget fjernt beslægtede bakteriers DNA fra hinanden. Man kan udvinde og opformere DNA fra fx en vandprøve eller jordprøve og se hvor mange forskellige bakteriers 16sRNA man kan finde. Denne type DNA-prøve kaldes også for *eDNA*, det står for environmental DNA. Når man analyserer eDNA-prøver, finder man selvfølgelig 16sRNA fra mange kendte bakterier, og disse er nemme at identificere, men man finder også 16sRNA fra ukendte bakterier, så disse bakteriearter kendes på nuværende tidspunkt alene ud fra deres DNA i miljøet.

Mikrobiel vækst

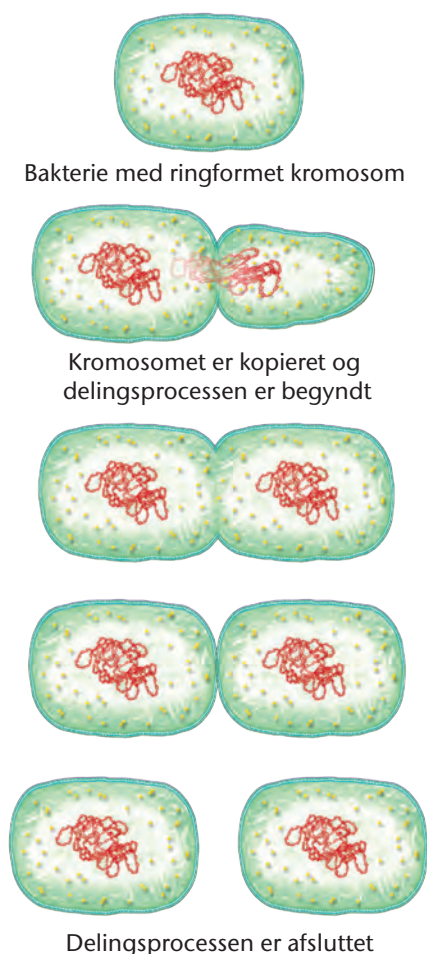
De fleste mikroorganismer er i stand til at formere sig ved ukønnet forering. For bakterier betyder det at en bakterie under de rette omstændigheder kan dele sig og blive til to genetisk identi-

ske bakterier, der så hver især igen kan dele sig. Denne type formering minder overfladisk lidt om mitotiske celledelinger hos eukaryoter. Der er dog flere væsentlige forskelle. En af dem er at eukaryote celler normalt er diploide og har flere stavformede kromosomer der først skal kopieres ved DNA-replikation og dernæst fordeles korrekt mellem de to datterceller, læs mere om mitosen i Biologi i udvikling C-bog side 174ff. Bakterier er normalt haploide og har et enkelt cirkulært kromosom. Kromosomet kopieres med start i det såkaldte replikationsstartsted. Når kromosomet er blevet kopieret, adskilles de to identiske kromosomer i hver sin ende af cellen der så deles på midten og danner to nye bakterier, se figur 118.

Vækstfaktorer og væksthastighed

Hvor hurtigt en mikroorganisme kan dele sig, afhænger af mange forskellige faktorer som fx temperatur, pH og koncentrationen af nødvendige næringsstoffer. Forskellige mikroorganismer har ved optimale vækstbetingelser meget forskellige væksthastigheder der bl.a. afhænger af deres evne til at producere nødvendige enzymer og optage næringsstoffer fra mediet. Da optagelsen af næringsstoffer normalt foregår ved diffusion, så har størrelsen af cellerne også stor betydning. Mindre celler har normalt en større overflade i forhold til deres volumen end store celler, men formen er også vigtig. Jo større overflade/volumen-forholdet er, jo mere effektiv er diffusionen igennem cellemembranen. Det er en af flere grunde til at bakterier som *Escherichia coli* normalt har væsentlig højere vækstrater end fx gærceller, der er meget større.

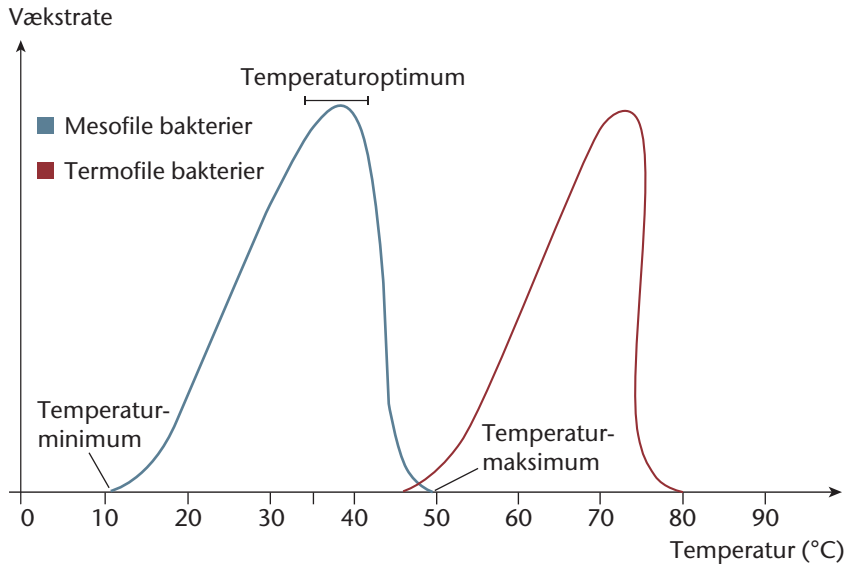
Optagelseshastigheden af næringsstoffer og hastigheden af cellens biokemiske reaktioner afhænger direkte af temperaturen. Ved højere temperaturer bevæger molekyler sig hurtigere, og derfor sker diffusionen også hurtigere. Hastigheden på enzymatiske reaktioner afhænger bl.a. af hvor hurtigt substrat og enzym binder til hinanden, og denne hastighed er ligeledes afhængig af molekylernes bevægelseshastighed. Dvs. at mikroorganismernes vækst også stiger med øget temperatur, dog kun til et punkt. Alle mikroorganismer har et temperaturoptimum hvor deres væksthastighed er højst mulig, ved højere temperatur denaturerer mikro-



Figur 118. Bakterier deler sig ved en proces hvor bakteriekromosomet kopieres og cellen vokser og deler sig i to.

organismernes enzymer nemlig, og derved dør mikroorganismene. Forskellige mikroorganismer er tilpasset livet i forskellige miljøer og dermed også forskellige temperaturer. Mikroorganismer der er tilknyttet os, har typisk

et temperaturoptimum ved 37 °C eller lidt derover, og de dyrkes derfor også bedst i et varmeskab ved ca. 37 grader. Figur 119 viser hvordan væksthastigheden af forskellige bakteriegrupper afhænger af temperaturen.



Figur 119. Bakteriers vækst afhænger af temperaturen og deres genetiske dispositioner. Bakterier der lever bedst omkring vores kropstemperatur, kaldes for mesofile bakterier. Termofile bakterier lever bedst ved højere temperaturer.

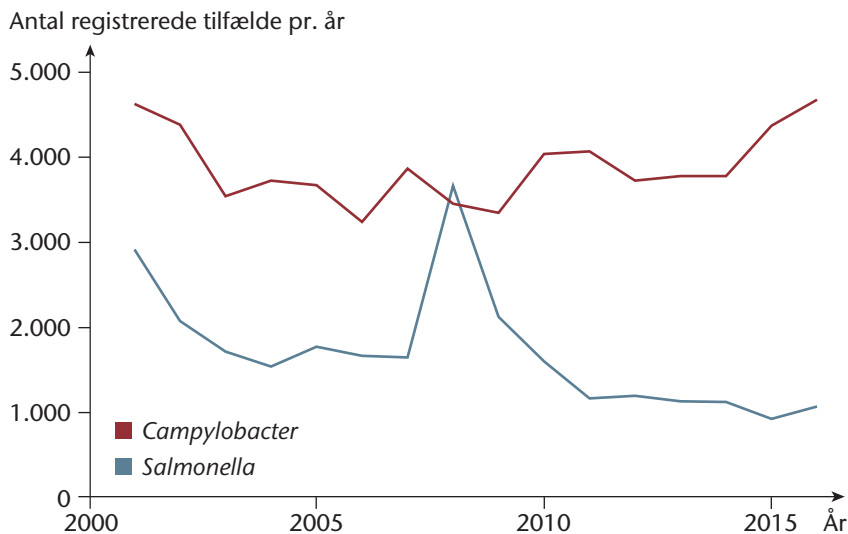
Fødevarerikkerhed

Mad og drikkevarer er hyppige kilder til bakterielle infektioner og dermed til sygdom hos mennesker. Derfor er det vigtigt at vi kender til god køkkenhygiejne og behandler og opbevarer fødevarer på hensigtsmæssige måder. Der er bakterier alle vegne, også på vores hænder, og det er meget let at komme til at overføre bakterier til en madvare under tilberedning. Hvis denne madvare derefter giver bakterien gode vækstbetingelser – fx hvis den opbevares for varmt – så kan få bakterier i løbet af nogle timer bliver til mange og forårsage alvorlig sygdom.

Bakteriers afhængighed af temperatur forklarer hvorfor vi skal opbevare mange typer fødevarer på køl, da det begrænser væksten af uønskede bakterier. Ligeledes finder vi her forklaringen på hvorfor det er vigtigt at fx fersk kyllingekød skal opvarmes tilstrækkeligt hele vejen igennem under tilberedning. De høje temperaturer vil dræbe mange patogene bakterier som fx *Salmonella* og *Campylobacter* hvis de skulle være til stede, se figur 120.

Ekspontiel vækst

Under de rette omstændigheder kan en bakterie som *E. coli* dele sig ca. hvert tyvende minut. Det betyder, at antallet af bakterier i en prøve potentielt kan fordobles hvert tyvende minut. Selvom man kun starter med en enkelt bak-



Figur 120. Bakterier i madvarer. Antal danskere diagnosticeret med salmonella- eller campylobacter-infektion i perioden fra 2001-2016.

terie, kan der i løbet af 7-8 timer ende med at være flere millioner. Denne type udvikling hvor antallet af individer ændres med en fast faktor i en given tidsperiode, kaldes for eksponentiel udvikling eller eksponentiel vækst. Generelt kan en eksponentiel udvikling være både aftagende og voksende, men i forhold til bakteriel vækst er det primært relevant at tale om voksende eksponentielle udviklinger. Eksponentiel vækst af bakterier kan kun fortsætte indtil en abiotisk eller biotisk faktor begrænser væksten. For bakterier vil det typisk ske efter nogle timer eller dage, afhængigt af omstændighederne.

Eksponentiel vækst hos bakterier kan beskrives med det matematiske udtryk der er vist i ligning (1):

$$(1) y = b \cdot a^x$$

I dette udtryk er y antallet af bakterier til tidspunktet x . Begyndelsesværdien b er antal bakterier fra start ($x = 0$), og a er en konstant der kaldes for fremskrivningsfaktoren. Fremskrivningsfaktoren viser hvor mange gange y stiger, hvis x stiger med 1. Fremskrivningsfaktoren a kan også skrives som $a = 1 + r$, hvor r kaldes for funktionens vækstrate. Vækstraten r angiver hvor stor en procentdel y vokser med, hvis x stiger med 1. Bemærk at fordi vi her taler om et voksende antal bakterier, er $b > 0$ og $a > 1$.

Nogle gange ser man ligninger for eksponentiel vækst på formen vist i ligning (2):

$$(2) y = b \cdot e^{k \cdot x}$$

Ved at sammenligne ovennævnte to ligninger med hinanden kan man ved hjælp af en potensregneregul vise at fremskrivningsfaktoren a i ligning (1) er lig med e^k i ligning (2).

Antal bakterier fordobles i hver generation

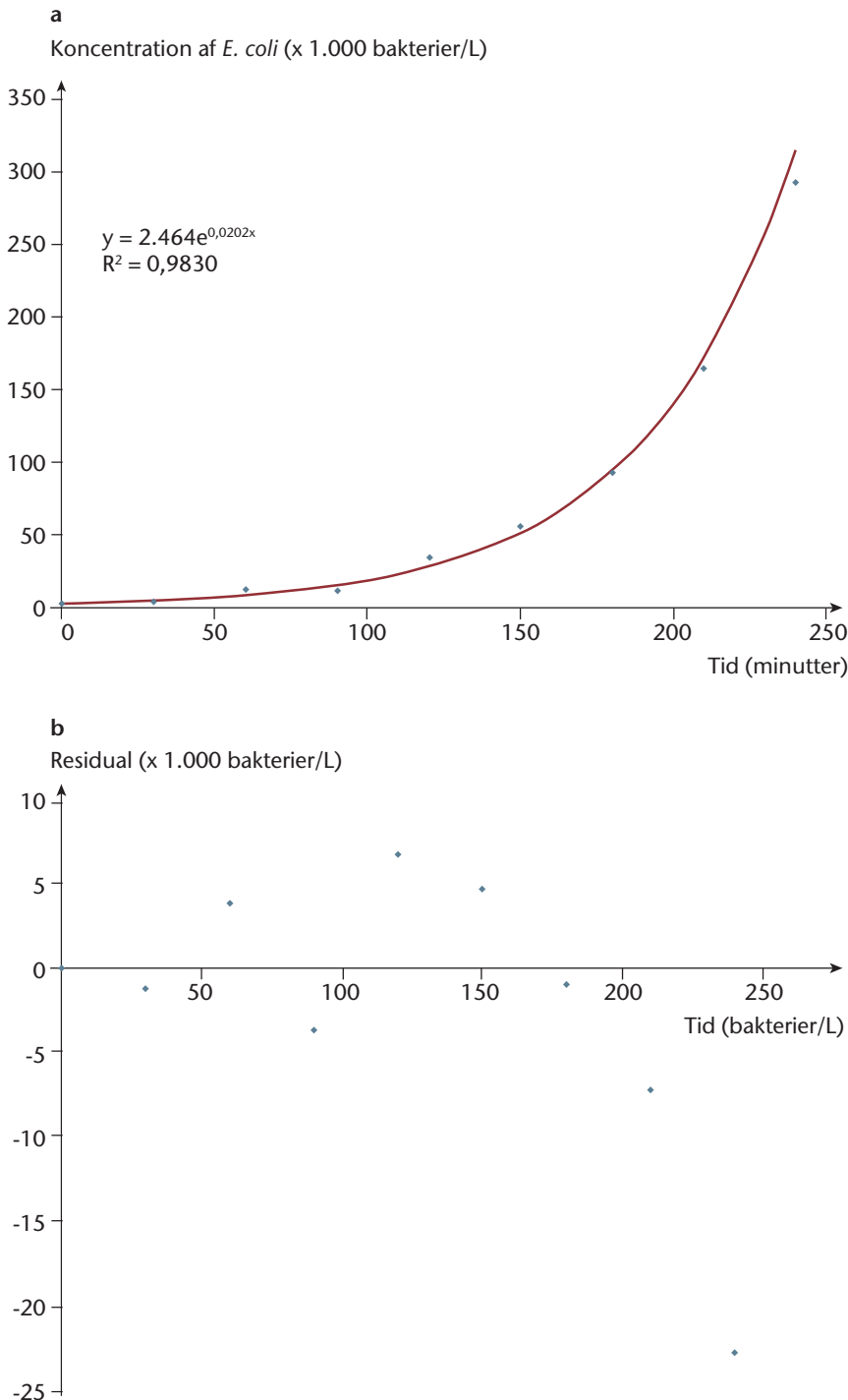
Hvis vi kender generationstiden for en bakterie og antager at alle bakterier deler sig samtidigt, kan vi omskrive udtrykket i ligning (1) til et udtryk som funktion af antal generationer. Ved ubegrænset vækst deler bakterierne sig med en konstant rate, og derfor fordobles antallet af bakterier i hver generation. Derfor må fremskrivningsfaktoren a være 2, når vi regner tiden i antal generationer. Hvis vi kalder antallet af bakterier i første generation N_0 og antal generationer siden start for t , så kan antallet af bakterier efter et bestemt antal generationer (N_t) ifølge den eksponentielle vækstmodel bestemmes til at være:

$$(3) N_t = N_0 \cdot 2^t$$

I dette tilfælde er det klart at fordoblingstiden er præcis en generation, da det jo var præmissen for udledningen af dette funktionsudtryk. Tabellen i figur 121 viser hvordan antallet af bakterier stiger i løbet af 20 generationer, hvis man starter med en enkelt bakterie i generation 0.

Generation	Antal bakterier
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576

Figur 121. Antallet af bakterier fordobles for hver generation ved ubegrænset vækst.



Figur 122. Data fra et vækstforsøg med *E. coli*-bakterier med eksponentiel regression og tilknyttet residualplot. Kan der være en biologisk forklaring på at sidste målepunkt ser ud til at ligge væsentligt under den eksponentielle model?

Bakteriers generationstid

Hvis vi ønsker at bestemme en bakteries generationstid ud fra forsøgsdata, kan det gøres med eksponentiel regression. Figur 122 viser et eksempel på regression udført på data fra et forsøg med *E. coli*-bakterier. Vi starter med at beregne fremskrivningsfaktoren a , ud fra regressionsligningen.

$$a = e^k = e^{0,0202} = 1,020405$$

Vi beregner nu vækstraten r .

$$r = a - 1 = 1,020405 - 1 = 0,020405 \approx 2\%$$

Hvilket vil sige, at antallet af *E. coli*-bakterier i dette forsøg i gennemsnit er steget ca. 2% pr. minut.

En bakteries generationstid er det samme som fordoblingstiden, og fra matematik ved vi at man kan finde fordoblingstiden (T_2) for en eksponentiel udvikling vha. følgende udtryk:

$$(4) T_2 = \frac{\log(2)}{\log(a)}$$

Generationstiden måles i den enhed der er brugt i data, så i dette eksempel måles den i minutter, og vi får altså at generationstiden for *E. coli*-bakterierne i det viste forsøg er:

$$T_2 = \frac{\log(2)}{\log(1,020405)} \approx 34,3 \text{ minutter}$$

som svarer til 34 minutter og 18 sekunder.

Som nævnt kan eksponentiel vækst ikke fortsætte evigt, og væksten af enhver population vil på et tidspunkt blive begrænset. Bakterier følger derfor typisk et bestemt mønster når de koloniserer et nyt miljø. Dette mønster kaldes for den mikrobielle vækstkurve.

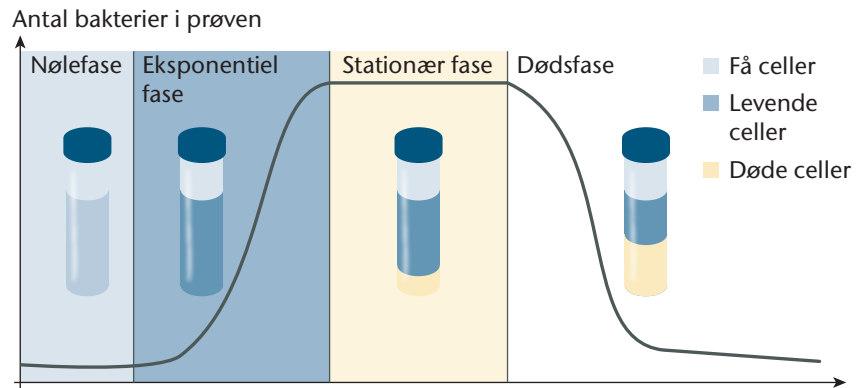
Den mikrobielle vækstkurve

Det generelle forløb af den *mikrobielle vækstkurve* er vist i figur 123. Den første fase kaldes for *nølefasen* og er en periode hvor bakterierne danner de nødvendige enzymer og tilpasser deres livsprocesser til det givne miljø. Denne periode kan være kortere eller længere tid og er generelt kendetegnet ved at antallet af bakterier er nogenlunde konstant. På et tidspunkt begynder bakterierne at vokse i antal, og populationen befinder sig nu i den eksponentielle fase.

I den *eksponentielle fase* deler bakterierne sig hurtigere, og der dannes flere nye bakterier end der dør med en nogenlunde konstant vækstrate. Antallet af bakterier følger derfor i denne periode en eksponentiel vækstfunktion indtil væksten bliver begrænset. Væksten begrænses typisk af mangel på ressourcer eller plads.

Den efterfølgende fase kaldes for den *stationære fase* og er kendetegnet ved at populationsstørrelsen forbliver nogenlunde konstant, da antallet af nydannede bakterier svarer til antallet af bakterier der dør. I denne fase opbruger bakterierne typisk de sidste næringsstoffer og udskiller forskellige affaldsstoffer. På et tidspunkt er forholdene ikke længere gode nok til at bakterierne kan opretholde deres nødvendige livsprocesser, og populationen bevæger sig derefter over i den sidste fase hvor populationen falder i størrelse.

Den sidste fase kaldes for *dødsfasen* og er karakteriseret ved at antallet af bakterier der dør, overstiger antallet af nye, og derved falder antallet af levende bakterier. Nogle typer bakterier er i



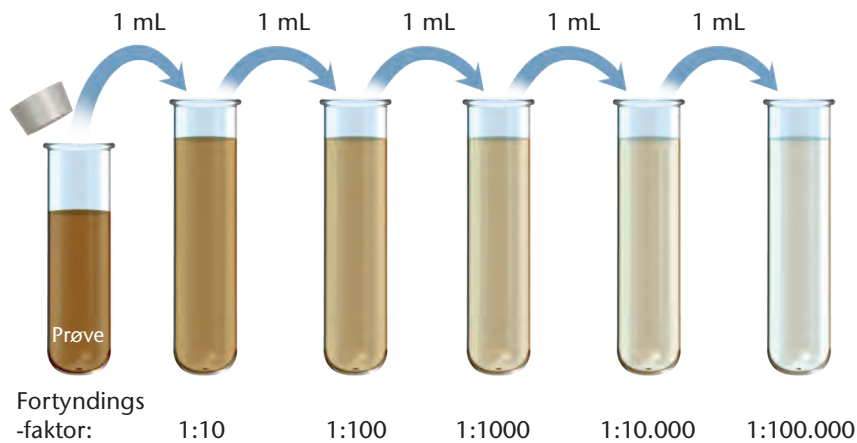
Figur 123. Den mikrobielle vækstkurves fire faser.

stand til at gå i en slags dvaletilstand i stedet for at dø og kan forblive i denne tilstand i meget lang tid indtil miljøforholdene eventuelt igen bliver gunstige.

Afhængigt af dyrkningsforholdene kan man påvirke hvor længe bakterierne vil befinde sig i de forskellige faser. Hvis man ser på kolonier på en agarplade, gennemgår hver koloni den mikrobielle vækstkurve, og ved at tage bakterier fra en koloni og udplade dem på nye agarplader kan man genstarte en ny nølefase efterfulgt af de andre faser. Ved dyrkning af bakterier i særlige gæringstanke er det muligt løbende at regulere på de abiotiske faktorer, fx ved at tilføre næringsstoffer og fjerne affaldsstoffer fra næringsmediet. Derved kan man opretholde en population af mikroorganismer i en stationær fase i meget lang tid. Dette kan være nyttigt hvis mikroorganismen i denne fase producerer stoffer, man ønsker, som fx enzymer eller hormonet insulin.

Koncentrationsbestemmelse af bakterier

Man kan bestemme koncentrationen af bakterier i en prøve på flere forskellige måder. I flere af metoderne er det en fordel først at lave en seriel fortynd-



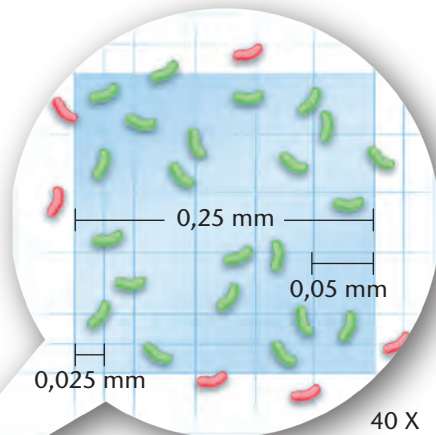
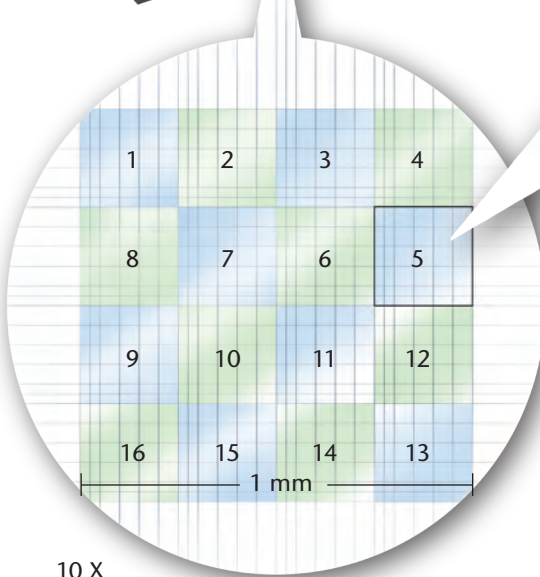
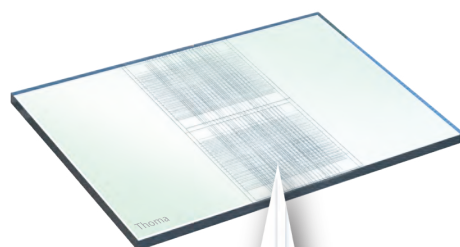
Figur 124. En faktor 10 fortyndingsrække laves ved hele tiden at overføre 1 mL af en opblandet prøve til 9 mL væske.

Princippet i en fortyndingsrække er vist i figur 124. Tre nyttige, men meget forskellige metoder til koncentrationsbestemmelse er beskrevet i de efterfølgende afsnit.

Optælling i tællekammer

Et tællekammer er egentlig blot et objektglas til mikroskopi hvorpå der er indridset et meget præcist optællingsnet med felter med en kendt volumen. Tællekammeret tilføres en prøve, og derefter tæller man antallet af bakterier i et antal felter. Hvis der er for mange eller få bakterier i tællekammeret til at man kan få et præcist mål, må man vælge en anden fortynding af prøven. Ud fra antal bakterier, den samlede volumen af de undersøgte felter og fortyndingsfaktoren kan den samlede koncentration af bakterier i prøven beregnes, se figur 125. Typisk laves flere forskellige tællinger hvorefter man beregner et gennemsnit af målingerne.

Figur 125. Et tællekammer kan bruges til at beregne koncentrationen af bakterier i en prøve.



Koncentrationsberegning

Felterne har en højde på 0,1 mm.
Felt 5 har derfor en volumen på:
 $V = 0,1 \text{ mm} \cdot (0,25 \text{ mm})^2 = 0,00625 \text{ mm}^3$

Der er 22 bakterier i felt 5.
Bakteriekoncentrationen bliver derfor:
 $\text{Konc.} = \frac{22 \text{ bakterier}}{0,00625 \text{ mm}^3} = 3.520 \frac{\text{bakterier}}{\text{mm}^3}$

Der går 1000 mm³ på 1 mL, det giver:
 $3.520.000 \frac{\text{bakterier}}{\text{mL}} = 3,52 \cdot 10^6 \frac{\text{bakterier}}{\text{mL}}$

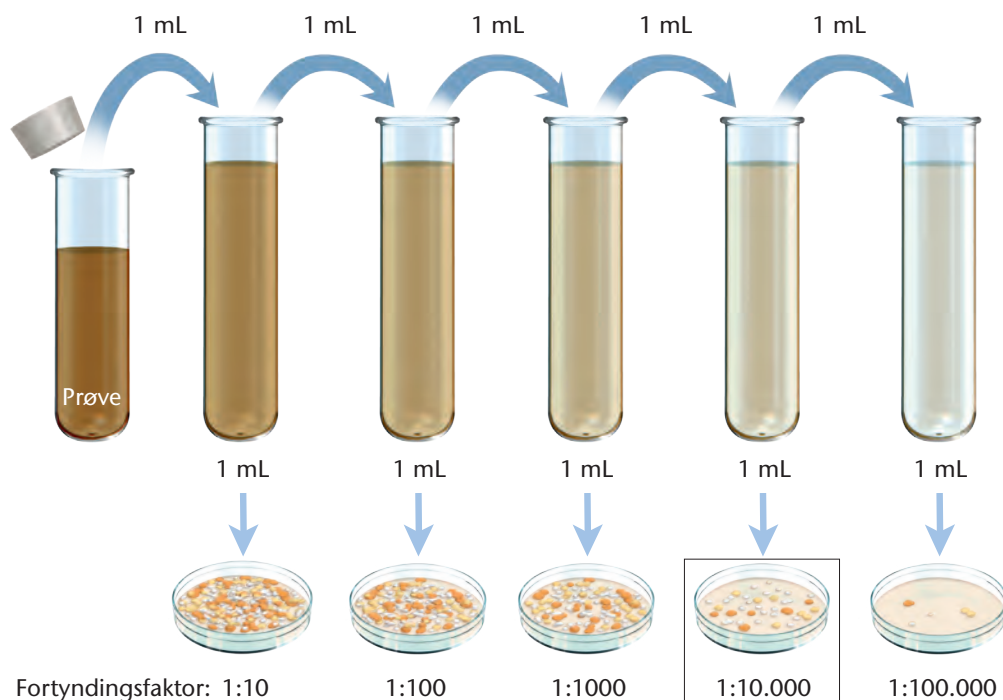
Antal kolonier ved pladeudspredning

Ved pladeudspredningsmetoden laver man en pladeudspredning af flere forskellige fortyndinger af prøven indtil man finder en fortynding, der giver et passende antal kolonier der er let at tælle. Der må dog ikke være så få at det giver for stor usikkerhed på målingen. Hver koloni stammer fra en bakterie fra den påførte prøve, og når man kender den tilførte volumen af prøven og fortyndingsfaktoren kan man derefter regne sig frem til, hvor mange bakterier der er i prøven, se figur 126. Som med tællekammermetoden laves der typisk flere målinger hvorefter man ta-

ger et gennemsnit af målingerne. Pladeudspredningsmetoden kan kun give brugbare målinger hvis man er i stand til at dyrke bakterierne på det valgte medie.

Absorptions- og turbiditetsmålinger

Hvis man ønsker at følge væksten i en flydende kultur af mikroorganismer, kan man enten benytte et spektrofotometer eller en turbiditetsmåler. Det grundlæggende princip i de to metoder er meget ens, men apparaterne der benyttes, er lidt forskellige og måler lidt forskellige ting.



Figur 126. Pladeudspredning af en seriel fortyndingsrække kan bruges til at beregne koncentrationen af bakterier i en prøve.

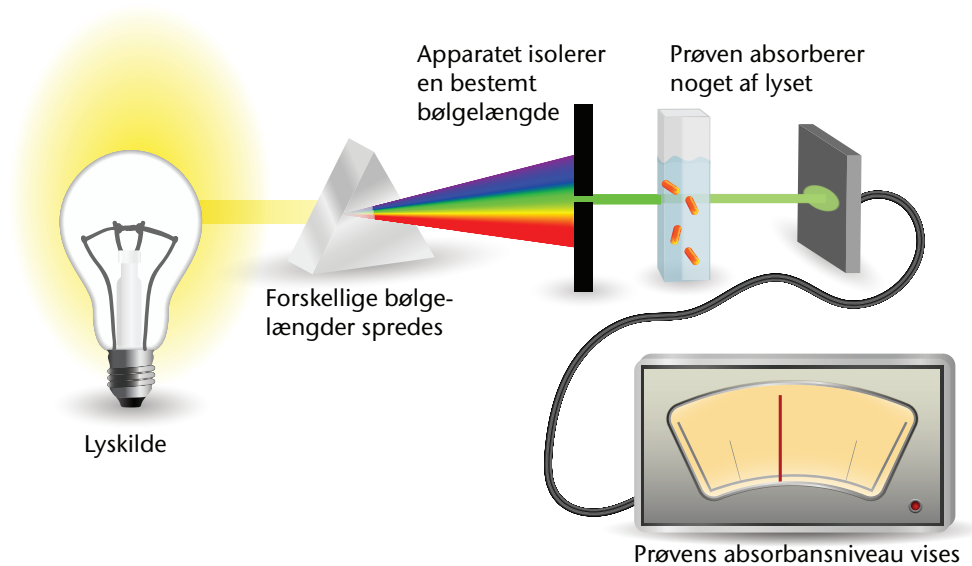
Koncentrationsbestemmelse

For det mest præcise resultat vælges normalt en plade med mellem 30 og 300 kolonier. Her opnås dette ved fortyndingsfaktoren 1:10.000, hvor der er 38 synlige kolonier.

Husk at en koloni stammer fra en bakterie i den oprindelige prøve. Koncentrationen findes ved at dividere antallet af kolonier med fortyndingsfaktoren.

$$\text{Koncentration} = \frac{38 \text{ bakterier}}{\frac{1}{10.000} \text{ mL}} = 380.000 \frac{\text{bakterier}}{\text{mL}}$$

Figur 127. Et spektrofotometer måler absorbans af lys ved en bestemt bølgelængde. Flere mikroorganismer i prøven giver en større absorbans.



Et spektrofotometer måler absorbansen af lys ved en bestemt bølgelængde. Da der er en sammenhæng mellem antallet af mikroorganismer i prøven og hvor meget lys der bliver absorberet, kan man løbende måle på væksten i en flydende kultur ved at udtage prøver, se figur 127. For at kalibrere målingerne benyttes typisk pladeudspredning eller tællekammermetoden på enkelte målinger.

Turbiditetsmålinger måler ikke absorbansen af lys, men derimod spredningen af det lys der sendes ind i prøven. Jo flere mikroorganismer i prøven lyset kan ramme, jo mere spredes lyset, og ved at måle hvor meget lys der rammer en detektor, fås et mål der korrelerer med antallet af mikroorganismer i prøven. Som ved spektrofotometermetoden er det nødvendigt at kalibrere målingerne med fx pladeudspredning eller tællekammermetoden hvis man ønsker en absolut koncentration og ikke blot relative målinger. I begge metoder kan det være hensigtsmæssigt at benytte en fortyndingsrække for at

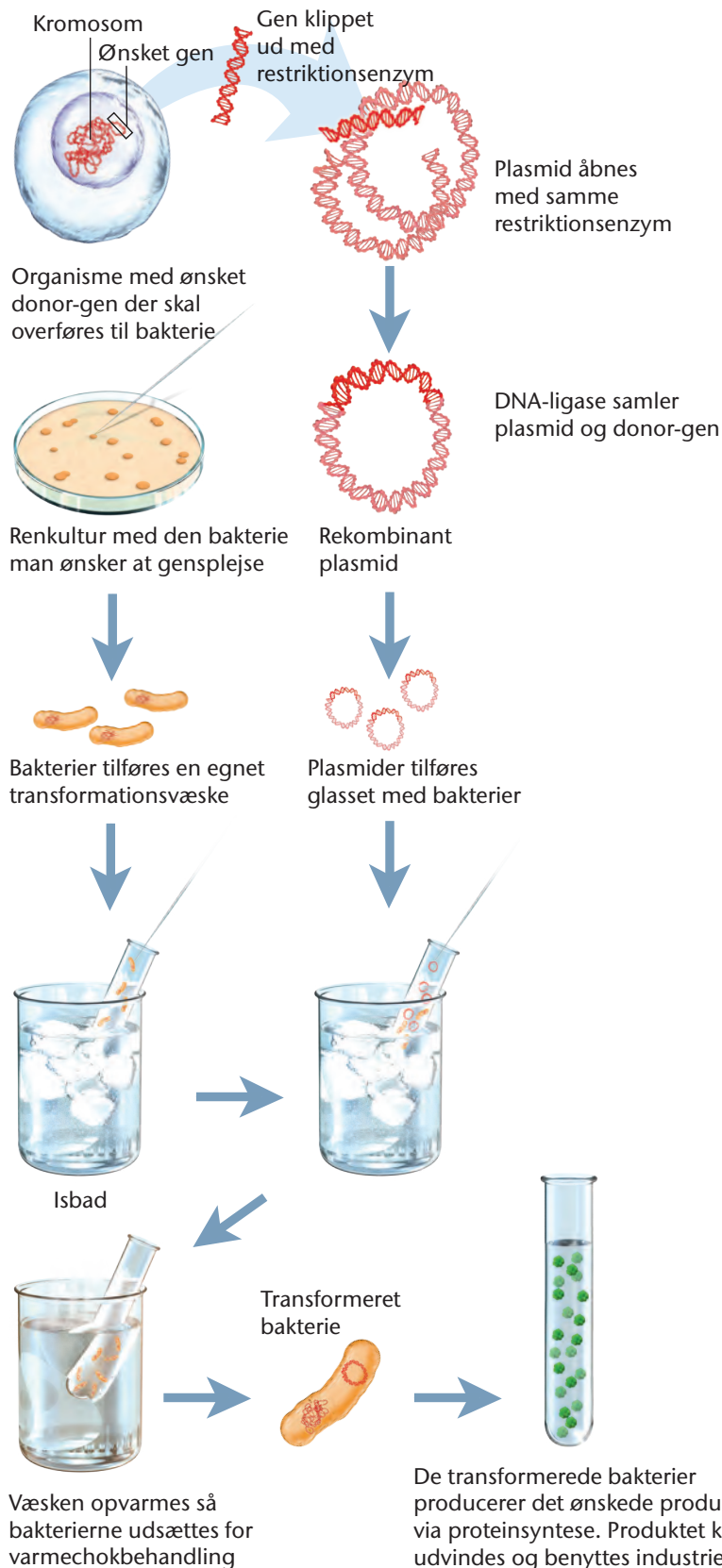
få præcise målinger, og også her er det ofte en god idé at lave flere parallelle forsøg og så tage et gennemsnit.

Industriell anvendelse af mikroorganismer

Mikroorganismer benyttes til mange ting i industrien. Som nævnt i kapitlet Anvendt bioteknologi kan de bl.a. bruges til produktion af alkohol, mejeriprodukter og antibiotika. Mange forskellige enzymer produceres og udvindes fra gæringstanke med mikroorganismer. I nogle tilfælde er det enzymer som mikroorganismen naturligt producerer. Man har typisk forædlet mikroorganismen så den producerer større mængder end normalt. I andre tilfælde er mikroorganismen blevet gensplejset og har fået indsat et gen der gør, at den laver et ønsket produkt som fx et enzym. Dette kan fx gøres ved hjælp af plasmid-transformation med rekombinante plasmider der indeholder det ønskede gen, se figur 128. Efter man har gensplejset bakterien til at producere det ønskede produkt, vil man typisk optimere produktionspro-

cesserne på forskellig vis. Det kan bl.a. være ved at optimere på temperatur, pH og næringsmediet. Bakterier muterer og der vil derfor opstå variation i en population af bakterier. Nogle bakterier vil over tid miste evnen til at producere det ønskede produkt på grund af mutationer, mens andre bakterier måske ved et tilfælde får en øget produktion. Ved løbende at screene og udvælge de bedst egnede bakterier kan man over tid forædle sin produktionsstamme og optimere produktionen.

Da der er flere forskelle på pro- og eukaryoters generelle genstruktur og proteinsyntese, er det nogle gange en fordel at producere de ønskede stoffer i en eukaryot organisme som fx gær. Hormonet insulin er et eksempel på dette. Folk der lider af diabetes 1, kan ikke selv producere det livsnødvendige hormon insulin i tilstrækkelige mængder og skal derfor have det tilført udefra. Da menneskets immunforsvar reagerer på fremmede proteiner, er det ikke uproblematisk at tilføre insulin fra fx svin eller køer som man ellers gjorde for mange år siden. I dag kan man producere human insulin i gensplejsede gærceller hvilket bl.a. sker på den danske virksomhed Novo Nordisk.



Figur 128. Plasmid-transformation af bakterie.

Billedliste

- Forside: Shutterstock.com: T-hjælpercelle og HIV partikler, Kateryna Kon; Coloradobille, Ivaschenko Roman.
- S. 97 figur 104, Shutterstock.com: a, nulinukas, b. Theeraphop, c. Choksawatdikorn.
- S. 97 figur 105, Christopher Allen Kirby.
- S. 99 figur 109, Shutterstock.com: a, Danny Smythe, b. Somchai Som.
- S. 100 figur 110, Chansom Pantip/Shutterstock.com.
- S. 102 figur 113, grebcha/Shutterstock.com.
- S. 102 figur 114, Public domain, Medimicro/Wikipedia.
- S. 103 figur 116, Everett Historical/Shutterstock.com.
- S. 112 figur 127, Shutterstock.com: Apparater, extender_01; Bakterier, Designua.