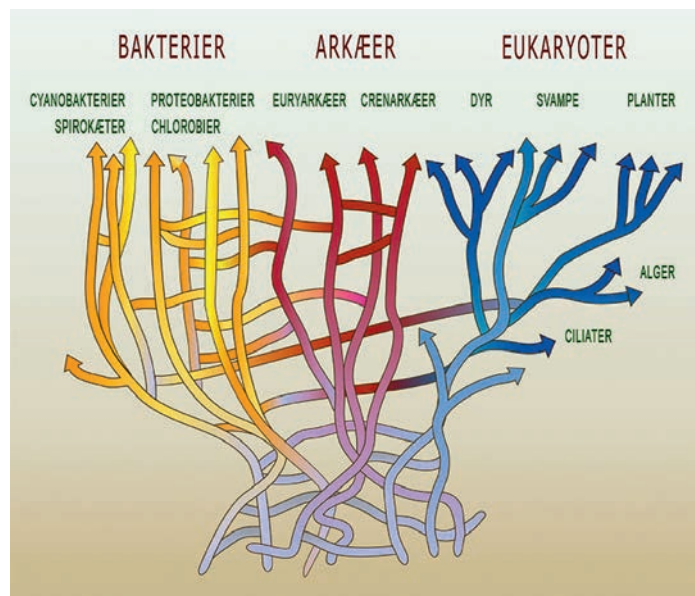


Alle bakterier deler gener ved horisontal overførsel

Bakterier har ikke blot en langt større mangfoldighed i deres stofskifte end dyr og planter. Ny forskning viser, at de også i stor stil udveksler gener, der koder for dele af deres stofskifte med andre bakterier. Det giver bakterier mulighed for at tilpasse sig nye levevilkår, men betyder også at forståelsen af begrebet »bakteriearter« er kontroversiel

Af Niels-Ulrik Frigaard, Institut for Molekylær Biologi, Københavns Universitet

Bakterier kan se nok så kedelige ud under mikroskopet – ofte ligner de blot en lille partikel uden særlige kendetegn. Men denne tilsyneladende ensformighed dækker over en stor mangfoldighed i stofskifte, der gør bakterier i stand til at udføre et væld af kemiske reaktioner og leve under særdeles forskellige fysiske og kemiske forhold. Mikrobiologer siger gerne, at hvis der er en kemisk reaktion, der kan give lidt energi, så er der nok en bakterie, der kan udnytte denne reaktion til vækst. F.eks. kan *kemotrofe* bakterier generere energi ved at nedbryde og oxidere kemiske forbindelser så forskellige som cellulose, organiske syrer, ammoniak, svovlbrinte og metaller, mens *fototrofe* bakterier absorberer energien fra sollys og konverterer den til kemisk energi. Men i bakteriernes verden kan det være svært at holde en god idé for sig selv. Som eksempel beskrives her, hvordan en simpel egenskab, der gør bakterier *fototrofe* (dvs. i stand til at udnytte sollysets energi), uventet har spredt sig til mange vidt forskellige mikroorganismer i havets overflade.



Figur 1. Livets udvikling afbildes ofte som et træ, hvor én art bliver til to nye arter (vertical gene transfer). Men denne model holder ikke for bakterier og visse andre mikroorganismer som arkæer, fordi disse mikroorganismer udveksler gener mellem arterne (horizontal gene transfer). Dyr og planter evolution er her illustreret med vertikale linjer, mens bakteriers og arkæers evolution er afbildet med både vertikale og horisontale linjer.

Boks 1. Hvad er en bakterieart?

Hos dyr og planter er en *art* en gruppe af individer, der kan yngle indbyrdes og derfor ligner hinanden genetisk. Denne definition er ubrugelig over for bakterier, som formerer sig aseksuelt. Man har derfor i over 100 år temmelig løst defineret en *bakterieart* som en gruppe af bakterier »der har en meget høj grad af lighed« med hensyn til fysiologiske egenskaber.

Det er inden for de sidste 10-20 år blevet almindeligt at sige, at hvis to bakterier har 16S rRNA-sekvenser, der er mindst 97% identiske tilhører bakterierne den samme art. Men på grund af HGT kan det ikke udelukkes, at sådanne to bakterier har hundredvis af forskellige gener, der kan give dem vigtige forskellige egenskaber, og derfor er der ikke enighed om brugbarheden af denne definition.

En entydig identifikation af en bakterie kan gives ved dens *stammebetegnelse*. En bakteriestamme er en gruppe af individer opdyrket fra én enkelt celle, som derfor i princippet er genetisk identiske (kloner). Ved bakteriologisk arbejde er det ofte helt afgørende at kende stammebetegnelsen. Når en bakteries genom er blevet sekventeret, opgives bakteriens stammebetegnelse altid.

Ny teknik finder alle generne

Alt hvad en bakterie er, og hvad den kan, bestemmes af dens indhold af gener (dens *genom*). Generne udgøres af cellens DNA, og en fritlevende bakterie har typisk mellem ca. 1.300 og 10.000 forskellige gener, mens endosymbiotiske bakterier kan klare sig med blot 500–600 gener. Kun nogle få hundrede gener findes i alle typer af bakterier, og disse koder for de mest basale funktioner såsom DNA- og proteinsyntese. Resten af generne koder for mere specielle fysiologiske funktioner, der afgør hvorledes bakterien lever, og hvordan den adskiller sig fra andre bakterier. Det kan være enzymer, der nedbryder og omsætter bestemte stoffer, eller enzymer som syntetiserer stoffer, der udskilles af cellen for at kommunikere med eller bekæmpe andre organismer. Indtil for få år siden kendte man kun til en meget lille del af de gener, der koder for alle de enzymer og andre proteiner, der findes i bakterier.

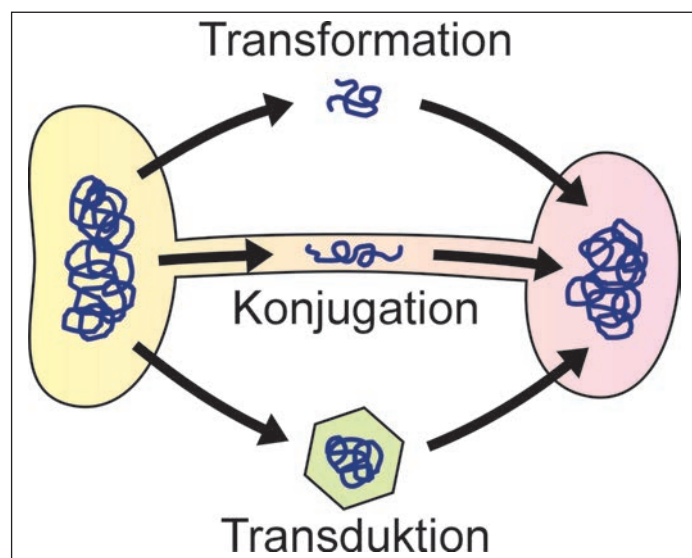
På grund af forbedringen og billiggørelsen af DNA-sekventering er det nemlig først inden for de sidste 10-15 år blevet muligt at sekventere hele genomer fra bakterier. Flere hundrede genomsekvenser er i dag tilgængelige via internettet [1], og over 1000 forskellige bakterier vil om få år have fået deres genom

sekventeret [2]. En af de store overraskelser ved disse genomsekvenser er den store grad af udveksling af gener, der har fundet sted mellem bakterier. Det viser sig nemlig, at fjernt beslægtede bakterier kan have mange af de samme gener, mens nært beslægtede bakterier kan have mange vidt forskellige gener. F.eks. har genomsekventering vist, at en *Escherichia coli*-bakterie, der eksisterede for få millioner år siden, i dag har udviklet sig, dels til den harmløse *Escherichia coli*-stamme K-12 med cirka 4405 gener, og dels til den sygdomsfremkaldende *Escherichia coli*-stamme O157:H7 med cirka 5416 gener, og at kun cirka 3877 af disse gener findes i begge stammer [3]. Dette skal ses i forhold til, at mikroorganismer har udviklet sig konstant over mindst 3½ milliarder år på jorden.

DNA overføres naturligt mellem bakterier

Denne forskel skyldes, at bakterier både kan eliminere gener, der ikke er vigtige, og optage nye gener fra andre bakterier. Optagelse og integrering af fremmed DNA i en organisme kaldes for *horizontal gene transfer* (HGT) på engelsk – *horisontal* fordi generne overføres mellem forskellige celler i modsætning til *vertical gene transfer*, hvor generne gives videre til næste generation ved celledeling. Plante- og dyrearter oplever (stort set) kun *vertical gene transfer* (figur 1).

Der kendes kun tre naturlige mekanismer, hvorved DNA kan optages af bakterier (figur 2). Ved *transformation* optages DNA direkte fra miljøet. Dette DNA kan stamme fra nedbrydning af døde celler. Visse bakterier har specifikke enzymer, der aktivt optager sådant DNA. I laboratoriet kan transformation induceres ved kemisk eller elektrisk behandling af cellerne. Ved *konjugation* danner cellerne et rør mellem sig, hvori

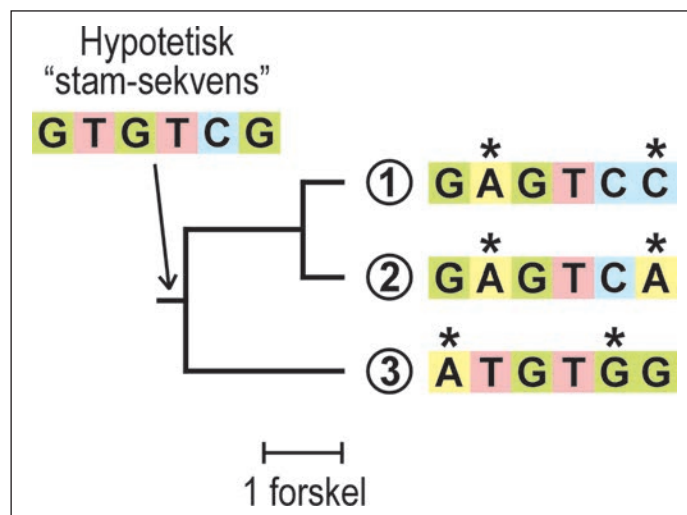


Figur 2. Mekanismer hvorved gener (DNA) kan overføres mellem bakterier.

DNA'et overføres fra den ene til den anden bakteriecelle. DNA overført ved konjugation er typisk små cirkulære DNA-molekyler kaldet plasmider. Ved transduktion overføres DNA fra et virus til en celle. Dette DNA indeholder primært gener, der koder for virusens reproduktion, men i nogle tilfælde indeholder DNA'et også gener hentet fra en tidligere værtscelle.

Klassifikation via ikke-HGT-gener

Blandt biologer tilstræbes det gerne, at



Figur 3. Eksempel på et simpelt fylogenetisk træ der illustrerer, hvordan de tre korte DNA-sekvenser 1, 2, og 3 kan tænkes at have udviklet sig fra en hypotetisk »stam-sekvens« ved mutationer. Sekvens 1 og 2 er tættest beslægtede med hinanden (1 forskel), mens de er fjernest beslægtede med sekvens 3 (4 forskelle). Træet er konstrueret således, at længden af de vandrette linjer mellem de fire viste sekvenser er lig med antallet af forskelle.

klassifikation af organismer er i overensstemmelse med deres evolution. Derfor har HGT været medvirkende til stor frustration ved klassifikation af bakterier, og HGT var en af grundene til, at en tilfredsstillende klassificering af bakterier stort set var blevet opgivet indtil 1970'erne. Det har imidlertid vist sig, at nogle få gener tilsyneladende ikke, eller i hvert fald meget sjældent, udsættes for HGT.

Det drejer sig især om de gener, der koder for de organeller, der syntetiserer protein i cellen, *ribosomerne*, og som findes i alle organismer. Det er hovedsagelig ét af disse gener, det såkaldte *small subunit* (SSU) ribosomale RNA-gen (i bakterier også kaldet 16S rRNA-genet) som er ca. 1500 basepar langt, der er blevet anvendt. Ved at sammenligne sekvensen af 16S rRNA-gener fra mange organismer kan man lave et såkaldt *fylogenetisk træ*, der viser evolutionen af dette gen (figur 3). Idet 16S rRNA-genet, så vidt det vides, ikke udsættes for HGT, er dette træ altså også en illustration af organismernes evolution.

Klassificering baseret på 16S rRNA-sekvensanalyse danner i dag grundlag for taksonomisk arbejde med alle mikroorganismer (boks 1). Gruppering af mikroorganismer baseret på 16S rRNA-sekvenser har i stor udstrækning vist sig brugbar, i og med at mange vigtige fysiologiske egenskaber er begrænset til en eller få grupper. Man kan altså til en vis grad forudsige en mikroorganismes egenskaber ud fra dens 16S rRNA-sekvens.

HGT mellem havets mikroorganismer

I havvand kan der leve op til 1 milliard bakterier og arkæer pr. liter. Indholdet af næringsstoffer er lavt i havvand, og

SKANLAB

Retsch
Solutions in Milling & Sieving

www.skanlab.com

retsch@skanlab.com

Rietschle Thomas

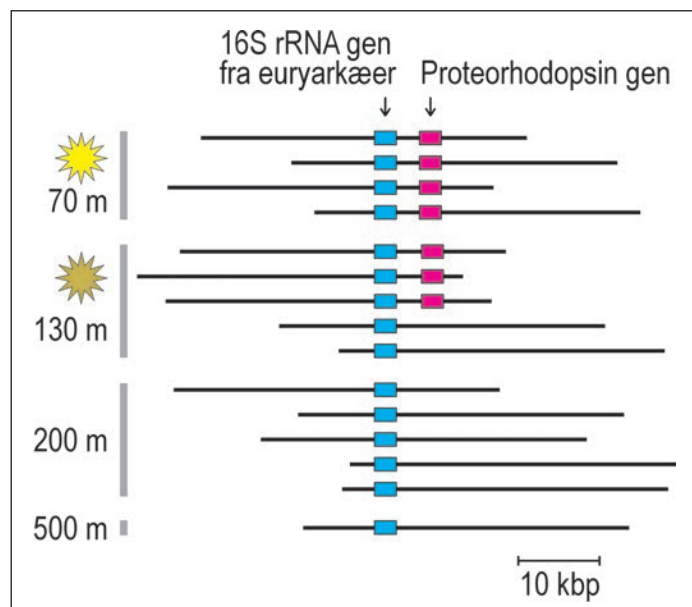
Vakuumpumper
Lavtrykskompressorer
Sidekanalblæsere

www.rtpumps.dk
e-mail: rtpumpsdk@rtpumps.com
+45 59 44 40 50

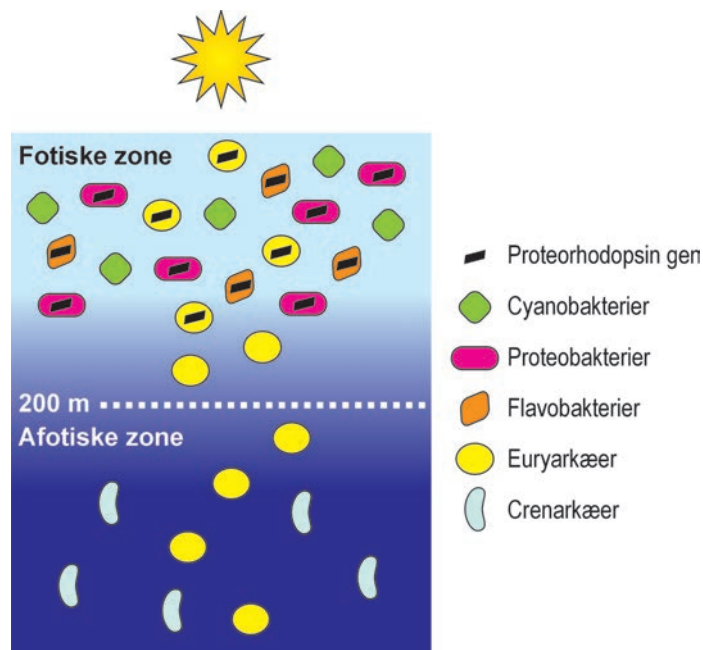
derfor er der stor konkurrence blandt mikroorganismene om de tilstedeværende ressourcer. Det er velkendt, at fotosyntetiske mikroorganismer (alger og cyanobakterier) indfanger solens lys og konverterer det til kemisk energi, ligesom landjordens planter gør det. Det var derfor overraskende, da man for få år siden fandt en type proteobakterier, der tilsyneladende også kan bruge sollysets energi, men ved anvendelse af et helt andet system, nemlig enzymet *proteorhodopsin* [4]. Når proteorhodopsin absorberer lys, transporterer det protoner over cellemembranen. Derved dannes en elektrokemisk gradient, der af cellen kan bruges til forskellige energikrævende processer såsom optag af næringsstoffer og syntese af cellekomponenter.

Det er for nylig blevet undersøgt hvilke typer af Stillehavets bakterier og arkæer, der har proteorhodopsin [5]. Genomisk DNA blev oprenset fra havplankton af størrelsen 0,2–1,6 µm og undersøgt for proteorhodopsin-genet. Ca. 10.000 tilfældige DNA-fragmenter fra 5 forskellige dybder blev isoleret og klonet. Fragmenterne blev klonet i fosmid-vektorer og havde derfor en rimelig ensartet størrelse på ca. 40.000 basepar. Hvert fragment indeholder derfor ca. 40 gener, der helt sikkert kommer fra den samme organisme. Fragmenterne blev screenet ved DNA-hybridisering med prober af forskellige gener, bl.a. arkæ 16S rRNA og proteorhodopsin. Ud fra 16S rRNA-undersøgelserne blev det således fundet, at nogle af fragmenterne kommer fra en art af euryarkæer, der ikke kan dyrkes i laboratoriet, men som kun kendes fra DNA-undersøgelser af havplankton (figur 4). Temmelig overraskende indeholdt fragmenterne isoleret fra de øverste belyste lag i havet (den *fotiske zone*) også et proteorhodopsin-gen, mens fragmenterne isoleret fra de dybereliggende mørke lag (den *afotiske zone*) ikke havde det. En optælling viste, at alle euryarkæer i den fotiske zone tilsyneladende har proteorhodopsin, mens ingen af euryarkæerne i den afotiske zone har det.

Disse undersøgelser kan ikke med klarhed afgøre, om proteorhodopsin er blevet overført fra proteobakterierne til euryarkæer i den fotiske zone, eller omvendt. Efterfølgende undersøgelser af andre DNA-fragmenter har vist, at mange andre typer af bakterier i den fotiske zone også har proteorhodopsin, f.eks. visse flavobakterier og planktomyceter som ellers blev antaget



Figur 4. DNA-fragmenter fra euryarkæer fra forskellige dybder i Stillehavet. Fragmenterne indeholder alle et 16S rRNA-gen fra euryarkæer. Kun fragmenter fra den fotiske zone i havet (70 og 130 m dybde) har proteorhodopsin-genet. Cellerne, hvorfra disse fragmenter stammer, har sandsynligvis modtaget proteorhodopsin-genet fra andre mikroorganismer ved HGT.



Figur 5. Illustration af nogle af de forskellige bakterier og arkæer der findes i havet. De fleste af bakterierne og arkæerne i den øverste belyste fotiske zone af havet har proteorhodopsin, som de sandsynligvis har udvekslet mellem sig ved HGT.

for udelukkende at leve kemotroft [6]. Uanset hvem af disse mikroorganismer der »opfandt« proteorhodopsin, er det tydeligt, at dette simple enzym har spredt sig til mange forskellige organismer i havets fotiske zone, fordi det giver organismene en konkurrencemæssig fordel at kunne ekstrahere en smule af sollysets energi (figur 5).

Dette illustrerer et vigtigt biologisk princip: Ligesom man kan forestille sig, at en organisme, der er optimalt tilpasset et bestemt miljø, nemt kan sprede sig i hele miljøet, kan man altså have gener, der tilsvarende er optimalt tilpasset et bestemt miljø og derfor spredt sig til mange forskellige organismer i det miljø.

Hvor ofte sker HGT?

I molekylærbiologiske laboratorier anvendes forskellige former for HGT rutinemæssigt på mange forskellige organismer. Men det er svært at estimere naturlige HGT-frekvenser. HGT sker givetvis oftere i jord og i biofilm, hvor mikroorganismerne lever meget tættere sammen end i f.eks. havvand. Det vides også, at HGT sker oftere mellem nært beslægtede bakterier end mellem fjernt beslægtede bakterier. Det skyldes bl.a. naturlige barrierer, der hæmmer DNA-overførsel (figur 2) mellem fjernt beslægtede bakterier. Visse typer egenskaber som f.eks. antibiotikaresistens overføres relativt hurtigt via plasmider. Det er uvist, hvordan proteorhodopsin som beskrevet ovenfor er udvekslet mellem så fjernt beslægtede mikroorganismer som bakterier og arkæer, men den store udspreddelse skyldes sikkert til dels dette enzyms enkelhed. Meget komplekse enzymesystemer som fotosyntese og metanogenese overføres ganske givet særdeles sjældent.

Vores udnyttelse af den mikrobielle mangfoldighed

Bioteknologer prøver at udnytte de enzymer og andre stoffer mikroorganismer producerer til praktiske formål. Det er i denne sammenhæng vigtigt at forstå de grundlæggende principper for bakteriell evolution, herunder HGT. F.eks. kan den egenskab, man er interesseret i, have spredt sig til uventede mikroorganismer på en måde, der mere afspejler organismens miljø

end organismens taksonomiske gruppering. Da langt de fleste mikroorganismer ikke kan dyrkes eller undersøges i ren kultur, skal det understreges, at kultiverings-uafhængige, DNA-baserede *metagenomics*-metoder, som den beskrevet ovenfor, kan give et værdifuldt indblik i mikroorganismernes mangfoldighed.

E-mail-adresse

Niels-Ulrik Frigaard: nuf@mermaid.molbio.ku.dk

Referencer

1. National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes>).
2. Genomes Online Database (<http://www.genomesonline.org>).
3. Perna NT, Plunkett III G, Burland V, Mau B, Glasner JD, et al. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-533.
4. Beja O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, et al. (2000) Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289:1902-1906.
5. Frigaard N-U, Martinez A, Mincer TJ, DeLong EF (2006) Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic *Bacteria* and *Archaea*. *Nature* 439: 847-850.
6. McCarren J, DeLong EF (2007) Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-evolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla. *Environ. Microbiol.* 9:846-858.

KIKS VED THORVALD PEDERSEN

Om øller og deres opvarmning

Kære Thorvald

Jeg haaber, at du er »still going strong« - og at du stadig har interesse i at udforske og »løse« smaa problemer ang. mad og drikke. Jeg sender dig her et problem, som en af mine tidligere elever har stillet mig maaske er svaret ligetil maaske er det mere subtilt end som saa ...!? OK! 2 øl tages ud af køleskabet (de har dermed samme temperatur) og stilles foran dig paa sofabordet. Den ene øl knappes op, den anden staar urørt med kapsel paa. I hvilken af de to øl vil man med tiden observere den hurtigste temperaturstigning...??? Jeg bilder mig ind, at det har noget at gøre med afgasning af carbondioxid + vand-fordampning fra den opknappede øl, men der vil vel hurtigt dannes et carbondioxid-lag over øl-overfladen, som vil mindske fordampningen ... hermed kommer varmekapaciteten ind i billedet ... endvidere: Hvor sætter vi grænsen mellem system og omgivelser ...? Jeg erindrer, at du engang har skrevet lidt om dette i Dansk Kemi i forbindelse med en »javertus« i det »kulsyre-bad«, som en opskænket Harboe paaskebryg repræsenterede her postulerede du nogle CO₂-H₂O-addukter samt en hydratisering af carbondioxid i »boble-fasen«. Anyway, er effekten mon saa stor, at den kan maales...?

Venlig Hilsen

Henrik Svanholt

Kære Henrik

Jeg er tilbøjelig til at se bort fra eventuelle varmetoninger fra dehydratiseringen af CO₂-(aq), jeg tror de må være svage. Det som jeg tror betyder noget for opvarmningen, er kondensation af vanddamp fra luften (dug på flaske og kapsel). Der er lige kapslen til forskel på de to øl, den åbne savner den (lille) ekstra flade at kondensere på, for jeg tror, at CO₂-udslippet forhindrer luft/vand i at komme ned gennem flaskehalsen. Konklusion: den lukkede flaske opvarmes (marginalt) hurtigere. Men andre må gerne blande sig. Mvh

Thorvald

ThP

Ph.d.-projekt

Usikkerhed i videnskab med politisk relevans

Ingeniører og videnskaber fungerer – ud over som leverandører af den fornødne ekspertviden og tekniske knowhow til offentlige organer – som en vigtig kilde til legitimering af lovindgreb. Ifølge den gældende liberale filosofi bør de lovgivende autoriteter kun gribe ind i tilfælde, hvor udviklingen kan have skadelige konsekvenser. Deres beslutninger bør hvile på fakta, der ideelt set vurderes inden for rammen af en ren rationel metode – som f.eks. risikovurdering – så man herigennem sikrer, at tolkningen af de foreliggende data bliver så objektiv som muligt. Dette kan være problematisk i situationer, hvor den videnskabelige viden er begrænset, de tilgængelige data usikre, indsatsen høj og de involverede værdier er i konflikt.

I mange tilfælde er de lovrelaterede emner, som forskere og ingeniører bliver bedt om at behandle, langt mere komplekse end dem, der typisk optræder i laboratoriet. Den eksisterende viden er ofte begrænset og dataene usikre. Den populære fællesbetegnelse »usikkerhed« dækker reelt over vigtige tekniske skel. Det veletablerede usikkerhedsbegreb udelader – når det alene benyttes som et statistisk eller sandsynlighedsberegrende begreb – vigtige aspekter af den usikkerhed, man møder i behandlingen af komplekse lovmæssige problemer: f.eks. den usikkerhed, der opstår som et resultat af formodninger og af ignorering af årsag-virkningsforhold.

Denne afhandling illustrerer, hvordan et nyt begrebsapparat for usikkerhedsanalyse, the Walker & Harremoës (W&H) framework, kan anvendes. Begrebsapparatet sammenfatter et udvalg af videnskabelige behandlinger af usikkerhed for herigennem at skabe et tværfagligt, teoretisk metoderedskab for systematisk usikkerhedsanalyse. Usikkerhed defineres bredt som *enhver afvigelse fra det uopnåelige ideal for totalt determinérbar viden omkring det pågældende system*.

W & H-begrebsapparatet skelner mellem tre grundlæggende dimensioner af usikkerhed: usikkerhedens *lokalitet*, *niveau* og *art*.

W&H-begrebsapparatet blev anvendt til at analysere to feltarbejder med relation til risikovurderingen af genetisk modificerede afgrøder: i) risikoen for at udvikle »super-ukrudt« gennem brugen af sprøjtegift tolerante rapsfrø og ii) risikoen for »transgenic silencing«. Eftersom de involverede eksperter ikke var bekendt med W&H-begrebsapparatet, blev interview benyttet til at kommunikere begrebsapparatet til eksperterne på en måde, så deres viden om usikkerhed blev bevaret uden unødigt irritation eller forvirring ift. nyheden af begreber, de blev præsenteret for.

De opnåede resultater indikerer – undtaget indsatsen for at klarlægge forholdet mellem de fremsatte begreber i W&H-apparatet – at eksperterne ikke benyttede disse begreber konsekvent. Ikke desto mindre resulterede deres tilgang i en fordybelse og forankring af eksplicitte usikkerhedsniveauer ift. den traditionelle statistiske usikkerhed. Ligesom det gælder begrebet »risiko«, vil forskellige mennesker have forskellige (subjektive) definitioner af begrebet »usikkerhed«. Forskernes tilgang afslørede, at der eksisterer et udvalg af perspektiver på den usikkerhed, som karakteriserer de behandlede emner. Selv om resultaterne af forsøg som dem, der her er blevet foretaget, kan virke tvetydige, udgør de således et værdifuldt bidrag til diskussionen om kvaliteten af den information, der udgør grundlaget for regulative beslutninger.

M. Krayen von Krauss,
Institut for Miljø & Ressourcer, DTU