



Grand Prismatic Spring i Yellowstone National Park, USA, är världens tredje största heta källa. De färgade områdena är grupper av mikroorganismer som lever i olika temperaturzoner.
Foto: Erik Pelve

Arkéer – mikrobiologisk mångfald

Arkéer finns överallt, i vattnet, i jorden och i vårt eget tarmsystem. De är viktiga för livets utveckling, klimatet på jorden, hur de stora näringskretsloppen fungerar, vårt sökande efter liv i universum och vår förståelse för hur våra egna celler blev till och fungerar. Men trots det vet vi fortfarande väldigt lite om dem. Erik Pelve, som forskar på arkéer vid Uppsala universitet, ger här en glimt av den kunskap som finns om mikrobiologins doldisar.

Text: Erik Pelve, forskare vid Institutionen för cell- och molekylärbiolog, Uppsala universitet
E-post: erik.pelve@icm.uu.se

Vad är en arké? Det enklaste är att berätta vad en arké inte är. En arké är inte en bakterie. På samma sätt som en groda inte är en padda, en fågel inte är en ödla och en människa inte är en svamp så tillhör arkéer och bakterier olika släktled – utseendemässigt lika och besläktade, men skilda åt av mer än tre miljarder års evolutionshistoria.

Arkéer är små (<10 µm) encelliga mikroorganismer utan cellkärna, precis som bakterier, men deras celler fungerar annorlunda. Deras cellhölje har unika komponenter, deras centrala cellmaskineri fungerar på ett annat sätt och de är inblandade i viktiga biokemiska processer, ibland tillsammans med bakterier. De mest välstuderade arkéerna lever i heta källor (*Sulfolobus*), saltbassänger (*Halobacterium*) och syrefria bottenar (*Methanococcus*). De är också vanliga i jord och i vatten (*Nitrosopumilus*).

Tre stammar på livets träd

Biologer behöver kunna namnge och kategorisera organismer men mikroorganismer har en viss vägrat placeras i fack. Till synes identiska stammar kan vara viktiga för kroppens funktion eller orsaka sjukdomar. Vad som verkar vara helt olika arter kan ha identiska uppgifter i miljön. På samma sätt som Carl von Linné använde ståndare och pistiller för att skilja växter åt behövdes en "streckkod" som kunde användas för att sor-

tera mikroorganismer. Det var när man fann en lämplig genetisk markör (streckkod) som man också hittade arkéerna.

Som så mycket annat i vetenskapshistorien skedde upptäckten av arkéerna av en slump. Det var år 1977, samma år som den första Star Wars-filmen kom ut, när den amerikanska forskaren Carl Woese letade efter ett nytt sätt att klassificera bakterier. Han använde en genetisk markör kopplad till ribosomen och till sin förvåning upptäckte han inte en, utan två grupper. Den ena gruppen bestod av välkända bakterier, som *Escherichia coli* och *Salmonella enterica*. Den andra bestod av en obskyr samling mikrober från syrefria bottenar och heta källor. Carl Woese kallade den sistnämnda gruppen arkebakterier efter det grekiska ordet för "uråldrig". Deras livsstil påminde honom om förhållanden som tros ha rått på jorden i den geologiska tidsåldern arkeikum, för mer än tre miljarder år sedan, då det första livet bildades. Man har senare hittat många arkéer som lever i andra miljöer. Men forskare använder fortfarande arkéer som en modell för hur det första livet kan ha sett ut – trots att moderna arkéer givetvis har formats av miljarders år evolutionshistoria, precis som allt annat liv.

När man på 1990-talet slutligen bröt ut gruppen arkéer från bakterier var man tvungen att införa en ny taxonomisk grupp – domän – för att

beskriva skillnaden mellan dem. Domän är den mest grundläggande indelningen av levande organismer. Det finns tre domäner: arkéer, bakterier och den grupp vi själva tillhör – eukaryoter.

Carl Woese's fynd har haft enorm betydelse för vår förståelse av hur livet fungerar, framför allt i tre avseenden: Han upptäckte den mikrobiologiska streckkoden, han upptäckte att arkéer och bakterier är skilda grupper och han upptäckte också att arkéer är närmare släkt med eukaryoter än med bakterier. Arkéerna är alltså nyckeln till att förstå vårt eget ursprung.

Eukaryoternas anfader

När man tittar på arkéer i mikroskop ser de ut som bakterier – små, runda eller stavformade påsar, ibland med en svans som de simmar med. De flesta eukaryoter är encelliga, precis som bakterier och arkéer, men de är större och har en mer avancerad cellstruktur med olika delar och rum som olika reaktioner sker i. Men om man jämför de delar av cellmaskineriet som styr hur genetisk information används är arkéerna direkt jämförbara med eukaryoterna – men med mycket enklare komponenter som är lättare för forskare att förstå. Detta utnyttjas bland annat inom cancerforskning, eftersom det låter oss studera hur cellen hanterar informationen i sitt DNA.

Eukaryoterna har funnits i ungefär två miljarder år och tros härstamma från en arké och en bakterie som utvecklade ett symbiotiskt samarbete. I endosymbiontteorin, formulerad av Lynn Margulis, bidrog arkén med centrala cellfunktioner och bakterien, som tillhörde klassen alfa-proteobakterier, kom att bli den energiproducerande mitokondrien. Fram tills nyligen visste man inte vilken grupp bland arkéerna som eukaryoter är närmast släkt med, men ny forskning från Uppsala universitet pekar på en grupp hittills nästan okända arkéer som hittades på havsbotten utanför Island: Lokiarkéerna. Upptäckten att eukaryoter inte bara är nära släkt med arkéer utan härstammar från en av deras undergrupper har fått vissa forskare att ifrågasätta uppdelningen i tre domäner. På precis samma sätt som fåglar är en undergrupp till dinosaurier är eukaryoter en undergrupp till arkéer. Enligt det tankesättet finns bara två domäner – och vi är arkéer.

Världsbyggare och klimatbovar

De mest välkända arkéerna lever i extrema miljöer: heta källor, undervattensvulkaner, syrapölar, saltbassänger och syrefria bottenar. Astrobiologer från NASA och ESA är mycket intresserade av arkéer eftersom de vidgat vår förståelse för i vilka förhållanden liv kan finnas. Temperaturrekordet för levande organismer innehas av en arké

som delat sig vid 121 °C – samma temperatur vid vilken sjukhus steriliserar sin utrustning. Det finns dock inga arkéer som orsakar sjukdomar, så vitt man vet. Det är extra tursamt då de flesta typer av antibiotika inte verkar på arkéer, eftersom deras celler är så olika bakteriers.

På senare år har man också hittat arkéer i mindre extrema miljöer. I både jord och vatten är de viktiga för både kolets och kvävet's kretslopp. I många miljöer, framförallt med lågt pH-värde och lite syre, står de för en större del av omsättningen av ammoniak än bakterier. De är också den enda levande organism man känner till som producerar växthusgasen metan. När kor och får rapar metan är det för att metanogena arkéer i deras tarmar producerat metan som en del i deras matsmältning. Det finns arkéer i vår tarmflora också. Den mest välstuderade är *Methanobrevibacter smithii* som tillsammans med bakterier hjälper till vid nedbrytning av sockerarter.

Den tredje domänen

Här har jag bara skrapat på ytan om vad arkéer är och varför de är intressanta. Det är trots allt en egen grupp levande varelser med en egen evolutionshistoria, unika egenskaper och en fundamental påverkan på vår värld och vårt eget ursprung. Om och om igen utmanar arkéer vår förståelse för hur livet fungerar. Jag skulle kunnat skriva om de fyrkantiga och trekantiga arkéer som lever i saltsjöar. Eller om arkéers virus som inte liknar någonting man sett i vare sig bakterier eller eukaryoter och som rymmer en mångdubbelt större variation. Eller om hur svansarna de simmar med är fundamentalt olika bakteriers flageller och är ett perfekt exempel på hur samma egenskap kan uppstå oberoende flera gånger genom konvergent evolution. Jag hoppas dock att exemplen jag tagit upp ger en känsla för hur lite vi fortfarande vet om livet omkring oss och hur mycket som ännu återstår att upptäcka om "minsta kräk i kärr och syra".

Diskutera arkéer i klassen

- Livets ursprung och astrobiologi: Vilket liv fanns på den tidiga jorden och vilka möjligheter för liv kan det finnas på andra planeter?
- Grunden till komplext liv: Hur bildades den eukaryota cellen?
- Cellmodeller: Vilka likheter och skillnader finns mellan eukaryoter, bakterier och arkéer?
- Livets träd: Hur används DNA-studier för att förstå släktskap?
- Livets gränser: Vad lär oss extremofiler om var det kan finnas liv?
- Virus, mångfald och funktion: Varför finns det så många olika sorters virus som infekterar arkéer?
- Metan och lustgas: Hur kan mikroorganismer ändra klimatet?

Saltdammar
vid Francisco
Bay med rosa,
fototrofa
Haloarchaea.

Foto: Wikimedia
Commons



Jobba praktiskt med arkéer!



Text: Britt-Marie Lidesten

Hur bevarade man maten innan det fanns fryskyl i hemmen? Konserveringsmetoder av olika slag används för att göra miljön så ogästvänlig som möjligt för bakterier och svampar.

En viktig princip för konservering är att ta bort vatten och torkade matvaror är en bas i hushållet även i dag, exempelvis ris, mjöl och torkad pasta. Men livsmedel kan också torkas genom att saltas in eftersom hög salthalt drar ur vätska från livsmedlet som därmed bevaras från nedbrytande bakterier och svampar. Exempelvis var insaltad sill länge en stapelföda i Sverige beroende på att återkommande sillperioder, där stora fiskstim gick in till Västkusten, gav ett överflöd av lättåtkomlig och billig mat.

Den här artikeln handlar om levande organismer som trivs i mättad saltlösning och som bland annat kan leva på insaltad fisk.

Våra släktingar arkéerna

Organismvärlden delas in i tre grupper: bakterier, arkéer och eukaryoter. Arkéerna är närmast släkt med eukaryoterna, dit bland andra djuren, växterna och svamparna hör. Bland arkéerna finns organismer som klarar att leva i extrema miljöer som exempelvis en mättad saltlösning.

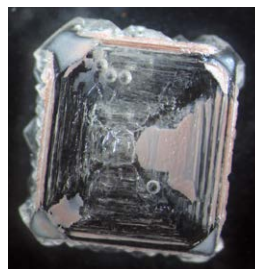
Att jobba i skolan med en av dessa saltälskande arkéer, *Halobacterium sp. NRC-1*, har många fördelar. Den är lättodlad, har en läckert rosa färg och har många intressanta egenskaper som inbjuder till experimenterande i kombination med teoretiska studier. Den växer på medium med 25% salthalt, vilket gör att patogena mikroorganismer inte trivs och man behöver därför inte vara lika noga med sterilteknik. Dessutom kan *Halobacterium* finnas i saltkristaller och fortfarande vara vid liv (se bild)!

I artikeln beskrivs hur man med iakttagelser och enkla försök kan karaktärisera denna organism och samtidigt förstå mer av hur den är anpassad till att leva i naturliga miljöer med extrem salthalt. Undersökningarna kan göras mer eller mindre öppna och ger utrymme för att eleverna själva funderar och planerar. Det finns också intressanta teoretiska och biotekniska spår att fördjupa sig i.

Vi vill på detta sätt introducera en arkée, som vi tror kan bli användbar vid praktiskt arbete med mikroorganismer i skolan. Labbeskrivningar finns på vår webbsida i anslutning till detta nummer av Bi-lagan. Se även faktaruta på sidan 21.

Miljöfaktorer

Försök 1–3 handlar om miljöfaktorer som har betydelse för överlevnaden av *Halobacterium*. Dessutom visar försök 3 en enkel metod för att ta fram DNA från cellerna.



Saltkristall med
Halobacterium

1. Undersök miljöfaktorer

Frågeställning

Vilken är den optimala halten natriumklorid som *Halobacterium* är anpassad till?

Även andra miljöfaktorer kan undersökas på liknande sätt, exempelvis temperatur- och pH-optimum, samt andra komponenter i mediet.

Uppgift

- Bestäm först vilka koncentrationer av natriumklorid som ska testas. Välj koncentrationer från 5 g till medium mättat med natriumklorid.
- Fördela 50 ml medium (se faktaruta s 21) utan natriumklorid i så många 100 ml E-kolvar som antalet olika koncentrationer med natriumklorid. Gör helst dubbelprov. Tillsätt natriumklorid i de valda mängderna. Autoklavera. (För exakt salthalt, tillsätt först natriumklorid och fyll på medium tills volymen uppgår till 50 ml.)
- Ympa E-kolvarna med 1 ml flytande kultur. Använd en kultur som har tydligt rosa färg.
- Mät absorbansen vid 600 nm. Använd medium som blank.
- Låt kolvarna stå i skakvattenbad (40–42°C) och mät absorbansen efter cirka en vecka.

Kommentar

Medium med lägre salthalt än 5% infekteras lätt. Om endast optimum för salthalt ska bestämmas kan man mäta absorbansen efter cirka en vecka, en tendens brukar synas redan efter ett par dagar. Om man dessutom vill visa den successiva tillväxten i en flytande kultur mäter man absorbansen regelbundet under cirka en och en halv vecka. Gör täta mätningar när tillväxten ökar snabbt på kort tid.

2. Giftverkan

Frågeställning

Vilka ämnen påverkar överlevnaden av *Halobacterium*?

Uppgift

En flytande kultur med *Halobacterium* sprids ut

med hjälp av tops på en platta med saltmedium (se faktaruta s 21). På plattan kan små filterpapperslappar läggas, som doppats i de lösningar man vill undersöka.

Kommentar

Eleverna kan själva föreslå ämnen att testa. Några förslag är: avjonat vatten, lösningar med metalljoner och rengöringsmedel. En klar zon utan växt bildas runt de prover som är giftiga för cellerna, ju större diameter på avdödningszonen desto giftigare.

3. Extrahera DNA

Frågeställningar

Vad händer när *Halobacterium* utsätts för rent vatten? Hur kan man ta fram DNA från *Halobacterium*?

Uppgift

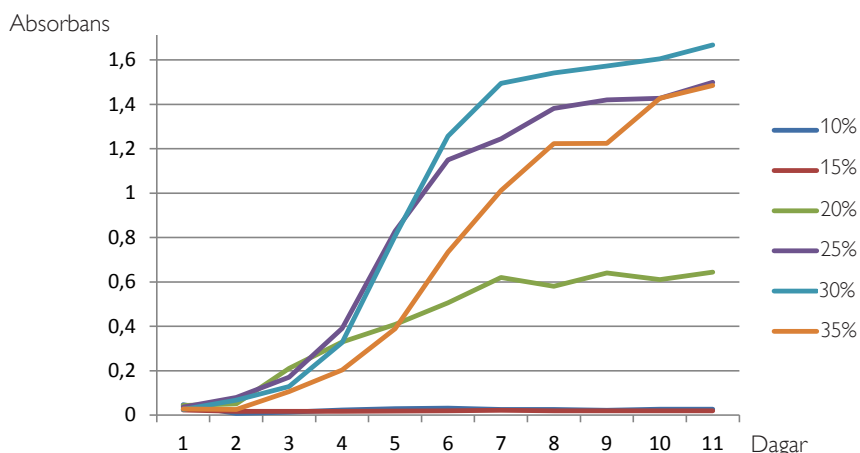
- Håll cirka 1 ml flytande kultur med hög celltäthet och tydligt rosa färg i ett glasprovrör som rymmer 3 ml.
- Tillsätt cirka 1 ml avjonat vatten
- Blanda om och låt stå ett par minuter.
- Använd pipett och skicka långsamt och försiktigt 0,5-1 ml iskall 95% etanol över vätskan.
- Håll provröret mot ljuset och studera etanolfasen under några minuter utan att skaka.

Kommentar

Det är lätt att extrahera DNA ur *Halobacterium* eftersom cellerna kräver hög salthalt för att överleva och därför lyserar omedelbart när de kommer i kontakt med vatten. Det syns en tydlig ring av utfällt DNA i etanolfasen strax ovanför gränssytan till cellsuspensionen och efter ett tag bildas trådar av DNA i etanolfasen. DNA som faller ut är blandat med proteiner.

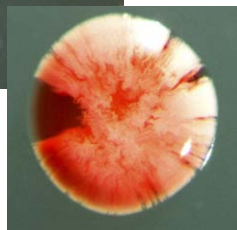
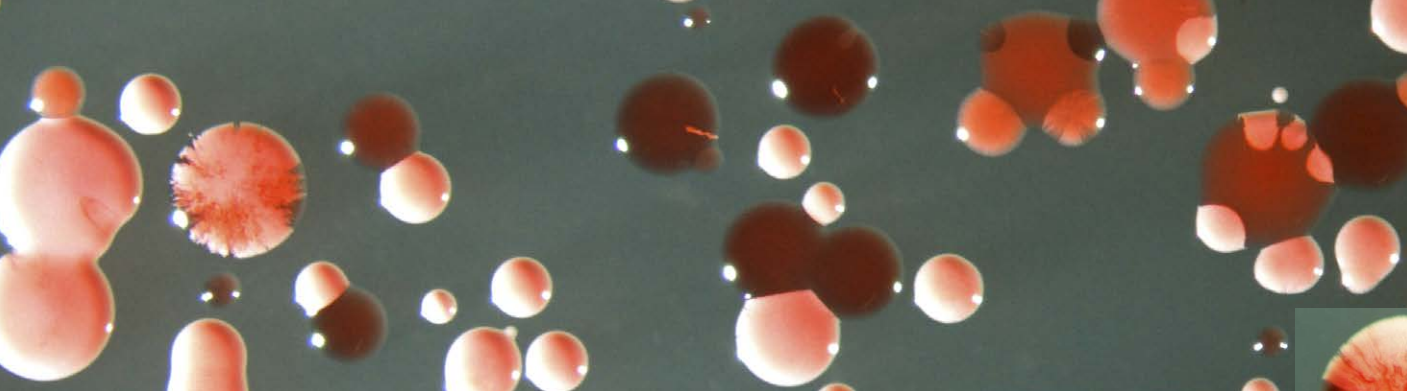


Extraktion av DNA



Absorbans vid 600 nm i sex kulturer med varierande halt av natriumklorid angett i procent och avsatt mot antal dagar för tillväxt.

Grafen visar att salthalten har avgörande betydelse för tillväxten av *Halobacterium*, med optimum för 30% natriumklorid.



Bilderna visar kolonier av *Halobacterium*.

Rosa kolonier har celler med gasfyllda vesiklar och de röda kolonierna har celler utan vesiklar. De vita prickarna i bilden är ljusblänk!

Den lilla bilden visar en koloni av *Halobacterium* där färgen varierar på olika sektorer (se kommentar till höger).

Genomet påverkas

Försök 1–4 kan göras var för sig eller i serie där elever ställer frågor/hypoteser som de försöker besvara genom successiva iakttagelser och försök.

1. Koloniernas utseende

Frågeställning

Hur ser kolonier av *Halobacterium* ut?

Uppgift

Studera en agarplatta med renutstryk av *Halobacterium*. Kolonierna är små och det krävs en stereolupp för att kunna se kolonierna var för sig. Titta på många kolonier och jämför utseendet. Hur ser de ut? Hur kan skillnaderna ha uppstått?

Kommentar

De flesta kolonier är rosa och ogenomskinliga, men några är röda och genomskinliga. Det kan också finnas någon enstaka vit, ogenomskinlig koloni.

Det kan även vara olika färger på sektorer av kolonier (se bild ovan). Det beror på en ärftlig förändring i någon av dottercellerna till den ursprungliga cellen i kolonin och visar hur cellerna fortplantar sig, det vill säga genom delning.

Eleverna ska försöka ge förklaringar till koloniernas varierande utseende. En hypotes kan vara att det har skett en ärftlig förändring i gener som styr utvecklingen av rosa färg, så att det antingen bildas röd eller vit färg. Detta ska vi undersöka vidare i följande försök.

2. Flytande kultur

Frågeställning

Vi har sett att kolonier med *Halobacterium* har olika färg på en agarplatta. Hur ser flytande kulturer ut, ympade med celler av olika utseende?



Flytande kulturer med *Halobacterium*, från vänster rosa, vita och röda celler.

Uppgift

Titta på kolvarna där rosa, vita respektive röda *Halobacterium* växer. Vilka iakttagelser kan du göra?

Kommentar

I kolvarna (se bild nedan) med rosa eller vita *Halobacterium* ser man överst ett rosa eller vitt skikt. Suspensionen i kolven med röda celler ser genomskinlig ut och ett rött lager finns på botten. Slutsatsen blir att de rosa och vita cellerna finns vid ytan, men inte de röda.

3. Undersök färgerna

Frågeställning

Vi har sett att kolonier av *Halobacterium* på agarplattor kan ha olika färg och att rosa och vita celler, men inte röda celler finns vid ytan av flytande kulturer. Varierar färgen i cellerna eller finns det någon annan förklaring till skillnaderna?

Uppgift:

Extrahera färgen från flytande kulturer ympade med rosa, vita respektive röda *Halobacterium*-kolonier.

- Centrifugera ner cellerna. Använd cirka 10–50 ml av respektive kultur och centrifugera i 2 x 8 minuter, 4000 varv per minut. Flera rör kan användas vid centrifugeringen.
- Häll av supernatanten och tillsätt 0,5 ml avjonat vatten. Lös upp pelleten och låt stå några minuter.
- Blanda lysatet med 1–2 ml aceton.
- Centrifugera i 8 minuter, 4000 varv per minut. Ta vara på det övre skiktet som ska vara klart och mer eller mindre rödfärgat.
- Använd 1,5 ml kvartskyvett och scanna absorbansen mellan 300 och 600 nm.

Kommentar

Absorbansspektrat visar att färgsammansättningen i lysatet från röda och rosa arkéer är lika. Vita arkéer ger ett avvikande spektrum utan toppar i det aktuella våglängdsområdet.

Hypotesen att det har skett en genetisk förändring som påverkat bildningen av den rosa färgen så att en annorlunda röd färg uppstått stämmer inte. Däremot saknar vita celler förmåga att bilda rött pigment.

4. Titta på cellerna i mikroskop

Frågeställning

Eftersom vi har funnit att det är samma färgsammansättning i rosa respektive röda celler måste det vara en annan orsak till färgskillnaden. Går det att se skillnad på cellerna i mikroskop?

Uppgift

Titta i stereolupp på en agarplatta med utstryk av *Halobacterium* och välj ut separata kolonier med röd, rosa respektive vit färg. Använd tandpetare för att hämta kolonierna från agarplattorna. Rör ut cellerna i små droppar med 25% natriumkoloridlösning placerade på olika objektglas. Lägg på täckglas. Studera i faskontrastmikroskop i 1 000 x förstoring med immersionsolja.

Kommentar

Denna undersökning är inte nödvändig för att förstå orsaken till försöksresultaten. För att kunna se cellerna, som är av varierande längd, cirka två mikrometer långa, krävs mikroskop av god kvalitet, faskontrastinställning och 1 000 x förstoring med immersionsolja.

Rosa och vita celler är starkt ljusbrytande i faskontrastinställning. Om man tittar noga kan man i en del celler se ljusa kroppar. Detta är samlingar av vesiklar. Röda celler ser överlag mörka ut och saknar vesiklar.

Slutsatser

Vi har konstaterat att det är samma röda färgsammansättning i rosa så väl som röda celler. I de vita cellerna har gener som påverkar bildningen av röd färg skadats. Ytterligare en viktig skillnad i koloniernas utseende, som kan ge en ledtråd, är att rosa och vita kolonier är ogenomskinliga, medan de röda är genomskinliga. Vi ser även en skillnad i de flytande kulturerna. I kulturer ympade med rosa eller vita kolonier bildar cellerna ett tydligt skikt i vätskeytan medan det i ett medium ympat med röda kolonier bildas ett rött skikt på botten.

Om vi studerar celltyperna i faskontrastmikroskop ser vi att rosa och vita celler bryter ljuset kraftigt och i vissa celler syns genomskinliga rundade kroppar. Röda celler ser mörkt blåsvarta ut. I ljusfält är det svårt att se skillnad på cellerna.

Det som gör att rosa och vita celler flyter upp till ytan och kolonierna blir ogenomskinliga är gasfyllda vesiklar. En bra jämförelse är ett glas som man snabbt fyller med vatten från kranen. Små gasbubblor gör vattnet ogenomskinligt, men när de stiger mot ytan klarnar vattnet. Bildningen av vesiklarna styrs av flera gener. I röda celler har inga vesiklar bildats.

Att det sker ärftliga förändringar i genomet hos *Halobacterium* relativt frekvent kan ha

olika orsaker. Genomet hos *Halobacterium* innehåller en mängd transposoner, även kallade hopande gener, som flyttar sig inom genomet och slumpvis kan skada gener.

Man tror att det är fördelaktigt för cellerna att ha gasfyllda vesiklar för att de ska kunna söka sig mot vattenytan, en miljö med hög syrehalt och god ljusställning, eftersom vatten med hög salthalt endast kan hålla en låg syrehalt. *Halobacterium* har liksom växterna möjlighet att omvandla solljus till kemisk energi. De använder sig av bakterierodopsin, som pumpar protoner ut ur cellen och bygger upp en protongradient över membranet för att möjliggöra produktion av ATP. Cellernas röda färg bildas av ett komplex med rodopsin i kombination med en karotenoid, retinal. Cellerna har även en ljusdriven pump (halorodopsin) för att kunna transportera kloridjoner in i cellen som tillsammans med kaliumjoner gör det möjligt att hålla samma osmotiska potential i cellens inre som i omgivningen. En komplikation är den starka UV-strålningen vid vattenytan, men cellerna har effektiva reparationsystem för DNA-skador, bland annat enzymet fotolyas.

Det är inte hela sanningen att cellerna flyter upp till ytan beroende på att de har gasfyllda vakuoler. De har även rörliga utskott som gör att de kan simma och söka sig till optimala miljöförhållanden beträffande näringsämnen, ljus och syrehalt (taxier).

Referenser

Inquiry-driven Teaching & Learning the Archaeal Microorganism *Halobacterium* NRC-1. Priya Dassarma et al. The American Biology Teacher. 78(1): 7-13. 2016.

www.bioone.org/doi/full/10.1525/abt.2016.78.1.7

Brock Biology of Microorganisms. M. Madigan. 2014. Pearson förlag

Odling av *Halobacterium*

Medium

Natriumklorid	250 g
Magnesiumsulfat, heptahydrat	20 g
Trinatriumcitrat, dihydrat	3 g
Kaliumklorid	2 g
Hydrolyserat kasein	5 g
Jästextrakt	5 g
Avjoniserat vatten	1 liter

Justera pH till 7,2 med antingen NaOH eller saltsyra. Till fast medium sätts 20 g agar per liter.

Optimumtemperatur: 40–42°C. Tid för tillväxt på fast eller flytande medium: 1–2 veckor. Skakvattenbad eller annan form av omrörning krävs för uppodling av flytande kulturer.

Bioresurs kommer att under en begränsad tid erbjuda skolor att inköpa plattor med *Halobacterium*. Kontakta info@bioresurs.uu.se