Влияние поллютантов на возникновение мутаций у бактерий

Работу выполнили студенты 2курса:

Дробот Валерия, Яровая Екатерина ,

Куликов Максим, Выростков Владимир
Руководители проекта: Селиверстова Е.Ю., аспирант, Сазыкина М.А., д.б.н, профессор кафедры биохимии и микробиологии

Актуальность

Панрезистентные штаммы – это штаммы микроорганизмов, которые устойчивы ко всем известным классам антибиотиков.

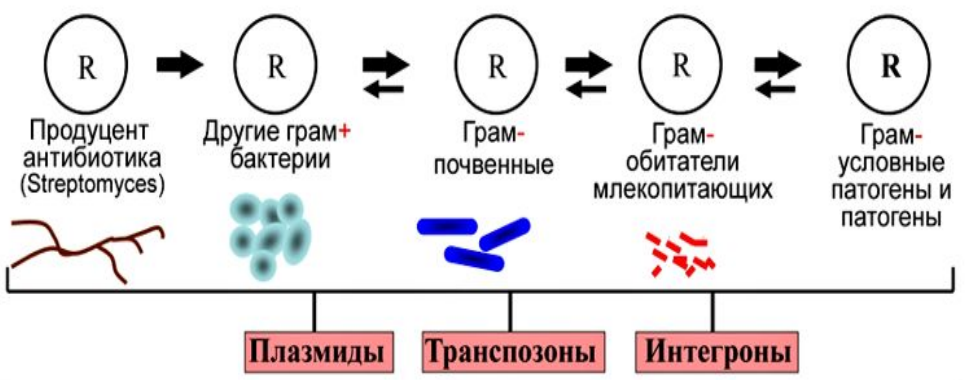
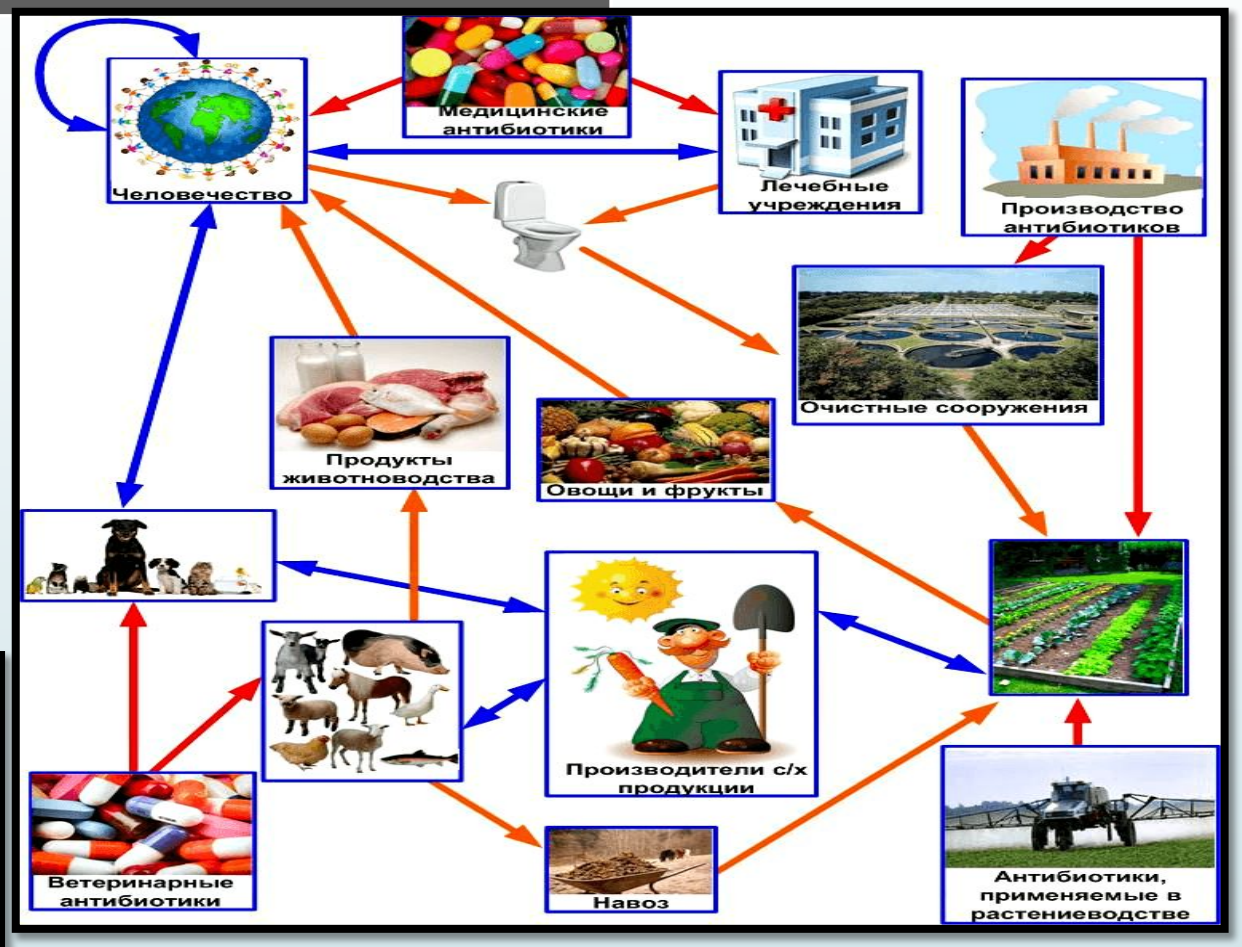


Схема переноса генов устойчивости к антибиотикам из природных бактерий в клинические штаммы



Основные источники поступления антибиотиков в биосферу и глобальная сеть путей горизонтального переноса генов устойчивости к ним.

Красными стрелками показано поступление антибиотиков, **оранжевыми** — перемещение антибиотиков и генов устойчивости к ним, **голубыми** — передача только генов устойчивости

Цель и задачи

- **Цель:**

Изучить влияние поллютантов на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов бактерий рода *Pseudomonas* .

- **Задачи:**

1. Проследить влияние солей тяжелых металлов($HgCl_2$,$CuSO_4$) на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов бактерий рода *Pseudomonas* .

2. Проследить влияние пестицидов (клопиралид и глифосат) на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов бактерий рода *Pseudomonas*.

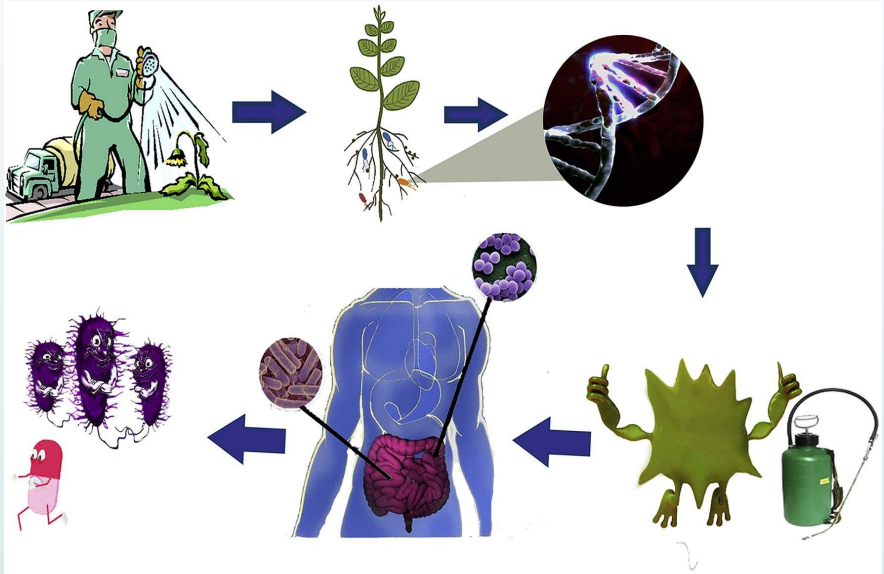
3. Проследить влияние антисептических препаратов (хлоргексидина, диоксидина) на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов бактерий рода *Pseudomonas*.

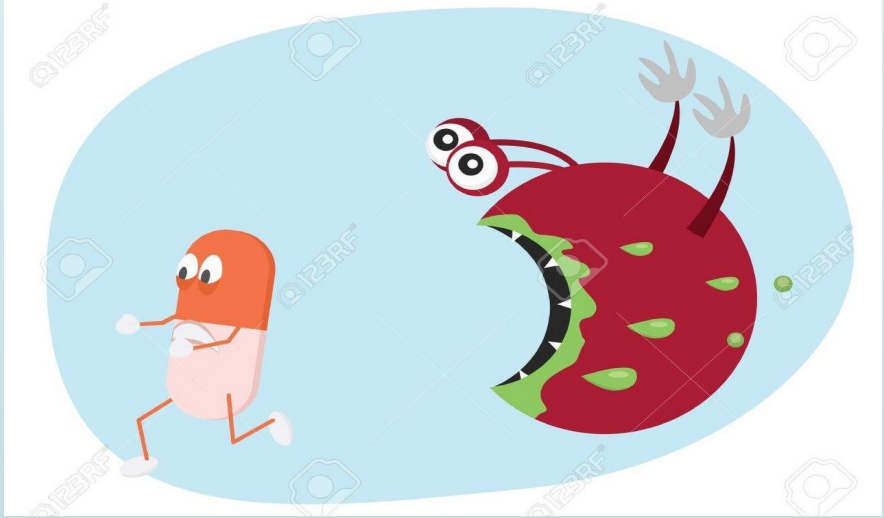
4. Проследить влияние антибиотиков (ампициллина, тетрациклина) на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов бактерий рода *Pseudomonas*.

5. Сравнить действие поллютантов различных групп на выбранный штамм.

6. Проанализировать полученные результаты.

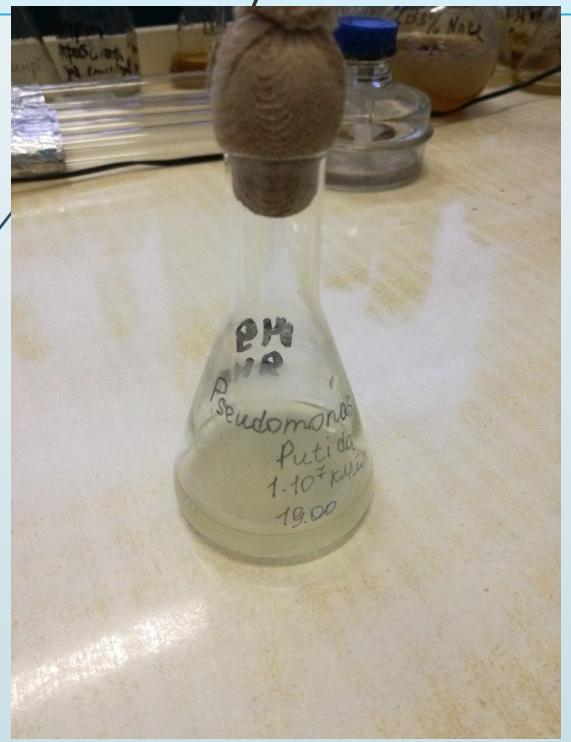
7. Сделать выводы по данным эксперимента.



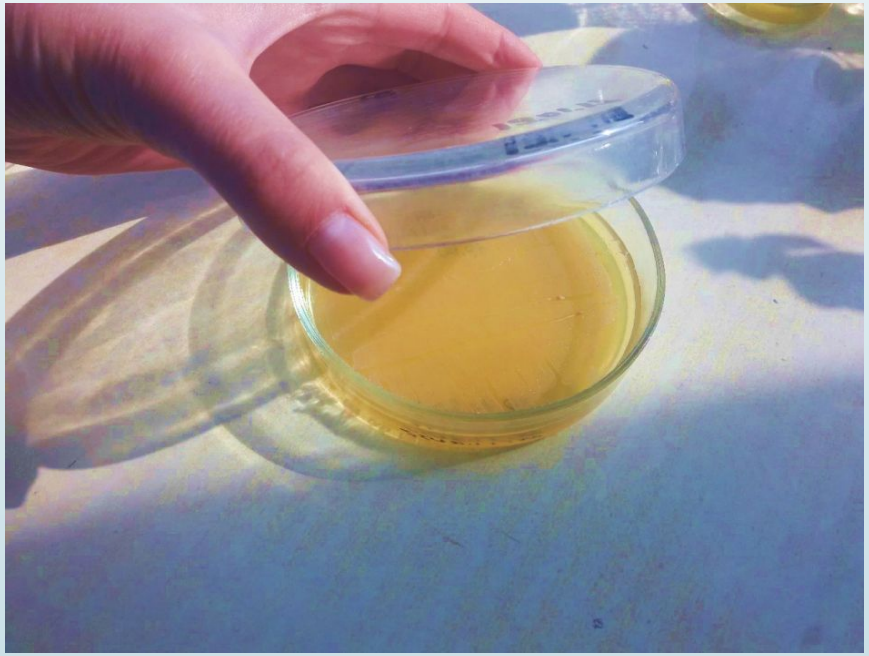


Объект исследования

- Объектом нашего исследования является штамм *Pseudomonas putida*, выделенный из донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.
- Предметом исследования является частота встречаемости рифампицин-устойчивых мутантов *Pseudomonas putida*.

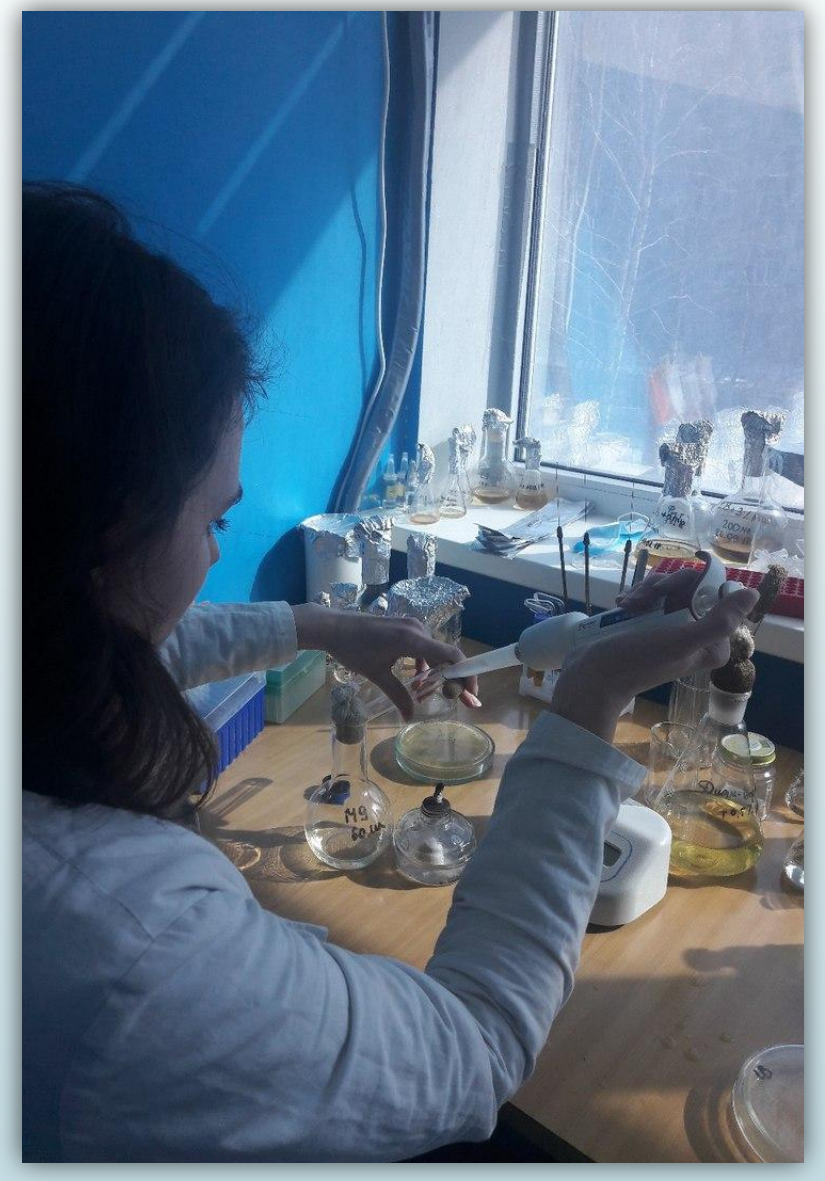


21-часовая культура *Pseudomonas putida*



Pseudomonas putida

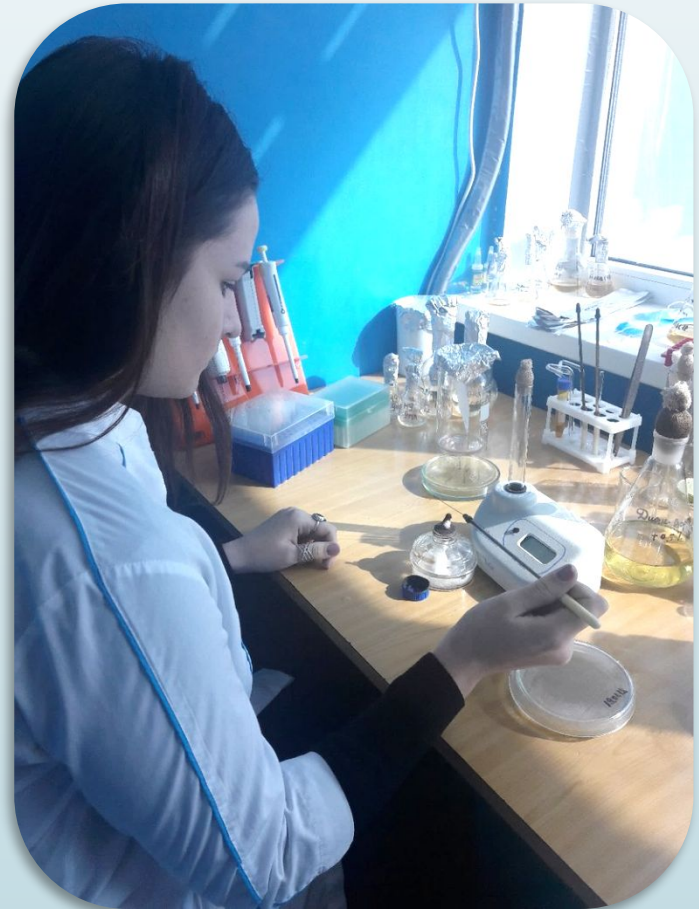
Материалы и методы



- **Получение рифампицин-резистентных мутантов *P. Putida***
- Культура была получена путем роста клеток до поздней логарифмической фазы роста в среде М9, содержащей глюкозу и гидролизат казеина, в конечных концентрациях 0,2% и 0,4% соответственно.
- Полученную культуру разводили свежей средой М9 до $1*10^8$ кл/мл и подращивали в течение 18 часов

Анализ рифампицин-резистентных мутантов

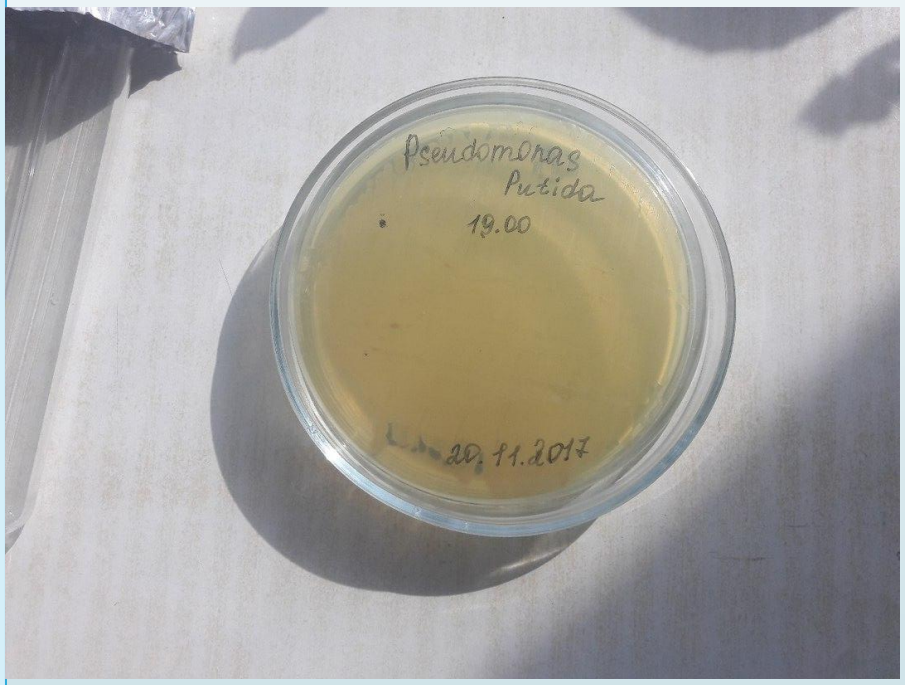
Ночную культуру разводили средой М9 до плотности $2*10^9$ кл/мл, 100 мкл полученной суспензии вносили на чашки с LB с добавлением М9 и рифампицина. Количество выросших колоний учитывали через 72 ч. после начала инкубации.



- **Бактериальные штаммы, среды, мутагены:** Для получения рифампицин-резистентных мутантов использовали штамм *Pseudomonas putida* .

- *Для оценки влияния различных токсических веществ на возникновение* рифампицин-резистентных мутантов:

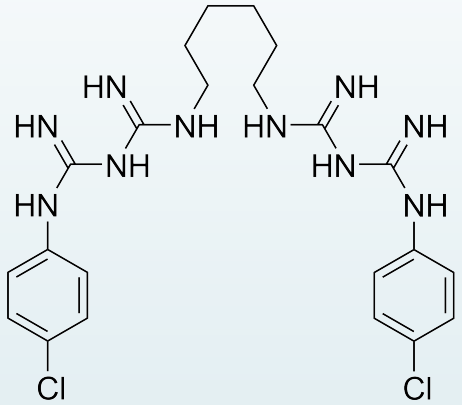
1. **Антибиотики:** ампициллин и окситетрациклина гидрохлорид (0,025 мг/мл, 0,0025 мг/мл, 0,00025 мг/мл);
2. **Антисептические средства:** хлоргексидин (0,05 мг/мл, 0,005 мг/мл, 0,0005 мг/мл) и диоксидин (1 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл);
3. **Пестициды:** клопиралид (0,03 мг/мл, 0,003 мг/мл, 0,0003 мг/мл) и глифосат (концентрацией 6,7 мг/мл; 0,67 мг/мл; 0,067 мг/мл)
4. **Соли тяжелых металлов:** хлорид ртути ($HgCl_2$)(концентрацией 0,0272 мг/мл; 0,00272 мг/мл, 0,000272 мг/мл) и сульфат меди($CuSO_4$) (концентрацией 0,1 мг/мл; 0,01 мг/мл; 0,001 мг/мл).



Анализ влияния антисептических препаратов

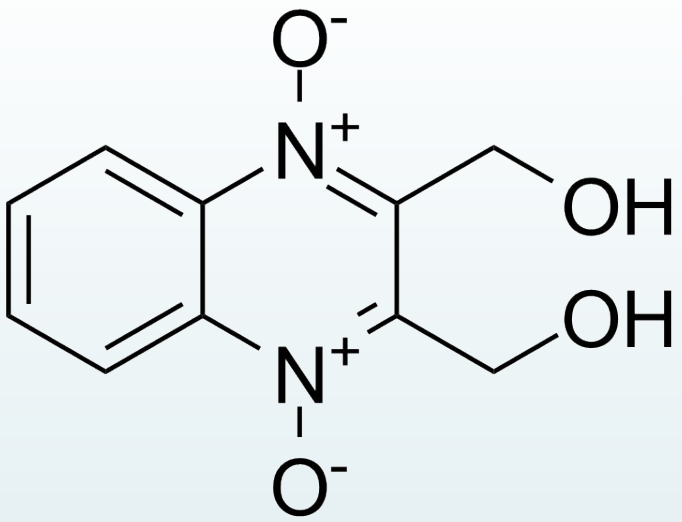
- **1. Хлоргексиди́н —** лекарственный препарат, антисептик, в готовых лекарственных формах используется в виде биглюконата (Chlorhexidini bigluconas). Хлоргексидин успешно применяется в качестве кожного антисептика и дезинфицирующего средства уже более 60 лет.

- Обладает бактерицидным и фунгицидным эффектом.



Хлоргексидин

- **2. Гидроксиметилхиноксилиндиоксид (диоксидин) —** лекарственное средство, обладающие широким спектром антибактериальной активности (особенно в отношении анаэробов). Действует бактерицидно.
- Диоксидин эффективен в лечении тяжёлых гнойно-инфекционных процессов. Вместе с тем препарат токсичен, что ограничивает его применение в педиатрии в качестве системного медикамента.
- Возможно развитие лекарственной устойчивости бактерий. При введении характеризуется малой терапевтической широтой, в связи с чем необходимо строгое соблюдение рекомендуемых доз.



ДИОКСИДИН

Результаты

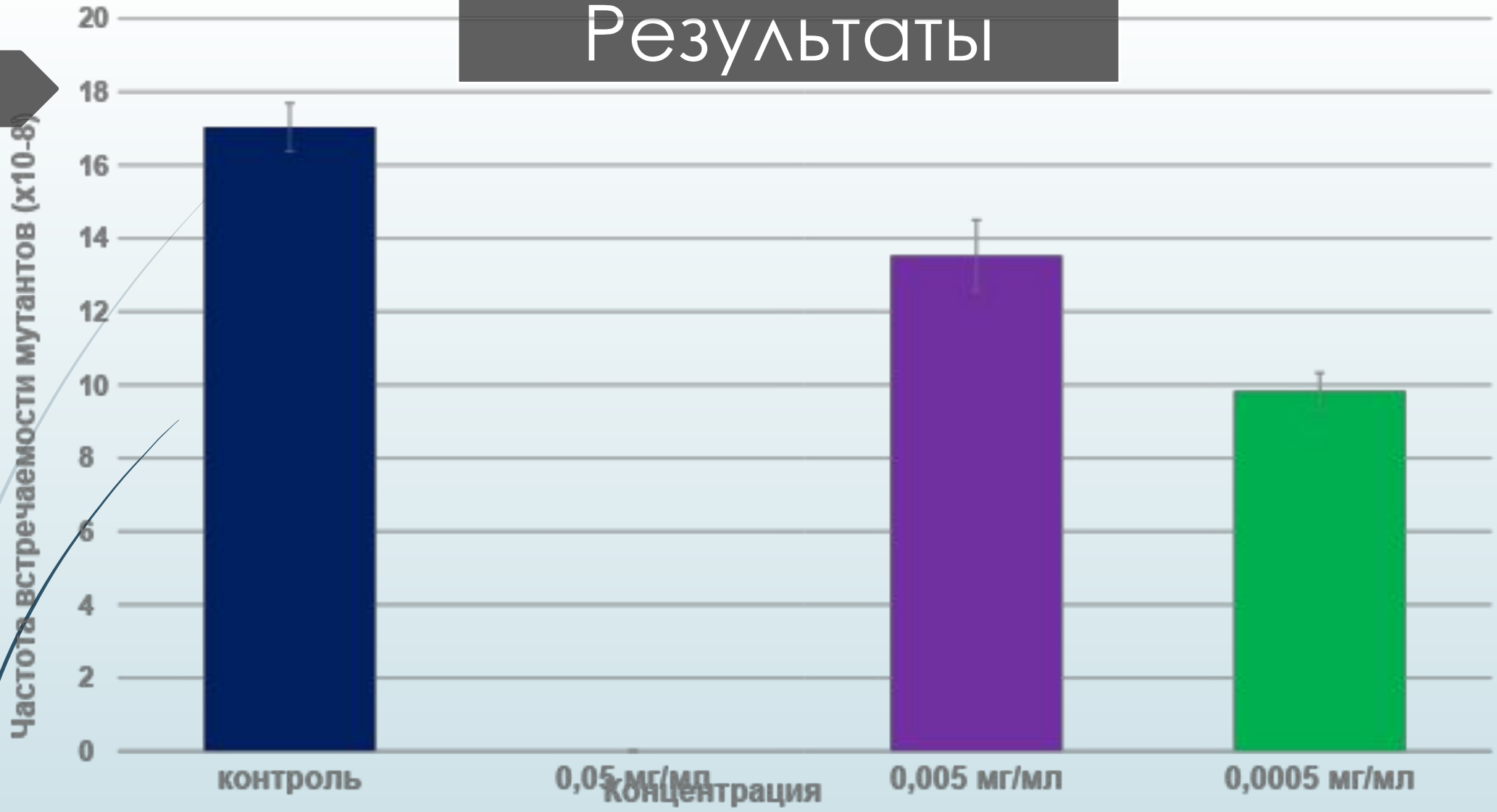


Рисунок 1 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием хлоргексидина

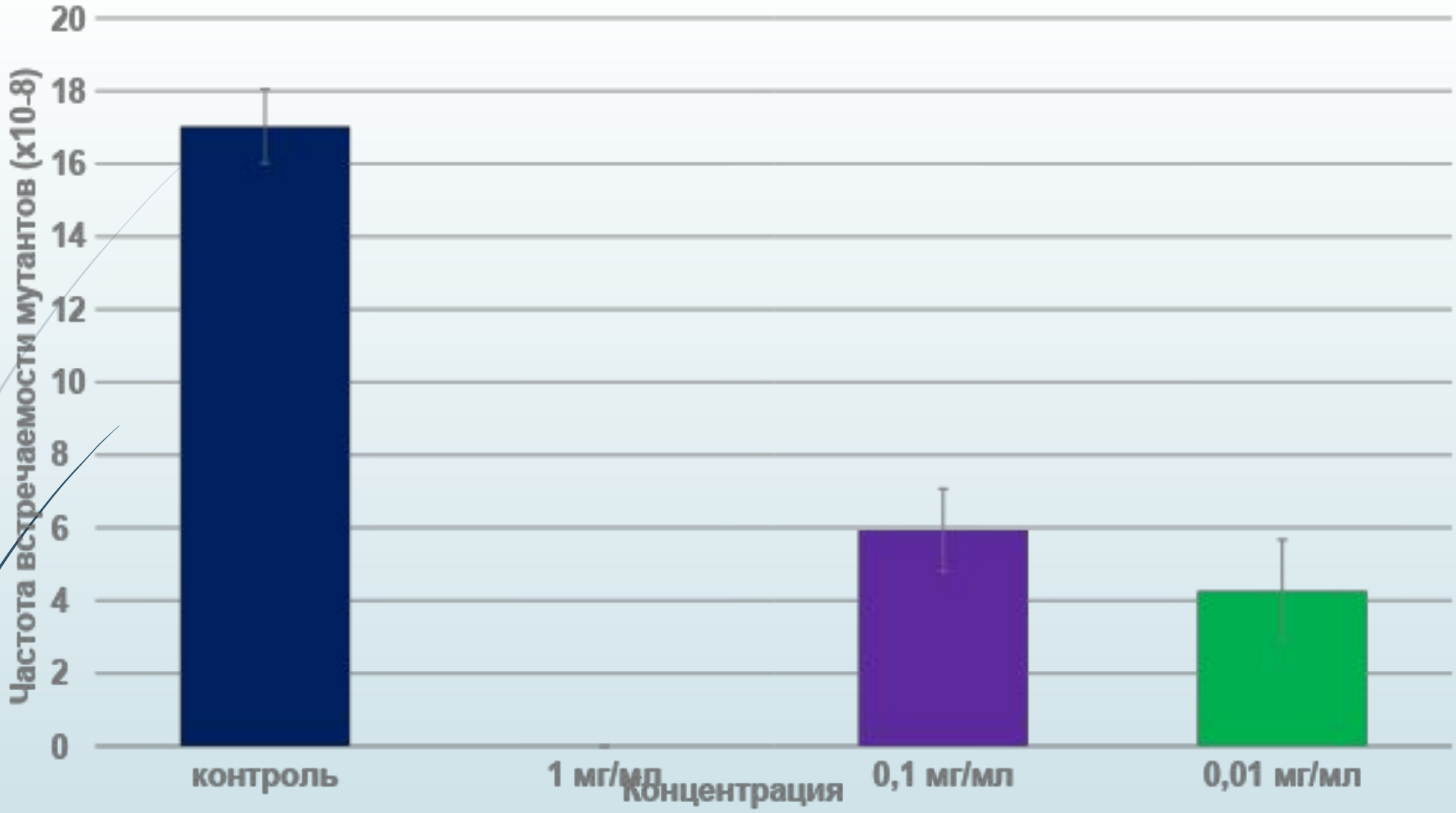
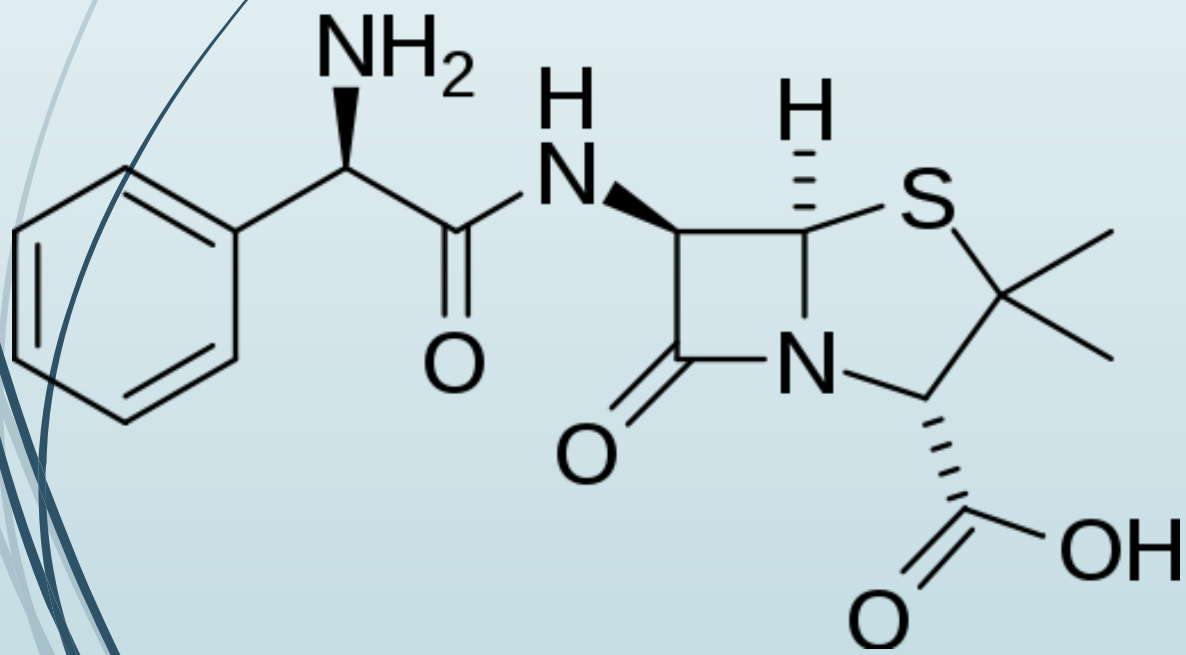


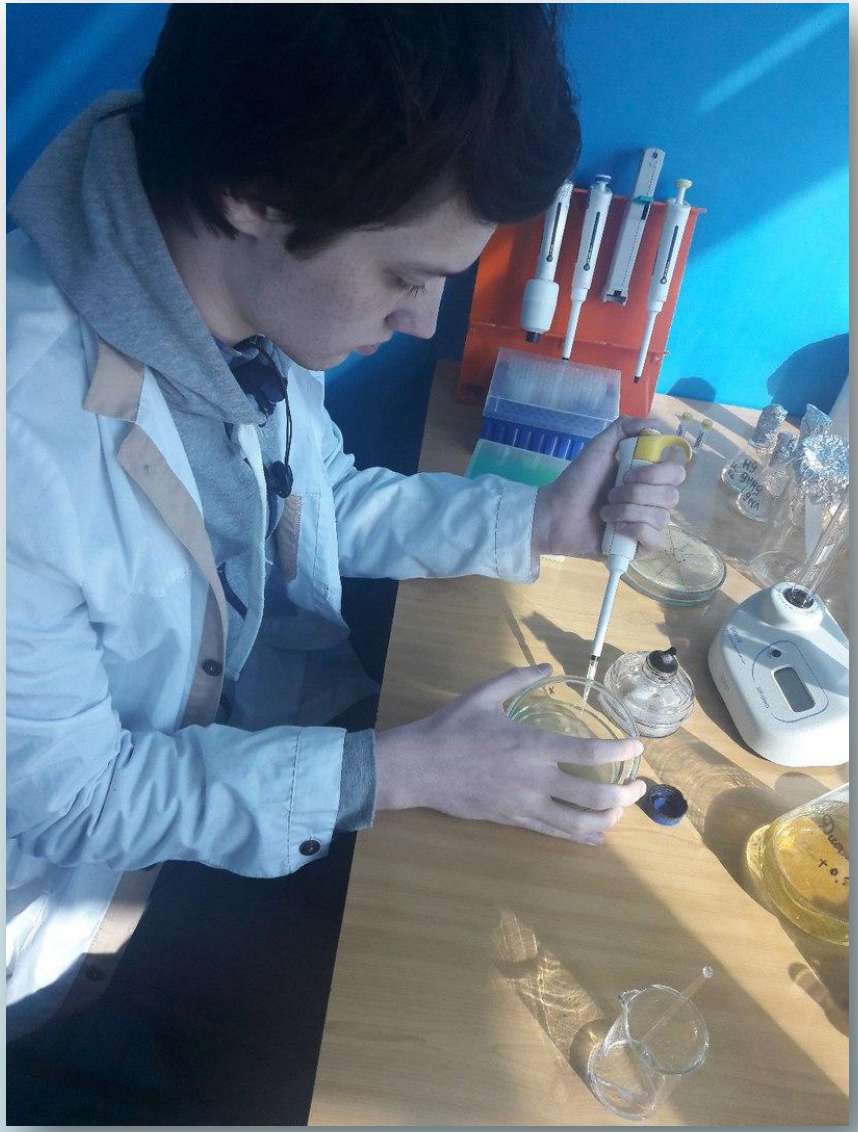
Рисунок 2 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием диоксидина

Анализ влияния антибиотиков

- **Ампициллин:**

Ампициллин – полусинтетический антибиотик. Разрушается пенициллиназой. В медицинской практике применяют ампициллин, ампициллина натриевую соль, ампициллина тригидрат.

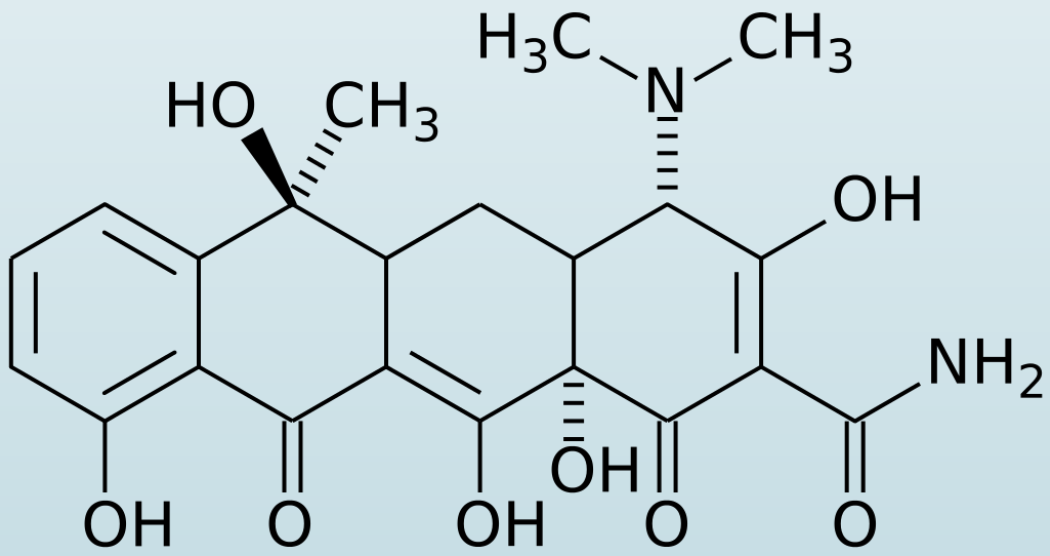


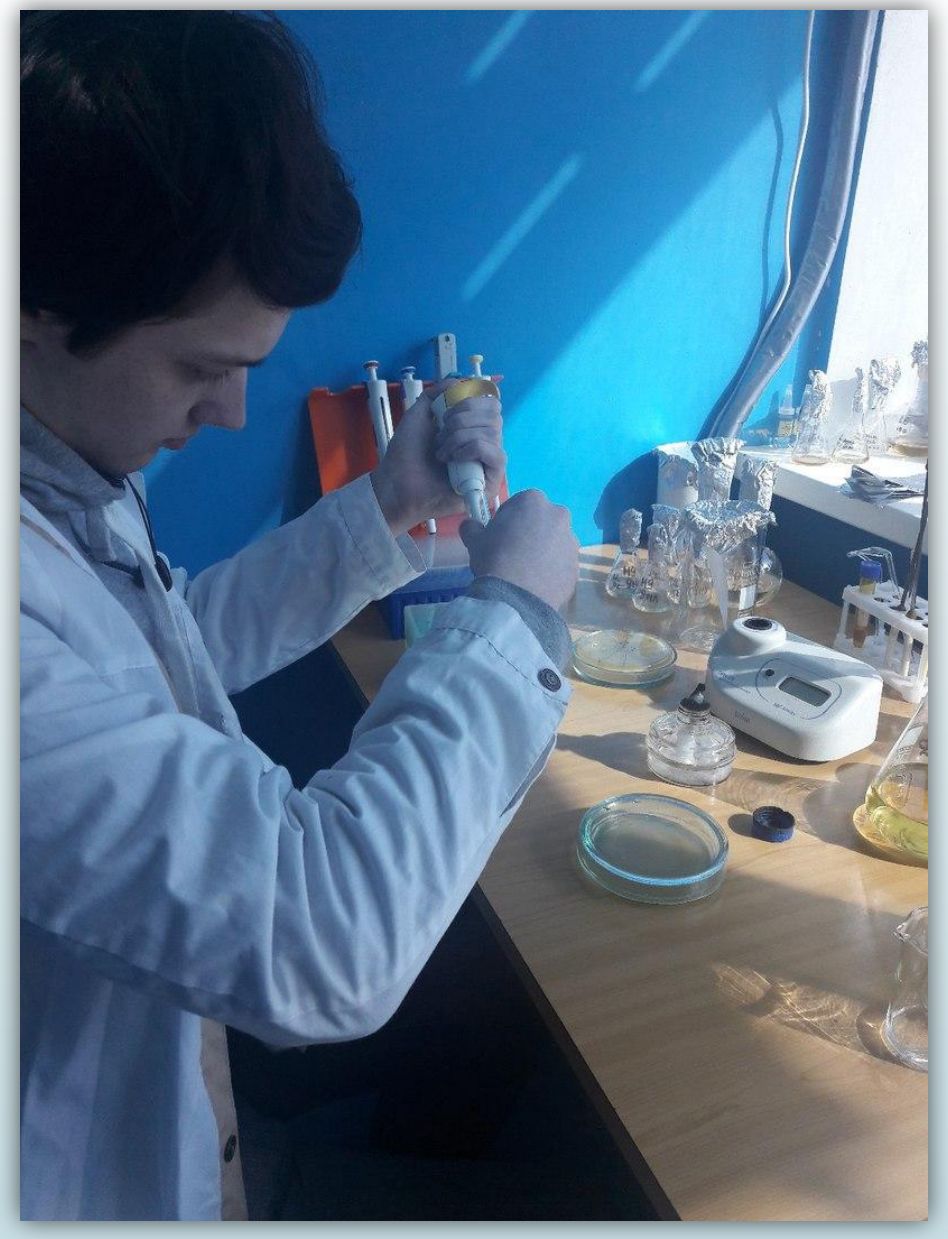


Тетрациклин:

Тетрациклин – антибиотик из семейства тетрациклинов. Основой молекулы тетрациклиновых антибиотиков является полифункциональное гидронафтаценовое соединение.

Нарушает образование комплекса между транспортной РНК и рибосомой, что приводит к нарушению синтеза белка. Активен в отношении как грамотрицательных так и грамположительных бактерий.





Результаты

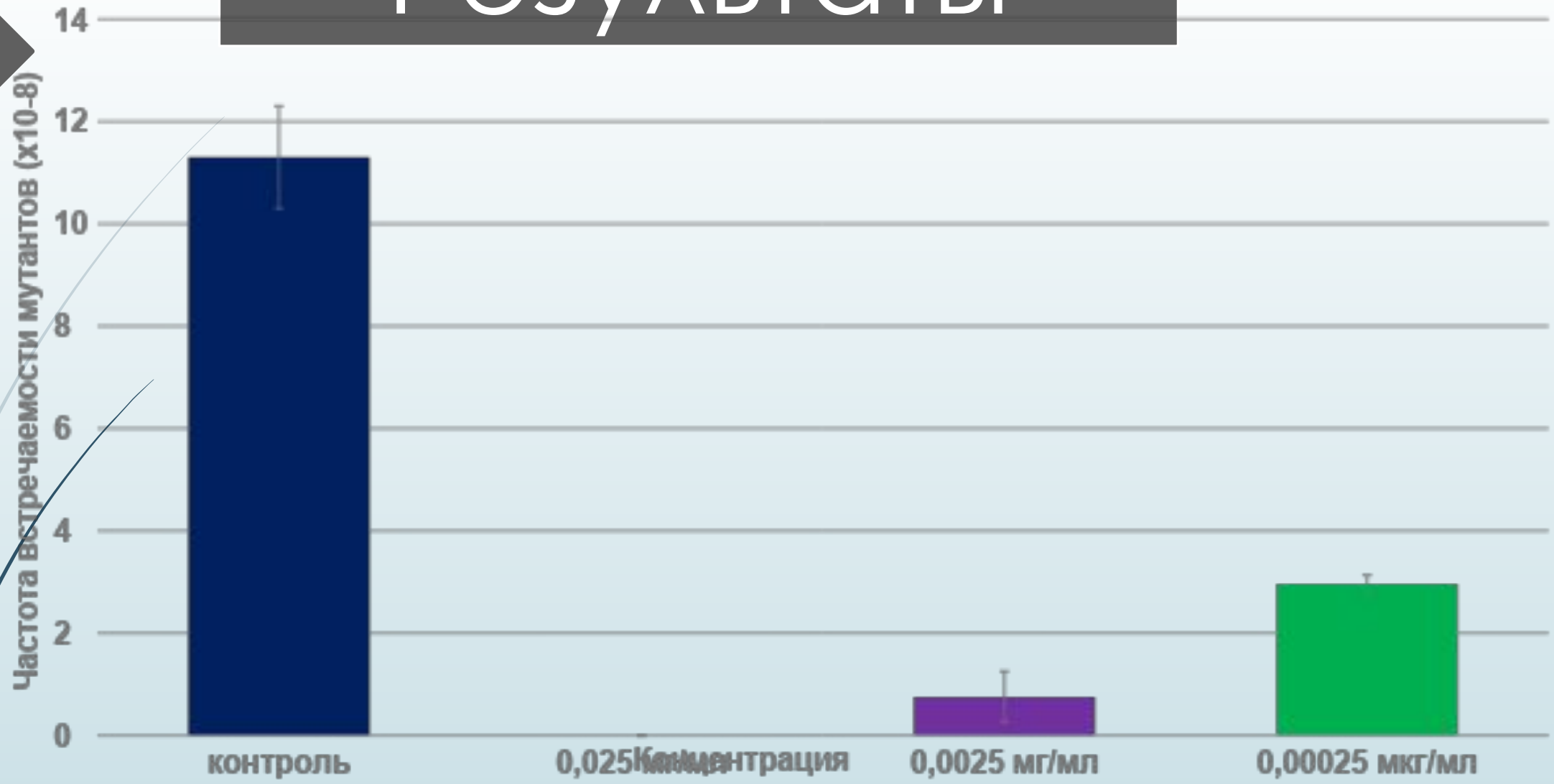


Рисунок 3 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием тетрациклина

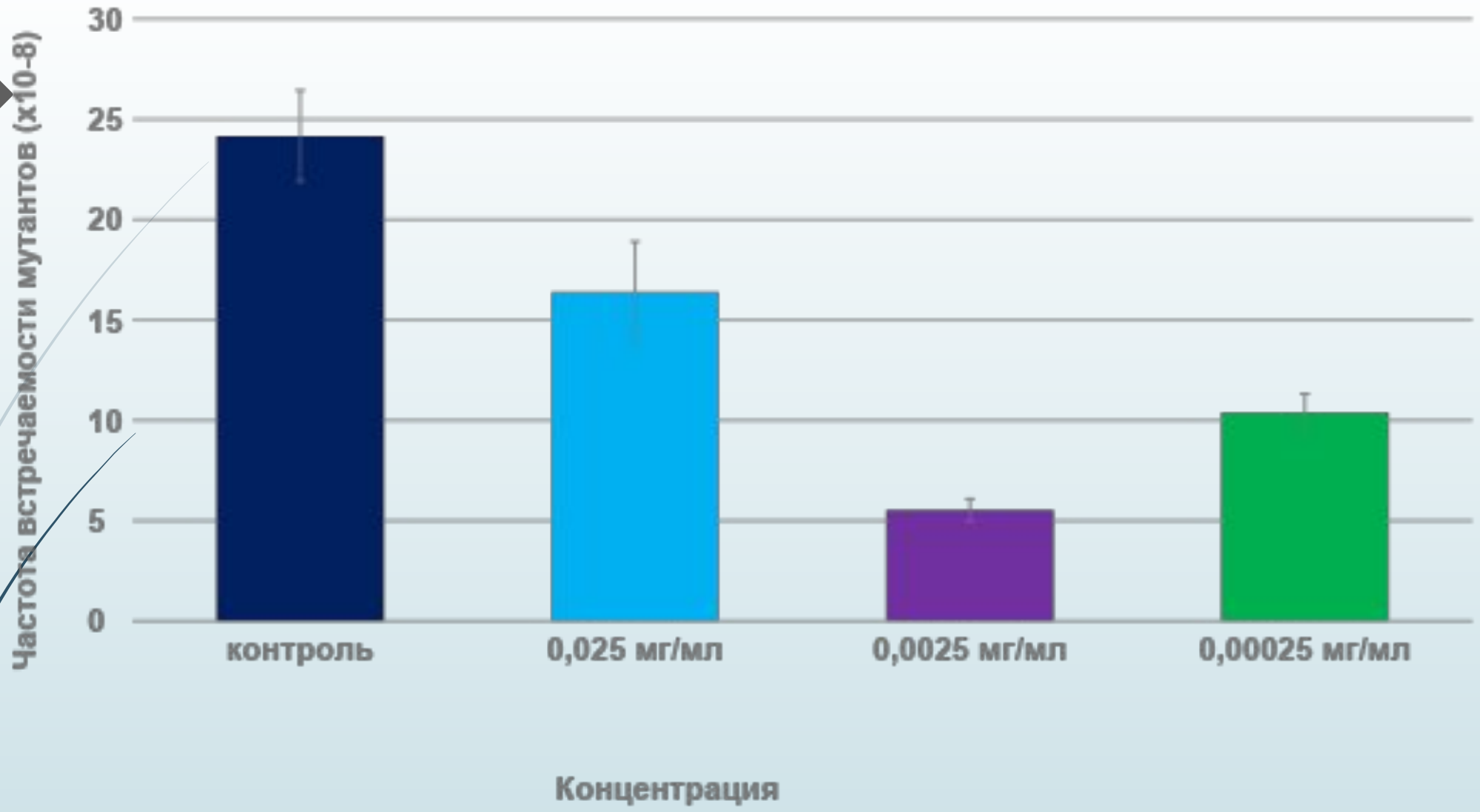
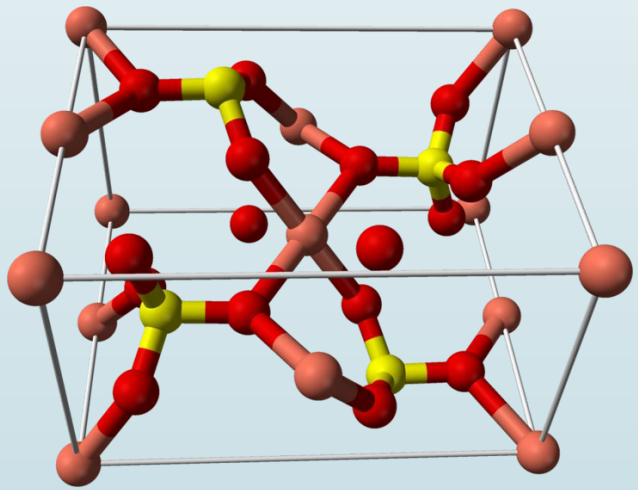


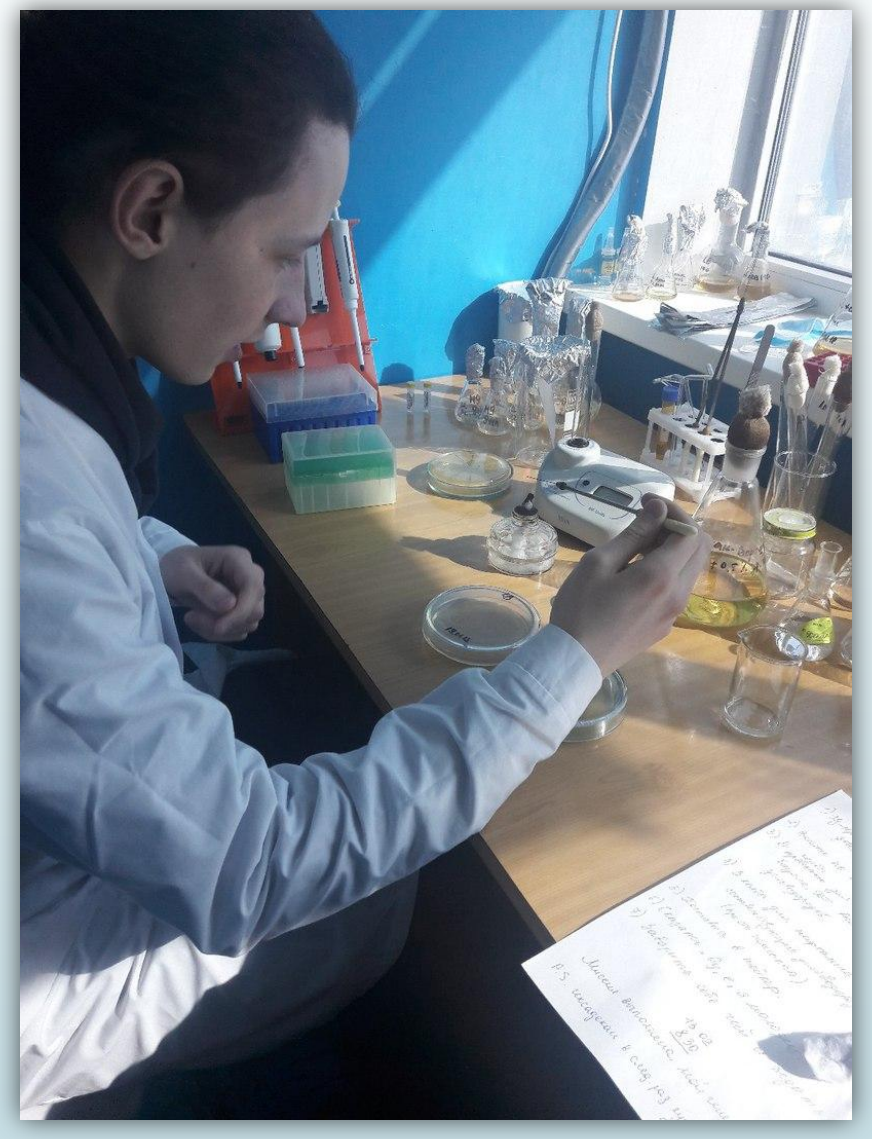
Рисунок 4 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием ампициллина

Анализ влияния солей тяжелых металлов

- **Сульфат меди (II):**
  Неорганическое соединение, медная соль серной кислоты с формулой $CuSO_4$. Нелетучее, не имеет запаха. Сульфат меди (II) — важнейшая из солей меди. Часто служит исходным сырьём для получения других соединений.

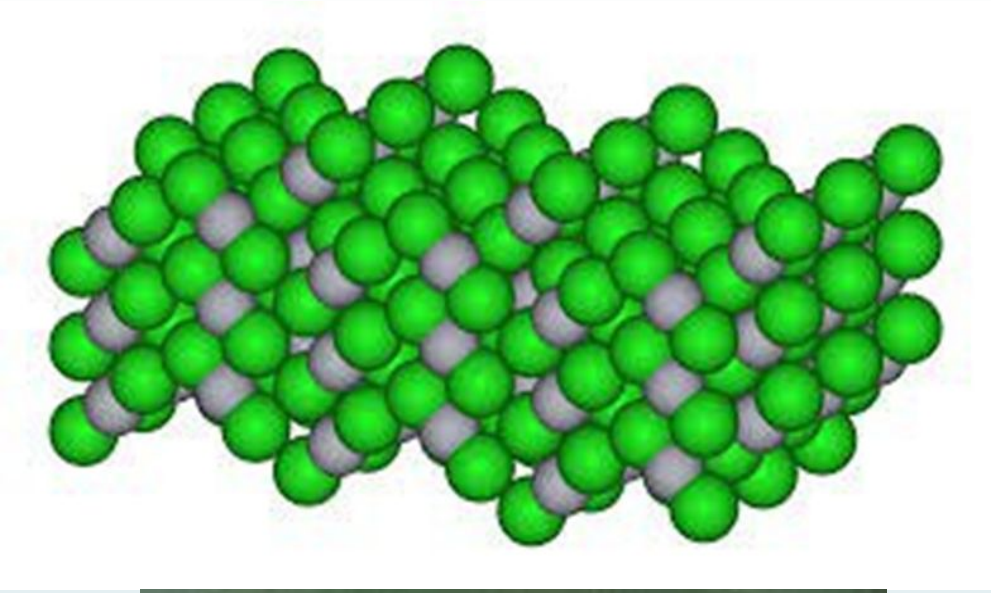


$CuSO_4$



- **Хлорид ртути ($HgCl_2$):**

Хлорид ртути — бесцветное кристаллическое растворимое в воде и очень ядовитое соединение. Применяется для целей наружной дезинфекции как антисептическое средство в растворах для дезинфекции кожи, белья, одежды, предметов ухода за больными, для обмывания стен. Катализатор органического синтеза.



Результаты

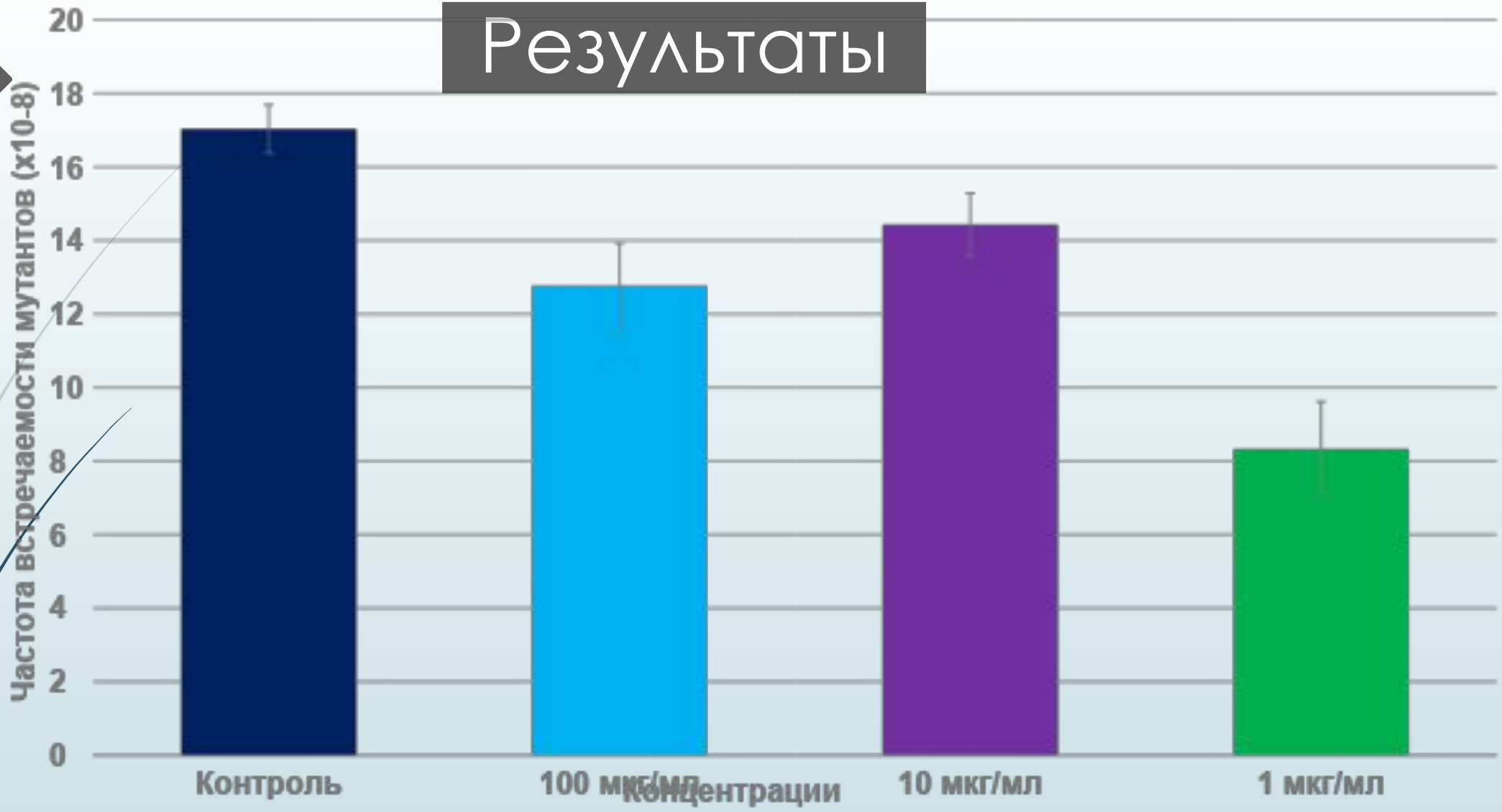


Рисунок 5 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием сульфата меди(II)

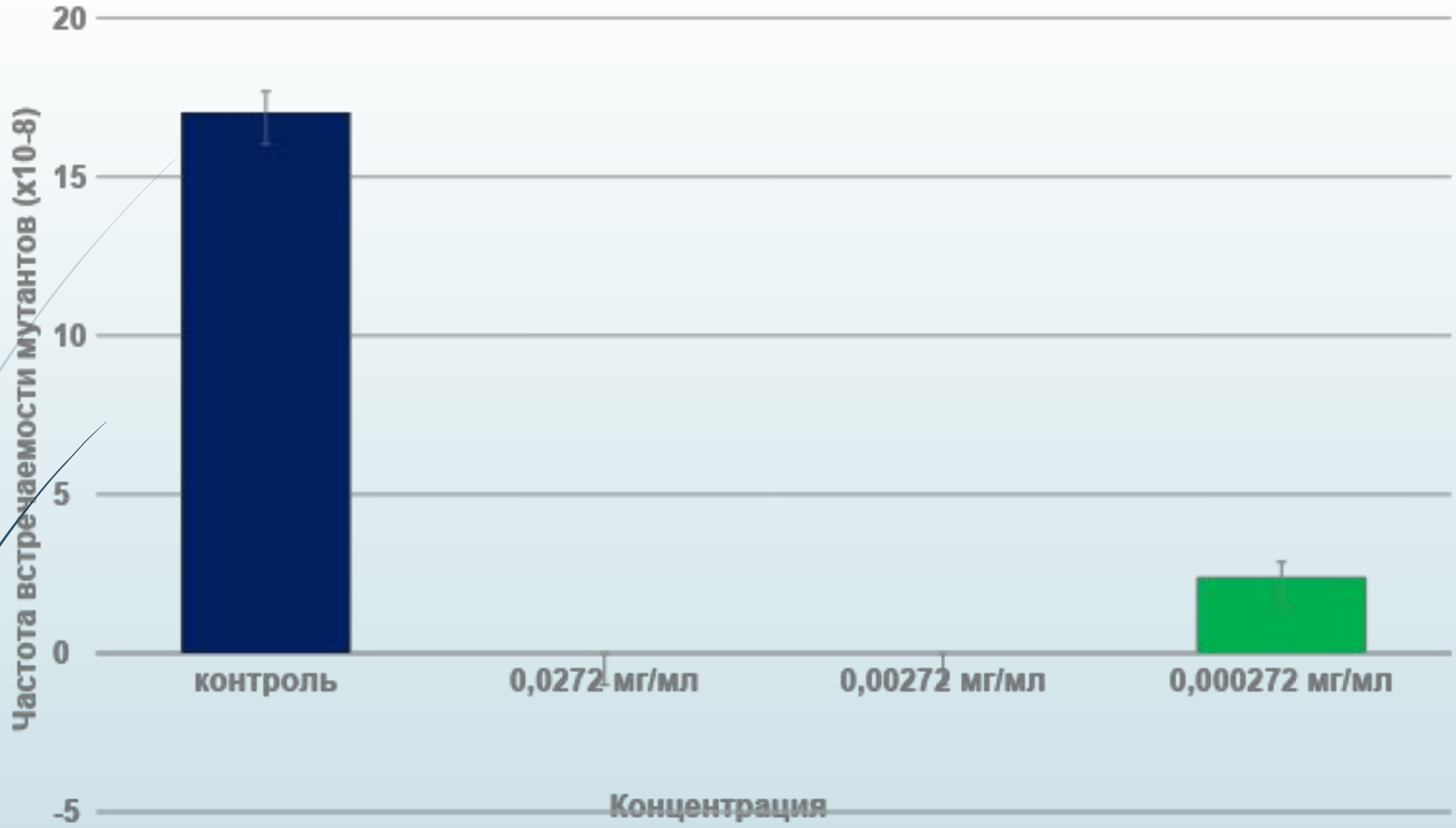
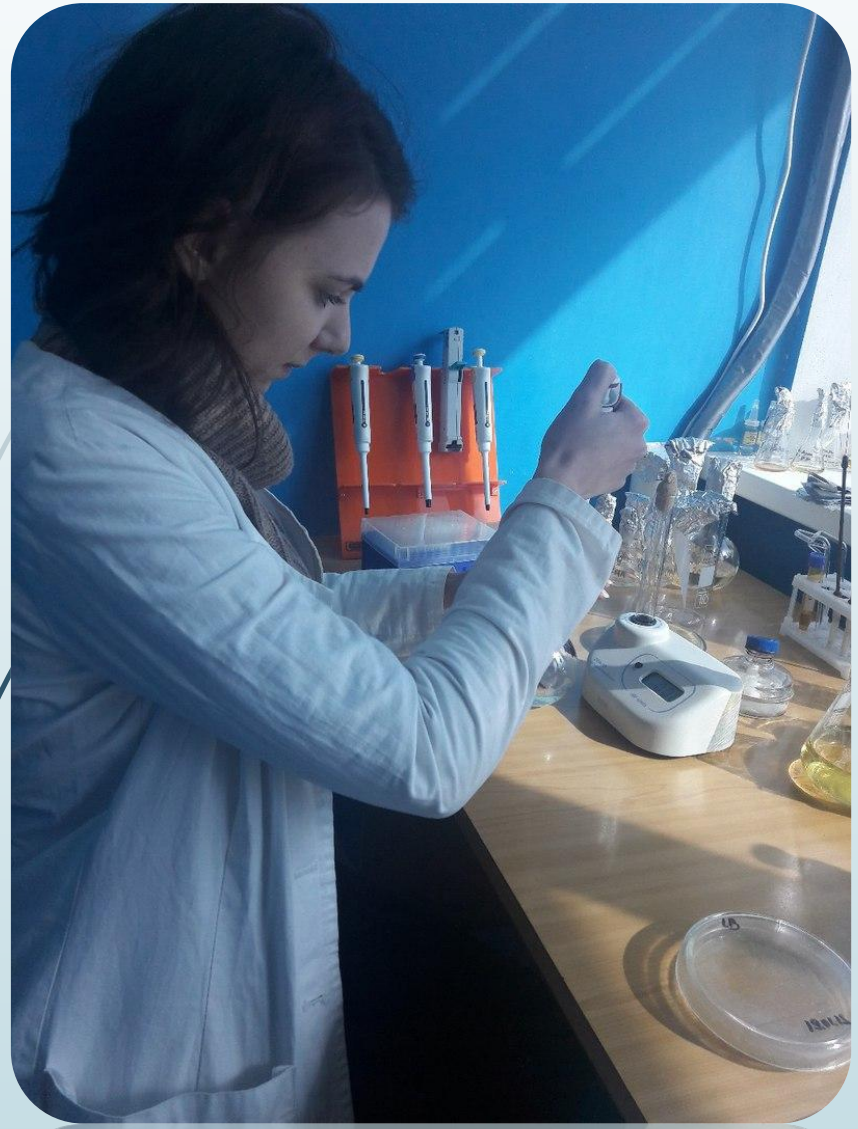


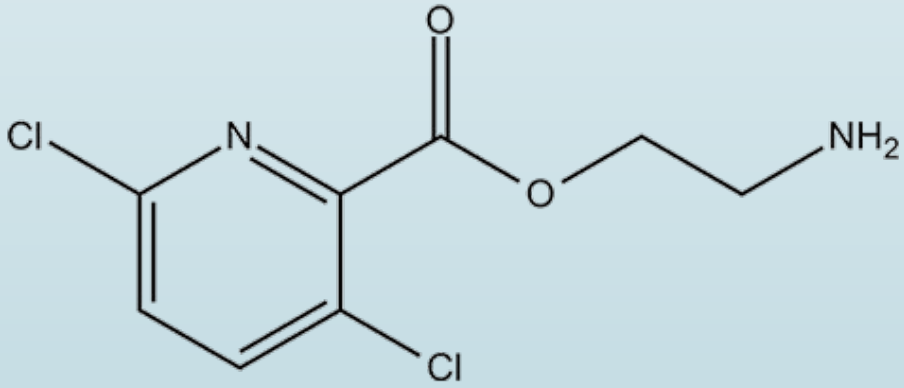
Рисунок 6 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием хлорида ртути (II)

Анализ влияния пестицидов



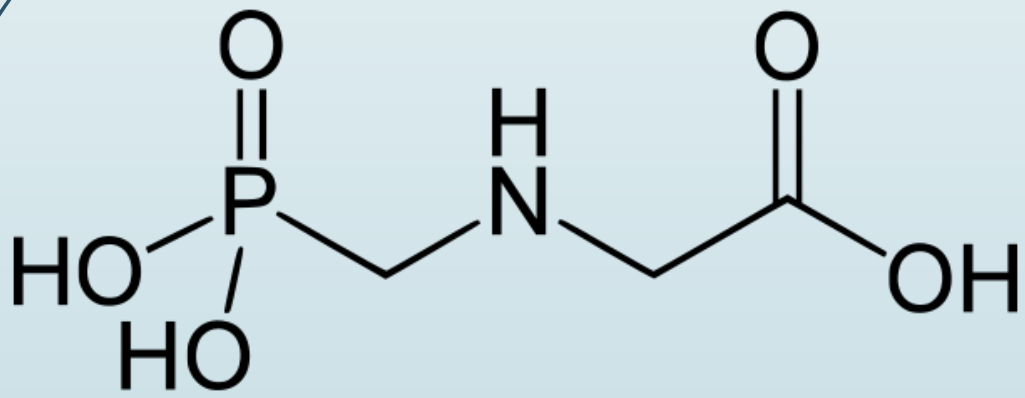
- **Клопиралид:**

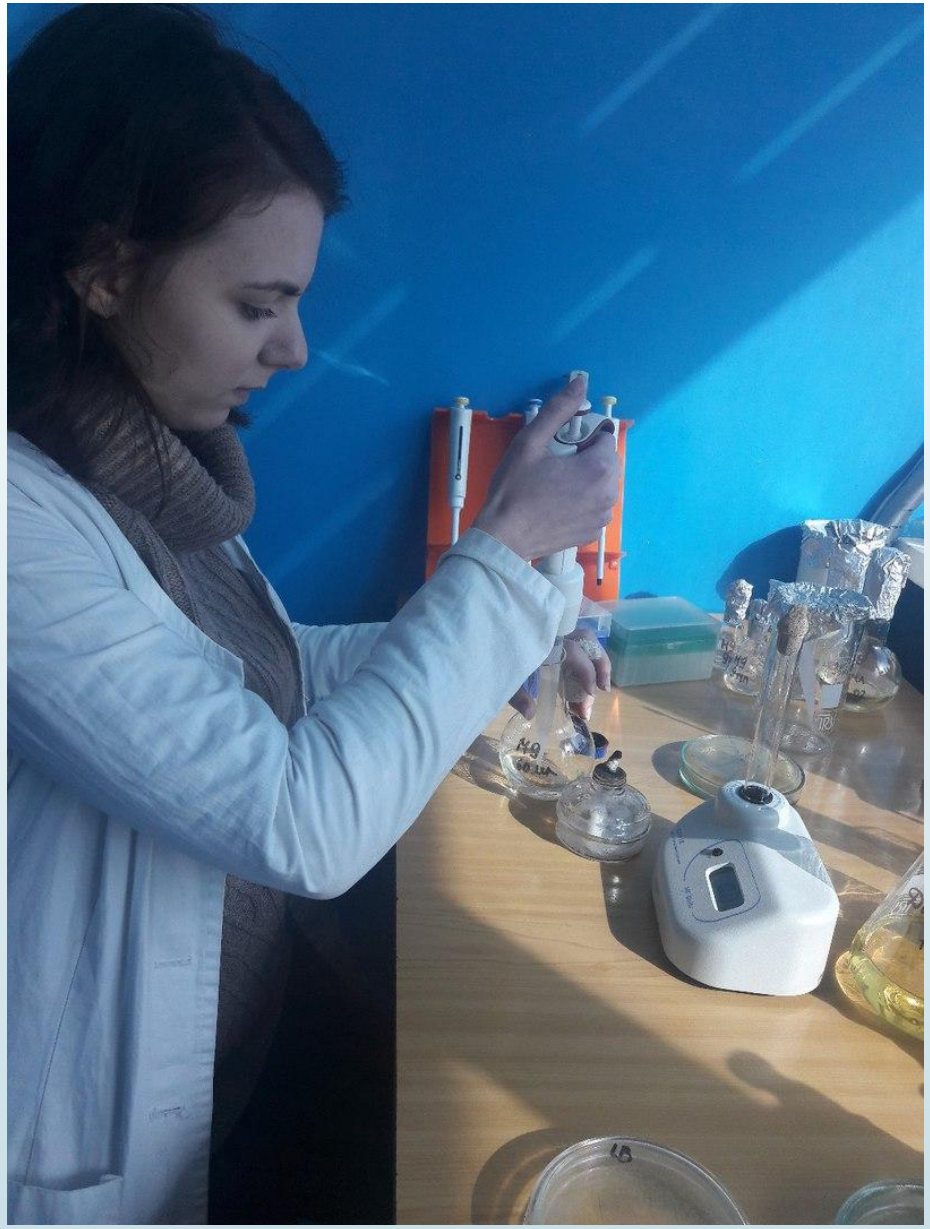
Пестицид, послевсходовый гербицид с высокой гербицидной активностью по отношению к сорнякам, устойчивым к арилоксиалканкарбоновым кислотам и их производным. Имеет вид белых кристаллов. При обычных условиях хранения устойчив. С основаниями образует водорастворимые соли. Длительное действие препарата обеспечивается за счет проникновения действующего вещества в корневую систему.



- **Глифосат:**

Пестицид, арборицид, гербицид с широким спектром активности. Обладает избирательным и сплошным действием, применяется для подавления однолетних и многолетних сорняков. В воде устойчив. Уменьшение уровня глифосата в водной системе происходит за счет влияния микрофлоры и в результате воздействия ультрафиолетового излучения





Результаты:

Рисунок 7 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием глифосата

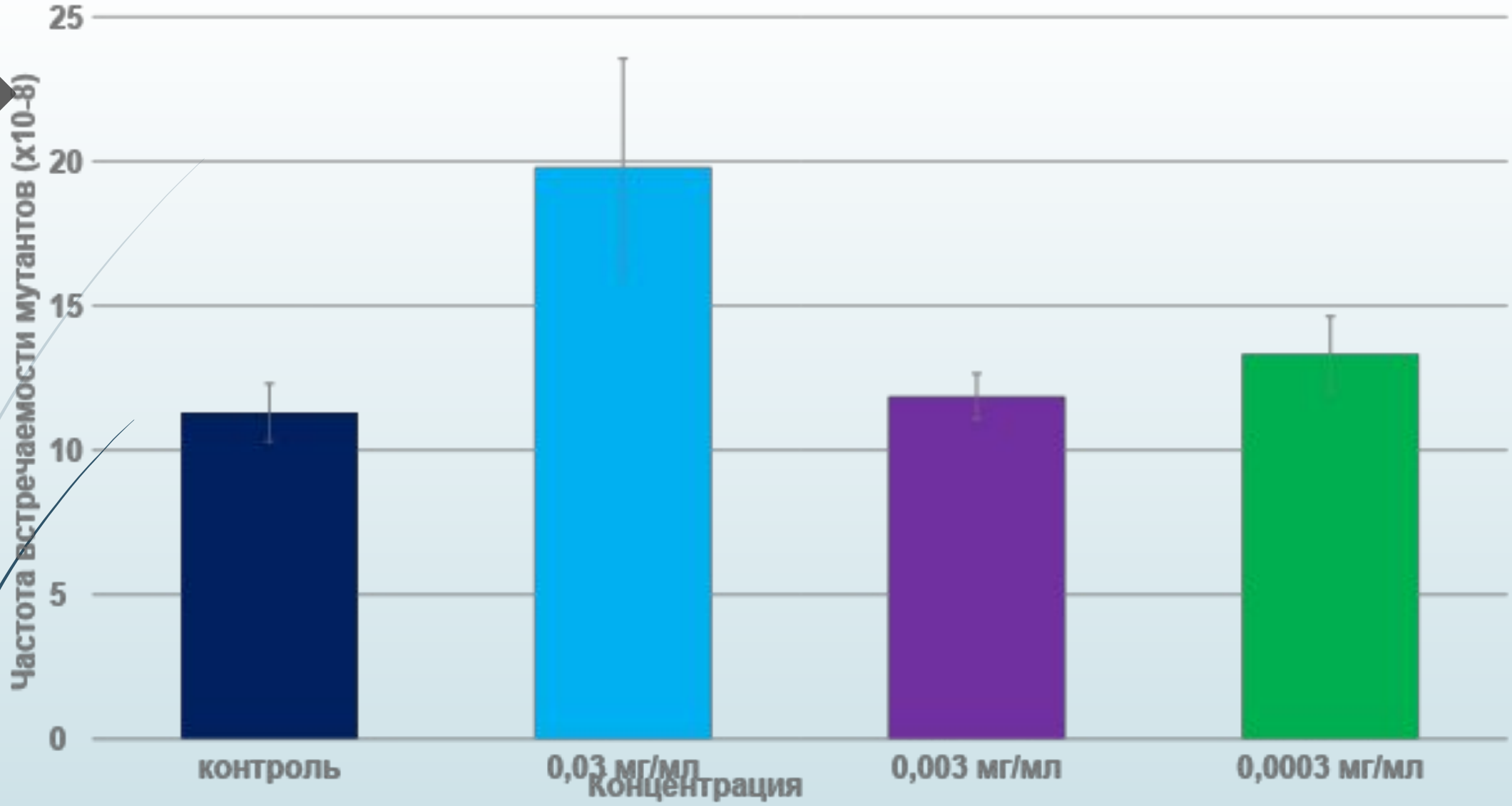


Рисунок 8 – Частота встречаемости мутантов *Pseudomonas putida* под воздействием клопиралида

Выводы:

- Было выявлено, что наибольшей мутагенной активностью из представленных веществ обладают пестициды.
- Тетрациклин, диоксидин и хлорид ртути во всех исследованных концентрациях (включая самые низкие), оказали ярко выраженное подавляющее действие на возникновение мутантов.
- Хлоргексидин показал высокую эффективность только при использовании рекомендованной концентрации, при концентрации в 10 и в 100 раз меньше, почти не подавлял развитие мутантов.
- Также было выявлено, что ампицилин обладает мутагенной активностью, которая увеличивается с концентрацией. $CuSO_4$ обладает небольшой мутагенной активностью.

- Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках научного проекта № 6.2379.2017/ПЧ

Используемая литература:

- Franz J. E. et al. Glyphosate: a unique global herbicide. – American Chemical Society, 1997.
- 2. Ivanović S., Lilić S. Presence of Campylobacter coli in slaughtered pigs and its resistance to antibiotics //Biotechnology in Animal Husbandry. – 2007. – Т. 23. – №. 5-6-1. – С. 403-410.
- 3. Ампициллин // Википедия. [2017—2017]. Дата обновления: 14.05.2017. URL: http://ru.wikipedia.org/?oldid=85404583 (дата обращения: 14.05.2017).
- 4. Stewart P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms //International Journal of Medical Microbiology. – 2002. – Т. 292. – №. 2. – С. 107-113.
- 5. Benveniste R., Davies J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria //Annual review of biochemistry. – 1973. – Т. 42. – №. 1. – С. 471-506.
- 6. Хлоргексидин // Википедия. [2018—2018]. Дата обновления: 19.02.2018. URL: http://ru.wikipedia.org/?oldid=91035315 (дата обращения: 19.02.2018).
- 7. Супотницкий М. В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий //Биопрепараты. – 2011. – №. 2. – С. 4.
- 8. Глифосат // Википедия. [2018—2018]. Дата обновления: 26.01.2018. URL: http://ru.wikipedia.org/?oldid=90530324 (дата обращения: 26.01.2018).
- 9. Jatsenko T. et al. Molecular characterization of Rif r mutations in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida //Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2010. – Т. 683. – №. 1. – С. 106-114.
- 10. Ma X. et al. rpoB gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Shandong Province, China //Journal of clinical microbiology. – 2006. – Т. 44. – №. 9. – С. 3409-3412
- 11. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance //Microbiology and

Благодарим за внимание!