

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ДЕГРАДАЦИИ ПЕСТИЦИДА ДДТ
МИКРООРГАНИЗМАМИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

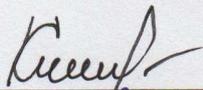
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 – Биология

Биологического факультета

Тяпкина Сергея Александровича

Научный руководитель:

канд. биол. наук, доцент

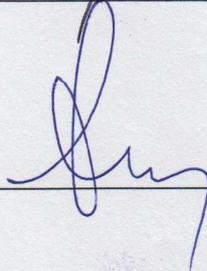


21.06.18

О.Ю. Ксенофонтова

Зав. кафедрой

докт. биол. наук, профессор



21.06.18

С.А. Степанов

Саратов 2018

Актуальность работы: Актуальная проблема экологии - глобальное химическое загрязнение биосферы. Важное место среди них, вот уже на протяжении 50 лет, занимают химические средства защиты растений и животных - пестициды. Пестициды продолжают попадать в почву, накапливаться в ней и влиять на микробные сообщества. Основное требование к вновь создаваемым препаратам: они не должны обладать отдаленными токсическими последствиями и не создавать предпосылок для нарушения экологического баланса в различных экосистемах. Так, например, после массового захоронения пестицида дихлордифенила трихлорметилметана (ДДТ), оказалось, что он десятилетиями может сохраняться в почве, а продукты его полураспада весьма токсичны и мутагенны. В связи с этим весьма актуален поиск штаммов микробов, разлагающих пестициды, т.е. микроорганизмов-деструкторов. А разработки микробиологического способа очистки почвы от пестицидов имеют приоритетное значение перед другими способами восстановления почв.

Вот уже несколько десятилетий ведется поиск штаммов - деструкторов пестицидов и создание на их основе бактериальных препаратов и разработка различных методов биотехнологии, предназначенных для ремедиации загрязненных почв. В связи с этим, почва обогащается интродуцентными бактериями деструкторами с мощной ферментативной системой. Определенный интерес представляют внехромосомные генетические элементы, детерминирующие деградацию ксенобиотиков. Способность использовать различные ксенобиотики, как правило, определяется наличием в клетках данных микроорганизмов D-плазмид. Данные плазмиды содержат в своем составе гены, определяющие синтез ферментов с широкой субстратной специфичностью.

В результате, внесение плазмидсодержащих бактерий в естественную среду обитания может способствовать горизонтальному переносу генов, ответственных за деградацию пестицидов и повышению адаптивных свойств аборигенных бактериальных популяций, населяющих данную территорию.

Анализ особенностей наследования плазмид в клетках гомо- и гетерологичных хозяев с последующим их внесением в почву и определением эффективности деградации ксенобиотика, а также изучение способности плазмид передаваться путем конъюгации в природной почве позволяют выявить наиболее эффективные штаммы-деструкторы и использовать их для создания биопрепаратов, предназначенных для биоремедиации почв, загрязненных пестицидами.

Целью данной работы являлось определение наличия плазмид у штаммов бактерий – деструкторов пестицида ДДТ и возможности их передачи другим бактериальным штаммам.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить культуральные признаки у бактерий деструкторов
2. Определить чувствительность бактерий деструкторов к антибиотикам
3. Определить наличие плазмид у бактерий – деструкторов пестицида ДДТ.
4. При наличии плазмид у бактерий деструкторов изучить возможность передачи деструктивных свойств через рекомбинации плазмидных и хромосомных генов бактериям, не способным к деградации ДДТ.

Структура магистерской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из шести подразделов: стресс-индуцированные сосудистые катастрофы мозга, феномен их развития в первые дни после рождения и гипоксия, как причина развития интракраниальных геморрагий у новорожденных детей. характеристика пестицидов и влияние на окружающую среду, история применения ДДТ, токсичность и персистентность, аналоги ДДТ, рассматриваются микроорганизмы — деструкторы пестицидов, механизмы разложения ДДТ и

освещается функциональная характеристика генов. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает четыре подраздела: изучение культуральных признаков бактерий; способности использовать ДДТ в качестве единственного источника углерода; антибиотикорезистентности штаммов бактерий; выделение плазмидной ДНК у бактерий.

Объектом исследования служили пестицид ДДТ и штаммы бактерий родов *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Jonesia*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*.

Для получения изолированных колоний бактерий использовали метод получения изолированных колоний с помощью шпателя. Для этого готовили 3 чашки с агаром. На поверхность агара 1-й чашки наносили каплю смеси бактерий и тщательно растирали ее шпателем по всей поверхности. Не обжигая шпателя, делали посев на 2-й, а затем 3-й чашке с агаром, разобщая с каждым переносом бактериальные клетки на все большее расстояние друг от друга. При выращивании на 2-й и 3-й чашках получали изолированные колонии.

Также для получения изолированных колоний использовали метод разобщения бактерий с помощью штриха с обжиганием петли.

На агаровую пластинку петлей наносили исследуемый материал и рассеивали сплошным штрихом на 1/6 поверхности чашки (1-й прием). Затем обожженной и остуженной петлей проводили 2–3 перпендикулярных штриха через посеянный сектор и всю площадь агара (2-й прием). Вторично прокаленной на пламени петлей наносили штрихи перпендикулярно ко второму приему посева (3-й прием). При выращивании получали изолированные колонии, которые после изучения отсеивались на скошенный агар для выделения чистой культуры бактерий.

Внешний вид колоний изучали макроскопически и с помощью микроскопа по следующей схеме:

- Макроскопическое изучение. При изучении колоний в проходящем свете их различали: по величине – точечная, мелкая, средняя, крупная; прозрачности – прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная; форме – правильная (круглая), неправильная.

В отраженном свете: по цвету – бесцветная, пигментированная (желтая, розовая, зеленая, черная и т.д.); высоте – плоская, плосковыпуклая, выпуклая; характеру поверхности – гладкая, шероховатая, блестящая, матовая.

- Микроскопическое изучение проводили с малым увеличением сухой системы микроскопа по следующим признакам: структура – аморфная, зернистая (мелко-, средне-, крупно-), гирозная, корневидная и т.п.; край – ровный, неровный (волнообразный, фестончатый, локонообразный, бахромчатый и т.п.)

При помощи петли при дотрагивания до колонии определяется ее консистенция (маслообразная, хрупкая, жесткая).

Для определения морфологии клеток из колоний приготавливали мазки и окрашивали по Грамму. С этой целью предварительно обожженной и остуженной петлей брали небольшую часть колоний и эмульгировали в капле воды, нанесенной на поверхность предметного стекла. Мазок подсушивали, фиксировали и окрашивали.

Отбор штаммов, использующих пестицид ДДТ как единственный источник углерода проводили на минеральной (синтетической) среде М9 (использовали в качестве базовой безуглеродной среды для культивирования микроорганизмов, селективных по углероду).

Изучение возможности штаммов использовать пестицид ДДТ как единственный источник углерода проводили на элективной среде М9, в которую после стерилизации вносили ГСО пестицида ДДТ в концентрациях 200 мкг/мл – 100 ПДК, 20 мкг/мл – 10 ПДК и 2 мкг/мл – 1 ПДК,

Об использовании пестицида ДДТ как единственного источника углерода судили по дегидрогеназной активности с раствором ТТХ [41], который добавляли в 100 мл элективной агаризованной среды М9 в количестве 1 мл (концентрация в среде – 0,01 % ТТХ). Об использовании микроорганизмами углерода из субстрата свидетельствовало окрашивание колоний и среды вокруг них в красный цвет, что указывало на восстановление ТТХ до ТФФ (трифенилформаза).

Исследуемую чистую культуру бактерий засеивали методом «отпечатка» на агаризованную среду М9 с пестицидом в чашках Петри. Посевы инкубировали в термостате при 30 °С в течение 3 суток.

Для определения антибиотикорезистентности использовали диско-диффузионный метод и метод серийных разведений.

Диско-диффузионный метод.

Питательную среду АГВ разливали в чашки, помещенные на строго горизонтальной поверхности, заполняя их на одинаковую высоту 4 мм (25 мл среды для чашек с внутренним диаметром 9 см). Исследуемый материал или культуру микроорганизмов, засеивали на поверхность питательного агара сплошным газоном. После посева крышку чашки приоткрывали не более чем на 15 мин и давали поверхности среды подсохнуть. Затем стерильным пинцетом помещали на поверхность агара бумажные диски, пропитанные раствором определенного антибиотика, и слегка придавливали. Расстояние между дисками и краем чашки должно быть не менее 15 мм. Чашки инкубировали около 18 ч при 37°С в перевернутом положении. При наличии чувствительной к антибиотику флоры вокруг соответствующих дисков отмечалась зона угнетения роста микроорганизмов. Диаметр зоны измеряли с точностью до 1 мм, определяя чувствительность (высокая, средняя, низкая).

Метод серийных разведений.

Данным методом определяли минимальную концентрацию (МИК) антибиотика, ингибирующую рост исследуемой культуры бактерий. Вначале готовили основной раствор, содержащий определенную концентрацию

антибиотика (мкг/мл или ЕД/мл) в специальном растворителе или буферном растворе. Из него готовили все последующие разведения в бульоне (в объеме 1 мл), после чего к каждому разведению добавляли 0,1 мл исследуемой бактериальной суспензии, содержащие 10^6 - 10^7 бактериальных клеток в 1 мл. В последнюю пробирку вносили 1 мл бульона и 0,1 мл суспензии бактерий (контроль культуры). Посевы инкубировали при 28° С до следующего дня, после чего отмечали результаты опыта по помутнению питательной среды, сравнивая с контролем культуры. Последняя пробирка с прозрачной питательной средой указывает на задержку роста исследуемой культуры бактерий под влиянием содержащейся в ней минимальной ингибирующей концентрации антибиотика.

Выделение плазмидной ДНК проводили согласно этапам, указанным ниже:

- Вырастили бактериальную культуру, в течение 16-24 ч при температуре 37 С.

- Осадили клетки из культуральной среды. Для этого поместили 1,5 мл «ночной культуры» в 1,7 мл микроцентрифужную пробирку и центрифугировали её в течение 2 мин при 10000 об/мин.

- Удалили супернатант выливанием через край.

- Провели повторное осаждение в эту пробирку ещё 2 раза.

- Центрифугировали 10сек. дополнительно, отобрали остатки культуральной среды микропипеткой.

- Ресуспензировали осадок в 200 мкл раствора I с помощью микропипетки или вортекса.

- Оставили при комнатной температуре на 5 мин.

- Добавили 400 мкл раствора II, сразу же резко встряхнули, перевернули 5 раз.

После этого происходил лизис бактерий и щелочная денатурация ДНК.

- Поместили образцы на лед (0 С) на 5 мин и добавили 300 мкл холодного раствора III, 5 раз перевернули пробирку и оставили на льду на 5 мин.

- Центрифугировали полученную смесь в течение 5 мин. при максимальной скорости центрифуги для осаждения хромосомной ДНК.

- Супернатант, содержащий плазмидную ДНК, перенесли микропипеткой в новую пробирку, содержащую 500 мкл изопропанола, смешали переворачиванием пробирки, оставили на 10 мин на столе.

- Осадили плазмиду центрифугированием в течение 10 мин при максимальной скорости центрифуги, супернатант затем вылили через край, а остатки после короткого центрифугирования отобрали микропипеткой.

- Плазмидный осадок растворили в 100 мкл TE-буфера (можно 200 мкл).

После чего получившийся раствор плазмидной ДНК необходимо было подвергнуть дальнейшей очистке – провести фенольную депротеинизацию образца. Для этого в пробирку добавили равный объем смеси фенол–хлороформ, тщательно перемешали и разделили фазы центрифугированием (10 мин, 10000 об/мин).

- Перенесли верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавили равный объем смеси хлороформ–изоамиловый спирт (помимо денатурации протеинов она удаляет остатки фенола), хорошо перемешали и разделили органическую и водную фазы центрифугированием в течение 3 мин.

- Отобрали верхнюю водную фазу, добавили 1/10 объема холодного раствора 3М ацетата калия, рН 5,0 и высадили ДНК этанолом. Для высадки ДНК этанолом добавили в пробирку 1 мл холодного (-20 С) этанола и поместили образец на лёд или в морозильник не менее чем на 15 мин.

- Осадили плазмидную ДНК центрифугированием в течение 10 мин, 10000 об/мин.

- Добавили к осадку 1 мл 70% этанола для промывки осадка ДНК и центрифугировали 3 мин.

- Слили получившийся супернатант. После чего перевернули пробирки на фильтр и подсушили осадок на воздухе в течение 0,5 ч. Растворили в 50–100 мкл воды.

Обсуждение результатов исследования

Важным аспектом для нашей работы было выявление среди 24 штаммов микроорганизмов родов *Amphibacillus*, *Bacillus*, выделенных из загрязненных пестицидами почв, способных к использованию пестицида ДДТ в качестве единственного источника углерода. В результате, было установлено, что только 8 штаммов (*Amphibacillus xylanus* 165, *Amphibacillus xylanus* 150.2, *Bacillus sp.* 154, *Bacillus sp.* 166, *Bacillus sp.* 179, *Bacillus sp.* 114, *Bacillus sp.* 129, *Bacillus sp.* 102) микроорганизмов используют пестицид ДДТ. Для дальнейшей работы были отобраны именно эти штаммы. Так как способность к деструкции различных веществ может передаваться с хромосомными и внехромосомными генами при вертикальном и горизонтальном переносе, то это может способствовать расширению деградативного потенциала. Поэтому можно предположить, что бактерии, содержащие гены деградации пестицидов, могут увеличивать степень деструкции, передавая их аборигенным штаммам, которые находятся в почве. Данное свойство позволило бы увеличить численность штаммов деструкторов в местах загрязнения углеводородами. Такая передача и закрепление этих генов у почвенных бактерий, находящихся в местах загрязнения, не потребует повторной интродукции бактерий деструкторов в составе препаратов, что значительно удешевит затраты на биоремедиационные технологии.

Для создания пар бактерий для передачи способности к деструкции пестицидов от одного штамма другому было необходимо изучить их культуральные признаки для дифференциации донора от реципиента после их совместного культивирования. В результате проведенных экспериментов нами описаны 4 штамма, обладающие способностью использовать пестицид ДДТ как единственный источник углерода и 4 штамма – не способных использовать углерод ДДТ. На основании этих результатов созданы 4 пары штаммов, отличающиеся культуральными признаками.

Между тем, антропогенный прессинг, оказываемый на экосистемы, может способствовать распространению среди бактерий не только устойчивости к пестицидам, но и появлению антибиотикорезистентных штаммов в природе. Уже известно о способности инсектицидов приводить к возрастанию резистентности к антибиотикам среди почвенных бактерий сельскохозяйственных почв, а также о существовании перекрестной резистентности к пестицидам и антибиотикам. Так же, имеются данные, указывающие на связь между возникновением антибиотикорезистентности у бактерий и загрязнением почв тяжелыми металлами (ссылка)

В связи с вышеизложенным, нам было интересно выяснить как изменяется антибиотикорезистентность у бактерий деструкторов после пребывания на среде с пестицидом. Для этого нами был выявлен антибиотик, к которому штаммы деструкторы изначально проявляли наибольшую чувствительность.

Анализ полученных данных выявил высокую чувствительность у штаммов деструкторов к ампициллину. В дальнейшем мы изучали изменение чувствительности штаммов деструкторов именно к этому антибиотику методом серийных разведений и определением МИК до и после контакта с пестицидом ДДТ. В результате проведенного исследования было показано, что после контакта штаммов бактерий с ДДТ приводит к появлению устойчивых к ампициллину мутантов. В проведенном нами исследовании, наиболее ярко выраженный эффект проявления устойчивости наблюдался у штамма *Bacillus sp.* 114.

Полученные в ходе исследования результаты указывают на высокий риск распространения устойчивости к антибиотикам среди микробных сообществ почв, подверженных обработке пестицидами. Тем не менее, следует отметить, что данные были получены в результате лабораторного эксперимента и требуется дальнейшее изучение данной проблемы в условиях, приближенных к естественным.

Механизмы резистентности микроорганизмов к антибиотикам и другим препаратам могут быть связаны с модификациями, мутациями и рекомбинациями. Резистентность микробов к антибиотикам обеспечивается генами, которые локализуются или в хромосоме, или в составе внехромосомных элементов наследственности (транспозоны, плазмиды). Однако чаще всего резистентность к химиотерапевтическим препаратам, в том числе антибиотикам, приобретается микробными клетками с генами плазмид, которые они получают в процессе своей жизнедеятельности от других клеток данной или соседней популяции.

В связи с этим, нам было интересно определить наличие плазмид в клетках бактерий, приобретающих устойчивость к ампициллину в результате контакта с пестицидом и возможность их передачи другим штаммам. Однако анализ полученных результатов не выявил плазмид у штаммов деструкторов.

Так как ДНК плазмид нами не обнаружены, то возможность горизонтального переноса генов резистентности исключается, а выявленная устойчивость формируется за счет мутаций, происходящих в хромосомных генах, которые могут расти при контакте бактерий с токсикантами. Последние играют лишь роль селекционирующих агентов, элиминируя чувствительные клетки популяции, что приводит к преобладанию резистентных клеток. И при удалении токсиканта, резистентность может снижаться.

В настоящее время роль пестицидов в распространении лекарственной устойчивости в микробных сообществах до конца не выявлена, в связи с тем, что на данный процесс оказывают свое влияние различные факторы. Вполне вероятно, что в определенных условиях эти вещества могут способствовать распространению лекарственной устойчивости в природных микробных сообществах, однако для подтверждения вышеописанной гипотезы требуется

проведение дальнейших исследований с использованием бактерий различных родов и широкого спектра токсических веществ.

Заключение:

1. Способностью использовать углерод пестицида ДДТ обладают бактерии родов *Amphibacillus*, *Bacillus*.

2. Показано, что контакт штаммов бактерий с высокой концентрацией ДДТ приводит к появлению устойчивых к антибиотикам мутантов. Наиболее ярко выраженный эффект проявления антибиотикорезистентности наблюдался у штамма *Bacillus sp.* 114.

3. Антибиотикорезистентность штаммов и способность к деструкции ДДТ не связана с плазмидами и не возможна при горизонтальном переносе генов. Возможно, выявленная устойчивость формируется за счет мутаций в хромосомных генах, которые могут расти при контакте бактерий с токсикантами.

Тягу
21.06.88

