

Undersökning av evolution av resistens mot metalljoner hos *E. coli*

Ylva Sunnerhagen

Syfte: Resistensutveckling mot metalljoner hos bakterier kan vara intressant att studera eftersom metaller används antiseptiskt, särskilt silver. Huvudfrågeställningen för mitt arbete är:

I vilken utsträckning går det att selektera fram resistens mot metalljoner hos bakterien *E. coli*?

Sedan har jag dessa underfrågeställningar:

Hur hög koncentration kan de bli resistenta mot?

Med vilken kinetik (hur många generationer tar det innan man når maximal resistens) går utvecklingen?

Medför resistens mot ett ämne även resistens mot något annat?

Hur snabbt växer de resistenta stammarna under normala förhållanden utan närvaro av metalljoner?

Får man samma mekanismer för resistens hos alla stammar?

Metod: Jag odlade *E. coli*-bakterier i närvaro av gradvis ökande koncentration av metalljoner, och studerade tillväxten. Koncentrationen inhiberade men stoppade inte tillväxt, vilket borde medföra en kraftig selektion för mutationer som ökar tillväxthastigheten. Detta ger populationer med kraftig expansion följt av flaskhalsar, genom seriell utspädning, vilket borde förbättra förutsättningarna för att nya fördelaktiga mutationer som inte dominerade populationen förut nu kan dominera. Försöksupplägget gav möjlighet att studera hastigheten på resistensutvecklingen och hur höga koncentrationer som resistens kunde utvecklas mot. Jag studerade också huruvida resistens mot en metalljon medför resistens mot någon annan metalljon (pleiotropi).

Jag började med att bestämma rätt ingångskoncentration för de olika jonerna, dvs. det skulle vara en viss reduktion av tillväxthastigheten. Först letade jag i litteraturen efter värden på detta. Sedan kontrollerade jag uppgifterna genom att testa med fem koncentrationer: 0,1x litteraturvärdet, 0,3x litteraturvärdet, 1x litteraturvärdet, 3x litteraturvärdet och 10x litteraturvärdet. Jag valde det högsta värde där man fortfarande kunde se tillväxt. Jag valde jonerna silver(Ag^+), koppar(Cu^{2+}) och mangan (Mn^{2+}).

Jag odlade bakterier vid MIC (minimum inhibitory concentration) i 96håls mikrotiterplattor. De fick växa till stationärfas. Därefter fördes 5 μl av den gamla kulturen över till 300 μl färskt medium med samma jonkoncentration som förut. Det ger ca. 6 generationer per omsättning. Som jämförelse hade jag hela tiden en kultur av bakterier som växte i rent medium utan metallsalter. Beroende på hur lång tid jag hade till nästa tillfälle jag kunde sätta om bakterierna använde jag odlingsskåp med högre eller lägre temperatur. Ungefär var 20:e generation höjde jag koncentrationen. Koncentrationen höjdes med ungefär 50% per gång. Stegen var 1x originalvärdet, 1,5x originalvärdet, 3x originalvärdet, 5x originalvärdet och 8x originalvärdet.

Jag mätte resistensen för de framevoluerade stammarna genom att samla ihop ursprungsstammen, de senaste stammarna från respektive selektion, och den stam som hade

fått växa utan närvaro av metalljoner. Jag tillverkade olika agarplattor med olika koncentrationer av metalljonerna, i närheten av slutkoncentrationerna, men anpassade så att jag kunde se resistensen bättre. Jag gjorde sedan en spädningsserie av de olika stammarna på varje platta, och lät dem växa i odlingsskåp. Jag kunde då tydligt se om resistens hade utvecklats och om resistens mot ett ämne medförde resistens mot något annat ämne.

Resultat: Startvärdena var 10 μM för silver, 1mM för koppar och 10mM för mangan. I litteraturen hade jag hittat följande värden:

För silver 10-20 μM som MIC.

För koppar 3 mM.

För mangan endast att det ska vara $>10\text{mM}$.

Totalt hade jag strax över 100 generationer, med 21 omsättningar. Jag satte om dem ca 2-3 gånger i veckan. Jag höjde koncentrationerna efter 4-5 omsättningar. En kopparstam dog ut efter 17 omsättningar. Koncentrationen var då 3mM. De andra kopparstammarna hade svårt att klara av den koncentrationen, men sedan klarade de 5mM. De högsta koncentrationerna som jag fick i mikrotiterplattorna var:

80 μM för silver

5mM för koppar

80mM för mangan

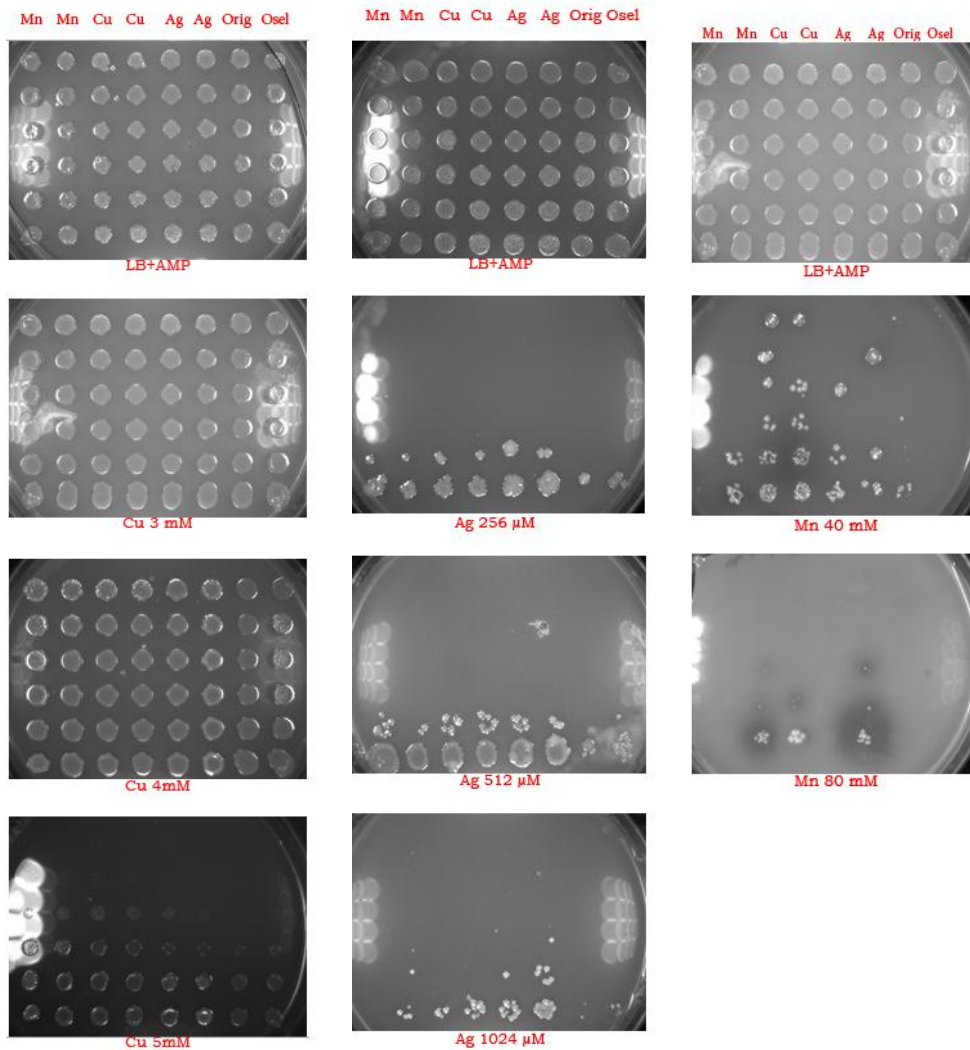
De koncentrationer på agar-plattor som jag använde och kunde se resistens på var:

Silver: 256 μM , 512 μM , 1024 μM

Koppar: 3mM, 4mM, 5mM

Mangan: 40mM, 80 mM

Här är bilderna på agar-plattorna.



Figur 1. Droppetest av bakterier selekterade i olika metalljonlösningar, på agar-plattor innehållande olika koncentrationer av koppar. Nedersta raden är oustpadd bakterielösning, varje rad över är spädd 1:6 av raden under. I varje kolumn innehåller den översta plattan inga metalljoner.

Figur 2. Som figur 1, men med agar-plattor innehållande olika koncentrationer silver.

Figur 3. Som figur 1, men med agar-plattor innehållande olika koncentrationer mangan.

Källor:

Manganese-Resistant Mutants of Escherichia coli: Physiological and Genetic Studies

S. Silver, P. Johnseine, E. Whitney and D. Clark **J. Bacteriol.** 1972, 110:186.

The copper-inducible ComR (YcfQ) repressor regulates expression of ComC (YcfR), which affects copper permeability of the outer membrane of Escherichia coli

M. Mermod, D. Magnani, M. Solioz, J. Stoyanov **Biometals** 2012, 25:33–43