

## Selekcija bakterije *Escherichia coli* za rezistenciju na ultrazvučnu sonifikaciju

Cilj ovog rada bio je da se ustanovi da li bakterija *Escherichia coli* može da evoluiru u pravcu povećanja rezistencije na ultrazvučnu sonifikaciju putem selekcije. Kako bi se obezbedila dovoljno velika genetička varijabilnost unutar eksperimentalne populacije kreirana je sintetička populacija mešanjem dva laboratorijska soja bakterije *E. coli*. Pilot eksperimentom je utvrđivana stopa preživljavanja bakterija u funkciji dužine ekspozicije ultrazvučnoj sonifikaciji. Na ovaj način je procenjeno da se stopa preživljavanja od 30% postiže ekspozicijom od 29 minuta. U selekcionom eksperimentu su od sintetičke populacije napravljene dve replike, a zatim su izlagane ultrazvučnoj sonifikaciji 29 minuta. U tri naredna dana, vreme sonifikacije je produžavano za po 6 minuta (35, 41 i 47 minuta), kako bi se obezbedilo povećanje selekcionog pritiska kroz generacije. Između selekcionih tretmana, populacije su održavane u inkubatoru u bogatom tečnom medijumu. Efekat selekcije je procenjen na osnovu stope preživljavanja u dve selekcionisane i jednoj neselekcionisanoj populaciji, izlaganih ultrazvučnoj sonifikaciji sa istim vremenima ekspozicije koje su bile primenjivane tokom selekcije. Na osnovu broja formiranih kolonija populacijâ podvrgnutih sonifikaciji, utvrđeno je da selekcionisane bakterijske populacije imaju značajno veću stopu preživljavanja od populacije koja nije prošla kroz proces selekcije za rezistenciju na ultrazvučnu sonifikaciju. Dalja istraživanja bi trebalo da obuhvate utvrđivanje fizioloških genetičkih i molekularnih mehanizama koji su doveli do povećanja rezistencije u selekcionisanim linijama.

## Uvod

Prirodna selekcija je evolucioni mehanizam koji se zasniva na diferencijalnom preživljavanju i reprodukciji jedinki (genotipova) u populaciji. U populaciji, različite jedinke poseduju različita fenotipska svojstva i pri određenim uslovima spoljašnje sredine, neke fenotipske osobine omogućavaju svojim nosiocima da imaju veću stopu preživljavanja i reprodukcije u odnosu na jedinke koje poseduju alternativna svojstva. Ukoliko je bar jedan deo fenotipskih razlika među jedinkama uslovljen genetičkim razlikama, učestalost upravo tih svojstava koje favorizuje prirodna selekcija će se povećavati iz generacije u generaciju (Freeman i Herron 2004).

Ultrazvuk je zvučni talas koji ima frekvenciju veću od maksimalne frekvencije koju ljudsko uho može da čuje (20 kHz). Početkom šezdesetih godina prošlog veka, započeta su istraživanja mehanizama kojim ultrazvučna sonifikacija dovodi do inhibicije rasta bakterija. Glavni mehanizam ultrazvučne inaktivacije bakterija je ultrazvučna kavitacija. U tečnom okruženju, pod uticajem ultrazvučnog talasa, dolazi do brzih promena lokalne gustine molekula (rarefakcije – razređenja, i kompresije – zgušnjavanja). Zarobljeni mehurići gasa (veličine nekoliko  $\mu\text{m}$ ) u rastvoru se tokom rarefakcije povećavaju (eksplozija), dok se tokom kompresije smanjuju (implozija). Ova variranja zapremine mehurića gasa su vrlo brza (reda veličine  $\mu\text{s}$ ). U unutrašnjosti mehura tokom implozije javljaju se uslovi ekstremno visoke temperature od 2000-4000 K (Misik *et al.* 1995) i pritiska od 330 atm (Seghal *et al.* 1979), koji mogu oštetiti mikroorganizme. Takođe, pod uticajem ultrazvuka, dešavaju se sonohemijske reakcije, u kojima se stvaraju re-

---

Pavle Stojković (1999), Beograd, Omladinskih brigada 7/17, učenik 3. razreda Devete gimnazije „Mihailo Petrović Alas” u Beogradu

MENTOR: Nevena Maslač, student Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

aktivni molekuli kao što je  $H_2O_2$  (vodonik-peroksid), koji takođe mogu da dovedu do oštećenja i smrti mikroorganizama (Gao *et al.* 2014).

**Cilj ovog rada** bio je da se ustanovi da li bakterija *Escherichia coli* može da evoluiru u pravcu povećanja rezistencije na ultrazvučnu sonifikaciju putem selekcije.

## Materijal i metode

Radi postizanja što veće genetičke varijabilnosti napravljena je sintetička populacija mešanjem dostupnih laboratorijskih sojeva bakterije *E. coli*. U pilot eksperimentu je utvrđeno je da je za postizanje visokog selekcionog pritiska, na kome preživljava 30% populacije potrebna ekspozicija ultrazvuku od 29 minuta. Selekcioni pritisak je tokom eksperimenta povećavan produžavanjem ekspozicije za po 6 minuta. Na kraju, upoređeno je preživljavanje neselekcionisane i selekcionisanih linija pri vremenima izlaganja ultrazvučnoj sonifikaciji koja su korišćena u eksperimentu.

**Sintetička populacija.** Pre početka eksperimenta formirana je sintetička populacija od bakterijskih sojeva *E. coli* K12 i *E. coli* 25922, tako što je iz po tri prekonočne kulture ovih sojeva uzeto po 10 mL uzorka i inokulisano u još 90 mL LB medijuma (Knežević-Vukčević i Simić 1999).

Eksperimentalne populacije, označene kao BEBA 1 i BEBA 2 su proizašle iz ove sintetičke populacije.

**Pilot eksperiment.** Pre početka pilot eksperimenta, izdvojeno je 60 mL sintetičke populacije, koja je dostigla optičku gustinu od 0.6 na 600 nm i podeljeno u 12 epruveta. Epruvete su zatim tretirane ultrazvukom frekvencije 35 kHz u trajanju od 3, 6, 10, 15 i 20 minuta, uz netretiranu kontrolu (po dve epruvete za svaku vremensku tačku). Nakon tretmana ultrazvukom, napravljena su serijska razblaženja i zasejana na neselektivnu hranljivu podlogu (Plate Count Agar, PCA) u duplikatu. Na osnovu broja izraslih kolonija, izračunat je broj bakterija po mililitru medijuma. Na osnovu rezultata pilot eksperimenta, utvrđeno je da je za preživljavanje 30% populacije, što se smatra visokim selektivnim pritiskom, potreban tretman ultrazvukom u trajanju od 29

minuta, pa je ta dužina ekspozicije korišćena u daljem radu.

**Faza selekcije.** Eksperimentalne populacije su uzorkovane iz inicijalne sintetičke populacije u trenutku kada je njena optička gustina dostigla 0.6 na 600 nm. Obe populacije su bile tretirane ultrazvukom u trajanju od 29 minuta i potom su odgovarajuća serijska razblaženja zasejana na PCA, radi utvrđivanja broja bakterija po mililitru. Napravljene su prekonočne kulture obe eksperimentalne populacije, koje su narednog dana bile izložene tretmanu ultrazvukom u trajanju od 35 minuta. Postupak je ponovljen, a narednog dana tretman je trajao 41 minut. Poslednji korak selekcije je podrazumevao ekspoziciju ultrazvučnom tretmanu od 47 minuta. Jedna od dve eksperimentalne populacije nije prošla kroz poslednji korak selekcije, usled kontaminacije.

**Finalni eksperiment.** Iz nove sintetičke populacije, koja nije bila izlagana tretmanu ultrazvukom, izdvojeno je po 10 mL bakterijske suspenzije za svaku ekspoziciju (29, 35, 41 i 47 minuta), kao i iz eksperimentalnih populacija koje su prošle kroz fazu selekcije. Svi uzorci su zatim tretirani ultrazvukom u odgovarajućem trajanju, nakon čega su zasejani na PCA podlogu u triplikatu, radi utvrđivanja broja bakterija po mililitru.

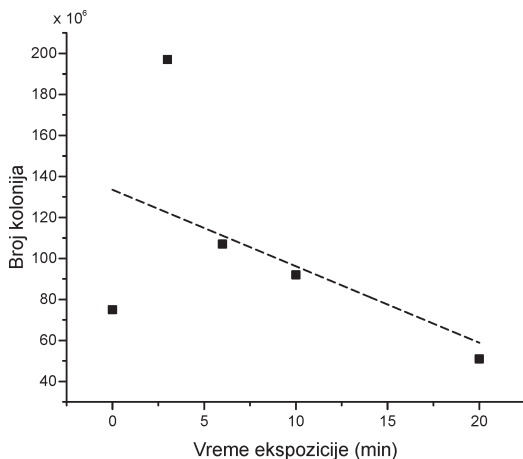
## Rezultati i diskusija

**Pilot eksperiment.** U pilot eksperimentu, utvrđeno je početno vreme tretiranja bakterija ultrazvukom.

Na osnovu grafika zavisnosti broja bakterija po mililitru od vremena ekspozicije ultrazvuku (slika 1) određena je linearna funkcija koja glasi:  $y = -3.8t + 140$ , pri čemu je  $t$  – dužina tretmana u minutima, a  $y$  – broj kolonija u milionima. Koristeći ovu funkciju, određeno je da vreme tretmana na kojem preživljava 30% bakterija iznosi 29 minuta.

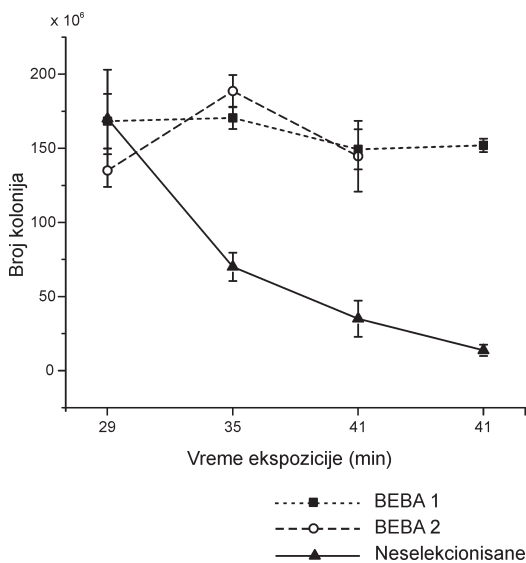
**Finalni eksperiment.** Uočena je razlika u stopi preživljavanja neselekcionisane linije i selekcionisanih linija (slika 2).

Jedno od velikih pitanja u biologiji odnosi se na brzinu evolucije, tj. na vreme koje je potrebno da se genetička struktura populacije promeni i da ta promena bude uočljiva na nivou fenotipa.



Slika 1. Grafik zavisnosti preživljavanja od vremena izlaganja ultrazvučnoj sonifikaciji.

Figure 1. Dependency of survival on exposure interval of ultrasound sonification



Slika 2. Stopa preživljavanja neselekcionisane i selekcionisanih linija.

Figure 2. Survival rate of the unselected (black triangle) and two selected lines.

Eksperimentalna evolucija je istraživački pristup, u kome se laboratorijske populacije postavljaju u jasno definisane i kontrolisane sredinske uslove i populacijama se dopušta da se tokom generacija menjaju i adaptiraju na zadate uslove. Kroz ovaj pristup, u laboratorijama se simuliraju prirodni evolucionarni mehanizmi: mutacije, genetički drift i prirodna selekcija. Drugim rečima, u eksperimentalnoj evoluciji ne postoji direktna genetička intervencija u populacijama niti odabiranje genotipova za narednu populaciju, već preživljavanje i reprodukcija zavise od adaptivne vrednosti svakog genotipa u konkretnim uslovima (Garland i Rose 2009).

Bakterije, kao model sistem u eksperimentalnoj evoluciji, imaju brojne prednosti i mane. Kratko vreme generacije je očigledna prednost, s obzirom na to da za relativno kratko apsolutno vreme protekne veliki broj bakterijskih generacija. Sa druge strane, izostanak seksualne reprodukcije kao značajnog izvora genetičke varijabilnosti predstavlja ograničenje ovog eksperimentalnog model sistema.

U urađenom eksperimentu, testirana je hipoteza da kratkotrajno izlaganje bakterije *E. coli* ultrazvučnoj sonifikaciji može dovesti do selekcionog odgovora, u kome se očekuje sticanje nekih fenotipskih svojstava bakterija, koje im omogućavaju preživljavanje i reprodukciju u uslovima izloženosti ultrazvuku. Ultrazvuk se često koristi za sterilizaciju, zbog čega se izloženost bakterija ovom tretmanu može smatrati značajnim selektivnim pritiskom na njihovo preživljavanje. Rezultati eksperimenta pokazuju da bakterije u selekcionisanim linijama, značajno bolje preživljavaju sonifikaciju ultrazvukom frekvencije 35 kHz u vremenima ekspozicije dužim od 35 minuta. Za razliku od toga, na vremenu ekspozicije od 29 minuta ove razlike nisu uočene, što ukazuje na to da je efikasnost ultrazvučnog tretmana dozno-zavisna i da pri kraćim ekspozicijama nije dovoljno velik selekcionarni pritisak kako bi se pokazala značajna razlika u stopi preživljavanja selekcionisanih i neselekcionisanih sojeva. Jedan od interesantnih rezultata sprovedene studije je povećanje broja bakterijskih kolonija, pri najkraćim ekspozicijama ultrazvuku (3 minuta). U pilot eksperimentu je pokazano da se pri ekspoziciji od 3 minuta javlja 2.5 puta veći broj bakterijskih kolonija nego u

netretiranim uzorcima. Inače, pojava da male doze, inače nepovoljnih faktora sredine, deluju povoljno na preživljavanje i reprodukciju organizama označava se terminom hormeza (Stebbing 1982).

Kakve su se evolucione promene odigrale u selekcionisanim populacijama predstavlja pitanje za niz dodatnih istraživanja. Poznato je da ultrazvuk niske frekvencije dovodi do mehaničkih oštećenja membrane i citoplazme ćelije u procesu ultrazvučne kavitacije (Misik *et al.* 1995), pa se može pretpostaviti da su se fenotipske promene odigrale na nivou membranske strukture bakterija. U osnovi ovih promena fenotipa, mogu se nalaziti genetičke promene (mutacije), ali i epigenetičke promene i membransko i citoplazmatsko nasleđivanje.

## Zaključak

Utvrđeno je da postoji razlika u preživljavanju bakterija koje su prethodno selekcionisane u odnosu na neselkcionisanu liniju prilikom izlaganja ultrazvuku frekvencije 35 kHz. Buduća istraživanja treba usmeriti na istraživanje mehanizama koji su u osnovi sticanja rezistencije na ovaj vid fizičkog stresa kod bakterije *E. coli*.

## Literatura

Freeman S., Herron J. 2004. *Evolutionary Analysis*. 3rd ed. Washington: Pearson Prentice Hall, str. 154-159.

Garland T., Rose M. R. 2009. *Experimental Evolution: Concepts, Methods and Applications of Selection Experiments*. University of California Press

Gao S., Lewis G., Ashokkumar M., Hemar Y. 2014. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effects of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonic Sonochemistry*, **21**: 446.

Hua I., Thompson J. 2000. Inactivation of *Escherichia coli* by sonification at discrete sonic frequencies. *Water Research*, **34** (15): 3888.

Joyce E., Al-Hashimi A., Mason T. J. 2011. Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. *Journal of applied microbiology*, **110**: 862.

Knežević-Vukčević J., Simić D. 1999. *Metode u mikrobiologiji, prvi deo, Praktikum*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Misik V., Miyoshi N., Riesz P. 1995. EPR spin-trapping study of the sonolysis of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O mixtures: probing the temperature of cavitation regions. *Journal of Physical Chemistry*, **99**: 3605.

Seghal C., Steer R. P., Sutherland R. G., Verrall R. E. 1979. Sonoluminescence of argon saturated alkali metal salt solutions as a probe of acoustic cavitation. *Journal of Physical Chemistry*, **70**: 2242.

Stebbing A. R. D. 1982. Hormesis-The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, **22**: 214.

Tolbin A., Dusheck J. 1998. *Asking About Life*. Philadelphia: Saunders College, str. 482-494.

---

*Pavle Stojković*

## Selection for Resistance to Ultrasound Sonication in *Escherichia coli*

The aim of this study was to determine whether the bacteria *Escherichia coli* can evolve towards increasing resistance to ultrasound sonication.

Natural selection is an evolutionary mechanism based on differential survival and reproduction of different genotypes within a population under various environmental conditions. The frequencies of genotypes with better phenotypic performance increase in subsequent generations.

In order to increase the amount of genetic variation for selection to act upon, the synthetic population was created by mixing two laboratory strains of *E. coli*. The survival rate of bacteria depending on exposition duration was determined in the pilot experiment and it was assessed that 30% of population survive when exposed to ultrasound of 35 kHz frequency during 29 minutes. In the selection experiment, two replicate lines were derived from the synthetic population and were exposed to the treatment determined in the pilot experiment. For three following days, the duration of the treatment was increased by six

minutes, to increase the selection pressure. Between every treatment, the cultures were maintained in an incubator in an enriched liquid medium. The effect of selection was assessed by calculating the survival rate in two selected lines as well as in a sample from the untreated synthetic population. By calculating the CFU/mL of

the populations that underwent ultrasound sonication, it was determined that the selected lines had a significantly higher survival rate compared to the unselected bacteria.

Further research should discover the physiological, genetic and molecular mechanisms on which these adaptations were based. 