

Wpływ zastosowania plazmidów antybakteryjnych o ukierunkowanym działaniu na charakterystykę metaboliczną gleby

Jarosław Ciepiel¹, Anna Marzec – Grządziel¹, Anna Gałązka¹

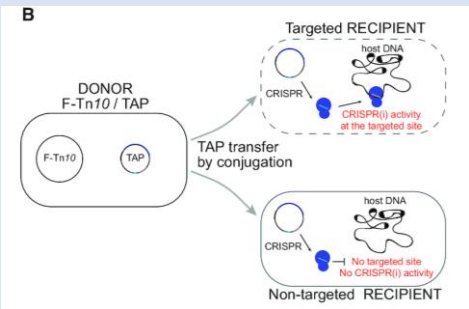
¹ Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii,
jciepiel@iung.pulawy.pl
agrzadziel@iung.pulawy.pl

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki [2021/03/Y/NZ7/00123] oraz JPIAMR-ACTION GA no 963864



Globalne rozprzestrzenianie się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) wśród bakterii patogennych jest uznawane za jeden z największych problemów w dziedzinie zdrowia publicznego i staje się priorytetem badawczym w mikrobiologii. Oporność na leki wzrasta wykładniczo dla niektórych organizmów bakteryjnych i staje się głównym zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego na całym świecie. Infekcje lekooporne są obecnie odpowiedzialne za ~700 000 zgonów każdego roku. Jeśli nie zostaną podjęte żadne działania, liczba ta może wzrosnąć do 10 milionów do 2050 roku. W związku z tym faktem władze krajowe i międzynarodowe podkreślają potrzebę wyprowadzenia szerokiego, skoordynowanego podejścia do opracowania nowych strategii antybakteryjnych w celu walki z bakteriami lekoopornymi w wielu sektorach, takich jak zdrowie ludzi i zwierząt, rolnictwo i środowisko (tj. główne wyzwanie „One health”).

Innowacyjna strategia STARS-TAP opiera się na zastosowaniu plazmidów TAP (Targeted-Antibacterial-Plasmids), które wykorzystują koniugację DNA w celu dostarczenia systemów CRISPR/Cas wywierających aktywność antybakteryjną na specyficznie ukierunkowane szczepy AMR (Ryc.1). *In vitro* wykazano, że TAP mogą selektywnie zabijać szczepy AMR poprzez celowanie w chromosom lub przywracać wrażliwość szczepów na antybiotyki poprzez celowanie w plazmidy lekooporności, bez wpływu na inne szczepy obecne w populacji bakterii.



Ryc.1 Schemat strategii TAPs

W projekcie, planujemy opracowanie bibliotek TAP skierowanych przeciwko wielu klinicznie i środowiskowo istotnym szczepom AMR lub przeciwko specyficznym genom AMR nadającym oporność na beta-laktamy (głównie karbapenemy). Ocenimy zdolność TAPs do specyficznej eliminacji szczepów AMR ze ścieków szpitalnych oraz mikrobioty jelitowej zwierząt. Zajmiemy się również rozprzestrzenianiem się TAPs i ich zdolnością do eliminacji szczepów AMR w ryzosferze roślin oraz glebie. Ta niezbadana i wszechstronna strategia antybakteryjna może być obiecującym podejściem uzupełniającym antybiotykoterapię, w profilaktyce ludzi i zwierząt zakażonych lub skolonizowanych szczepami AMR, a nawet w celu uniknięcia rozprzestrzeniania się AMR w zantropogenizowanych zbiornikach środowiskowych, takich jak gleby rolnicze i ścieki.

Zespół IUNG-PIB odpowiada za:

Izolacja DNA z próbek glebowych (analiza metataksonomiczna)
Izolacja RNA z próbek glebowych (analiza metatranskryptomiczna)
Analiza bioinformatyczna
Analiza BIOLOG próbek glebowych

Członkowie konsorcjum:

Christian Lesterlin

Centre National de la Recherche Scientifique, France (Koordynator)

Pierre Bogaerts

UCL – Université Catholique de Louvain, Belgium

Gregory Jubelin

French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment, France

Anna Marzec-Grządziel

Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Poland

William Couet

French National Institute of Health and Medical Research, France



UCLouvain

INRAE

IUNG

Inserm

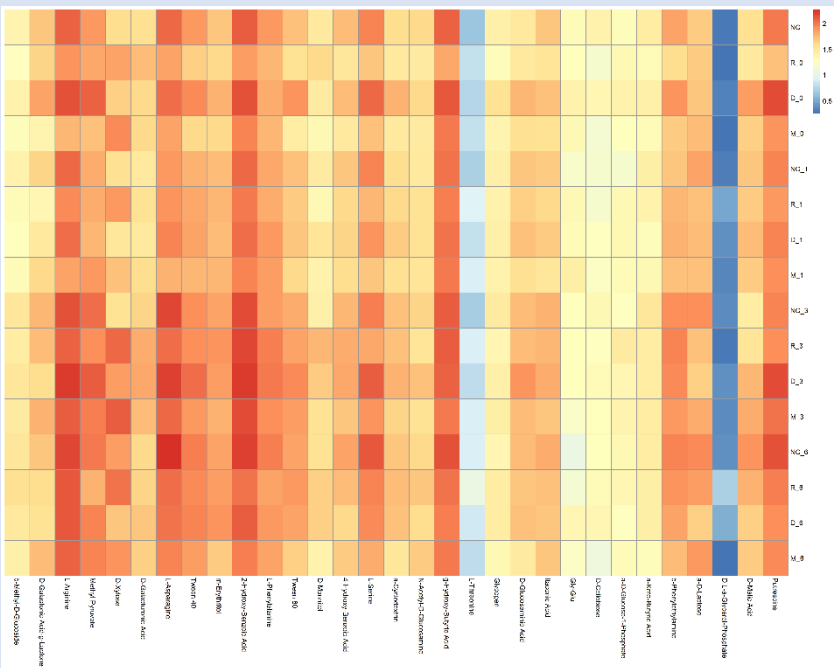
Materialy i metody:

Aktywność metaboliczną w próbkach gleby sprawdzono z wykorzystaniem metody BIOLOG. Wykonano 1% roztwór gleby w wodzie i nanoszono na płytki EcoPlates. Płytki inkubowano w temperaturze 25°C. Odczyt prowadzono co 24h (do 120h). Analizę statystyczną wykonano na danych uzyskanych po 96 godzinach. Wizualizacje wykonano w R (microeco, phemap, ggplot2).

Sample_ID	Days of incubation	Inoculation
NC_0	0	non inoculate (100uL of NaCl 0,8%)
NC_1	1	
NC_3	3	
NC_6	6	
D_0	0	inoculate with 100uL of Donor LY3922 (E. coli MGT) (TAP-sRP4-Gm-Cas9- ptetRa-sfGFP-nsp)
D_1	1	
D_3	3	
D_6	6	
R_0	0	inoculate with 100uL of Recipient (LY2615 - E. coli ST131)
R_1	1	
R_3	3	
R_6	6	
M_0	0	inoculate with 100uL of both (Donor + Recipient)
M_1	1	
M_3	3	
M_6	6	

Wyniki:

Nie wykazano różnic w rozkładzie substratów w analizowanych grupach (Ryc.2). Wskaźniki Alpha Biodiversity nie wykazały wyników statystycznie istotnych. Można więc wyciągnąć wniosek, że zastosowanie przedstawionej metody nie wpłynęło na całokształt procesów metabolicznych w próbkach gleby. Analiza Metastat pozwoliła na wykrycie pojedynczych różnic w rozkładzie substratów lub ich grup. Wykazano spadek rozkładu Gly-Glu w czasie, oraz wzrost intensywności rozkładu b-Methyl-D-Glucoside. W grupie M względem grupy gdzie zastosowano tylko donor, w 3 dniu inkubacji wykazano wzrost rozkładu D-Xylose, L-Threonine, b-Methyl-D-Glucoside, L-Phenylalanine, a-D-Lactose, D-Galacturonic Acid. W 6 dniu były to D-Galactonic Acid-g-Lactone, a-D-Lactose, oraz N-Acetyl-D-Glucosamine.



Ryc.2 Rozkład pojedynczych substratów w analizie BIOLOG