

**MEGA-plate -
New evolutionary
and coselection
microbiological method**

Á. Kerek^{1*}
B. Török²
Á. Jerzsele¹

1. ÁTE, Gyógyszertani
és Méregtani Tanszék,
H-1078 Budapest, István utca 2.

*e-mail: kerek.adam@univet.hu

2. Állatorvostudományi Egyetem,
hallgató

MEGA-plate – Új evolúciós és koszelekciós mikrobiológiai vizsgálati módszer

Kerek Ádám^{1*}, Török Bence², Jerzsele Ákos¹

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők bemutatják Magyarországon először a MEGA-plate (Microbial Evolution and Growth Arena) mikrobiológiai tenyésztő edény készítésének metodikáját, amely evolúciós és koszelekciós vizsgálatok laboratóriumi kivitelezésére nyújt lehetőséget. A polikarbonát edény gyártását követően először a megfelelő fertőtlenítési protokollt kellett kidolgozni. Végül a kolisztin hatóanyag példáján mutatjuk be a MEGA-plate-en történő agaröntés menetét. A módszer alkalmas az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának ellenőrzött körülmények között történő indukálására és vizsgálatára. A korábbi passzálós módszerekhez képest méretéből eredően nagyobb teret biztosít a rezisztens törzsek szelekciójához, miközben a növekvő antibiotikumkoncentráció-grádiens fokozatos evolúciós nyomást biztosít.

SUMMARY

Background: Adaptive Laboratory Evolution (ALE) studies have been of interest to researchers since the 1980s. These systems allow, among other things, the evolution and coselection of microorganisms under controlled conditions. An important aspect is the maintenance of reproductive capacity, so that mutations can spread in the study population and become fixed in the offspring.

Objectives: The MEGA-plate is a giant Petri-dish developed by Harvard University, which we aim to implement in Hungary in the form of a 60 × 30 cm polycarbonate plate dish.

Materials and Methods: After production, we first had to develop an effective disinfection protocol using 7.5% hydrogen peroxide for 15 minutes of immersion, wiping the rest of the vessel with 0.9% NaOCl, and then exposing the vessel to UV light for 30 minutes after the hydrogen peroxide was removed. Before and after disinfection, sterile swabs were used to check the effectiveness of disinfection. After the test cast, Acryl dye was mixed into the bottom and middle agar layers to contrast the culture medium so that bacterial growth could be clearly seen. To avoid fungal overgrowth, 60 µg/ml cycloheximide was mixed into all layers of agar and for antibiotic testing, concentrations of bacterial MIC of 0×, 1×, 10×, 100× and 1000× were mixed into each compartment of the bottom layer.

Results and Discussion: We were the first in Hungary to prepare the MEGA-plate vessel, we developed a successful disinfection protocol, which completely eradicated the presence of undesirable microorganisms. After a successful test casting, we solved the contrasting of the culture medium with Acryl dye to clearly visualize the growth of bacterial colonies and then successfully started testing the individual antibiotics.

A *kísérleti evolúció* egy olyan kutatási módszer, amely lehetőséget ad az evolúciós folyamatok valós időben történő tanulmányozására. Ennek az egyik alapja a populációk versengéssel történő alkalmazkodása bizonyos megváltozott környezeti feltételekhez. A legtöbb adaptáció a kompromisszumokhoz kapcsolódik, tehát olyan tulajdonságok változásához, amelyek az adott környezetben növelik az élőlények fitneszét [1]. Ilyen kísérleti evolúciós vizsgálattal bizonyították pl., hogy a baktériumok az antimikrobiális peptidekkel szemben is képesek kialakítani rezisztenciát [2]. Ha egy ilyen vizsgálatot szemléltetni szeretnénk, az *Escherichia coli* (*E. coli*) citráthasznosításáért felelős mutáció létrejöttéhez 31 000 generációra volt szükség, és a megismételt 12 vizsgálatból is csak egy alkalommal következett be ez a változás [3]. Évtizedeken keresztül a kísérleti evolúció volt a vírusos és bakteriális betegségek elleni élő, attenuált vakcinák fejlesztésének módja, ennek során a kórokozókat sorozatosan passzálták más gazdafajokban vagy táptalajon, amíg azok patogenitása nem csökkent [4, 5]. A koevolúciós vizsgálat arra utal, hogy egy adott populáció génjei és tulajdonságai hatással vannak a faj egyes egyedeire, amely hatások az utódnemzedékekben figyelhetők majd meg. A mikrobákkal végzett vizsgálatok általában egyetlen klónból indulnak ki [6, 7].

A laboratóriumi evolúciós vizsgálatok alapja egy szelekciós nyomásként ható, folyamatos környezeti stressz alkalmazása a mikrobákra nézve

Az úgynevezett *laboratóriumi evolúciós vizsgálatok* (ALE, Adaptive Laboratory Evolution) megbízható, ellenőrzött körülmények között zajló evolúciós megfigyeléseket tesznek lehetővé, amelyek molekuláris vizsgálatokkal jól kiegészíthetők [8]. Elsőként BROWN és OLIVER 1982-ben dolgozott ki egy rendszert, amely során etanollal szemben toleráns gombafajok előállítását sikerült kísérletes úton megvalósítaniuk, folyamatos szelekciós nyomás segítségével [9]. A módszer alapja egy olyan folyamatos környezeti stressz alkalmazása a mikrobákra nézve, ami szelekciós nyomásként hat a populációjukra. Ez lehet szélsőséges hőmérséklet, pH, de akár gátló vagy toxikus anyag. A módszer során a stresszfaktor fokozatos növelése révén érik el a stressztűrő mutánsokra irányuló szelekciós nyomást. Fontos szempont a reprodukciós képesség fenntartása, hogy a mutációk a vizsgált populációban elterjedhessenek és az utódokban rögzüljenek [10]. BUTLER 1996-ban *Streptomyces* élesztőgombákon folytatta BROWN és OLIVER segítségével a korábbi kísérleteket [11]. Ekkor még az etanolt a tápközegbe szakaszosan, szabályozható pumpa segítségével juttatták be [10]. A baktériumok laboratóriumi evolúciós vizsgálatai kezdetben meghatározott gyógyszer-koncentrációkkal történtek, amihez olyan töménységet kellett kiválasztani, hogy az ún. *mutációs szelekciós ablak* (MSW, Mutant Selection Window) lehetőséget adjon egy-egy rezisztens mutáns szelekciójára. Ezt követően egyre nagyobb koncentrációkra volt szükség ahhoz, hogy a szelekciós nyomást fenntartsák. Ehhez olyan kísérleti rendszerre volt szükség, ami folyamatosan biztosította a növekvő hatóanyag-koncentrációt és így az evolúciós adaptációt [12, 13]. TOPRAK és mtsai 2011-ben kifejlesztettek egy olyan eszközt, amit *mobidosztátnak* neveztek, ezzel folyamatosan növekvő antibiotikumkoncentráció-szabályozással tudták fenntartani a mikrobák növekvő szelekciós nyomását. A módszerrel az *E. coli* klóramfenikol, doxiciklin és trimetoprim hatóanyagokkal szembeni rezisztenciaevolúcióját vizsgálták [14]. A rövidtávú evolúciós laboratóriumi vizsgálatok fejlődését a genomszekvenálás egyre szélesebb körben való elterjedése tette lehetővé. A mikrobák esetén az ilyen vizsgálatokat a rövid generációs idő, a kísérletek megismételhetősége, a nagy populációs méretek teszik lehetővé. Ezen vizsgálatok során sikerült feltárni az egyes mutációk közötti összefüggéseket, különös tekintettel az adaptációs mechanizmusokra [8].

A baktériumok esetén az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedéséhez különösen hozzájárul az egyes fertőzések során kialakult baktériumpopulációk mérete, pl. egy tuberkulózisos elváltozásban 10^7 – 10^8 CFU baktérium is előfordulhat [15]. A szelekciót elősegíti a nem megfelelően kiválasztott gyógyszerdózis

Baktériumok esetében a leggyakrabban használt szelekciós nyomás az antibiotikumok növekvő koncentrációja

A kísérleti evolúció lehetőséget ad az evolúciós folyamatok valós időben történő tanulmányozására

[16], a stressz [17], a kialakult rezisztencia mechanizmusok pedig mobilis genetikai elemek révén plazmidok, transzpozonok és integronok segítségével tovább adható [18]. Egy kísérletben mikrofluidikus eszközt használtak, amely ciprofloxacinnal egyenletesen növekvő koncentrációját tartalmazó speciális edény, az erre oltott baktériumok rezisztenciája mindössze 10 óra alatt kialakult, amihez három gén és egy nukleotid szubsztitúciós változására volt szükség [19].

2016-ban a Harvard Egyetem kutatói egy olyan evolúciós és koszelektív vizsgálóra alkalmas laboratóriumi közeget hoztak létre, ami alkalmas a baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásának vizsgálatára. A kísérleti eszköz a MEGA-plate, azaz a *Microbial Evolution and Growth Arena*. Újgenerációs genomszekvenálással az innen származó minták vizsgálata során az egyes mechanizmusokat kódoló gének megjelenése is nyomon követhető [20].

A szerzők célul tűzték ki, hogy Magyarországon elsőként valósítsák meg a MEGA-plate rendszert és adaptálják annak működését hazai viszonyok között. A továbbiakban bemutatják a sikeres hazai megvalósítás lépéseit, valamint a rendszer működését.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az eredeti MEGA-plate egy 120 × 60 cm-es polikarbonát lemezből készült edény, amelynek a használatához egy külön szobát rendeztek be, a megfelelő környezeti feltételek biztosítása érdekében [20]. A laboratóriumi lehetőségeink egy kisebb rendszer kiépítésére adtak lehetőséget, a limitáló tényező a termosztát mérete volt. Ezért egy 60 × 30 cm-es polikarbonát edény elkészítését tűztük ki célul. Átlátszó polikarbonát lemezből, saját tervezés alapján (1. ábra) legyártattuk a saját MEGA-plate edényünket (2. ábra). A tenyésztőedény 5 mm-es polikarbonát lemezből készült, elkészítésében az Innoterm Kft. (Budapest) működött közre. A ragasztás tetrahidrofurán ragasztóval történt, ami vízmentes zárást biztosít. Az edény alja kilenc egyenlő sávra van osztva, amelyek biztosítják a növekvő antibiotikumkoncentrációt tartalmazó táptalajok alsó rétegben történő elkülönítését (3. ábra).

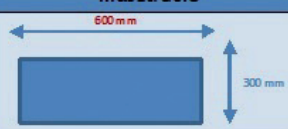

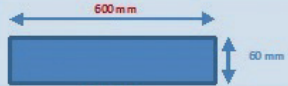
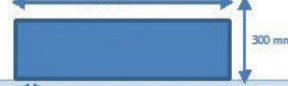
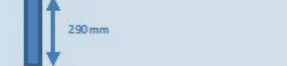
A szerzők egy 60 × 30 cm-es polikarbonát edény elkészítését tűztük ki célul

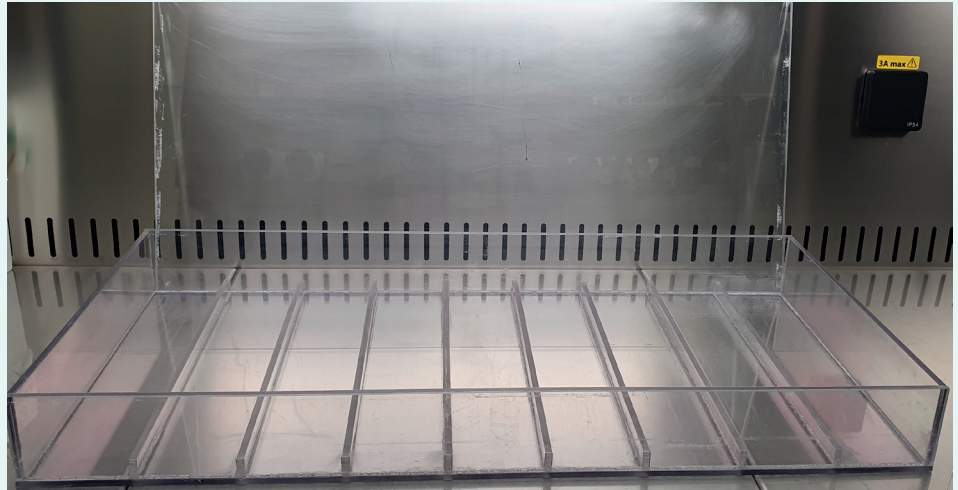
1. ÁBRA Magyarországi MEGA-plate terve

Hazai körülmények között 60 × 30 cm nagyságú áttetsző polikarbonát lemezből terveztük az edényt, amely egy alaplapból (600 × 300 mm), kettő rövid oldallapból (290 × 60 mm), kettő hosszú oldallapból (600 × 60 mm), egy tetőlapból (600 × 300 mm) és nyolc elválasztóból (12,5 × 290 mm) áll

FIGURE 1. Hungarian MEGA-plate blueprint

The vessel is designed with a 60 × 30 cm transparent polycarbonate sheet, consisting of a base plate (600 × 300 mm), two short side plates (290 × 60 mm), two long side plates (600 × 60 mm), a top plate (600 × 300 mm) and eight dividers (12.5 × 290 mm)

Megnevezés	Méret (mm)	Illusztráció
Alaplap (5 mm anyagvastagság)	600x300	
Rövid oldallap (5 mm anyagvastagság)	290x60	
Hosszú oldallap (5 mm anyagvastagság)	600x60	
Tetőlap (5 mm anyagvastagság)	600x300	
Elválasztók (5 mm anyagvastagság)	12,5x290	

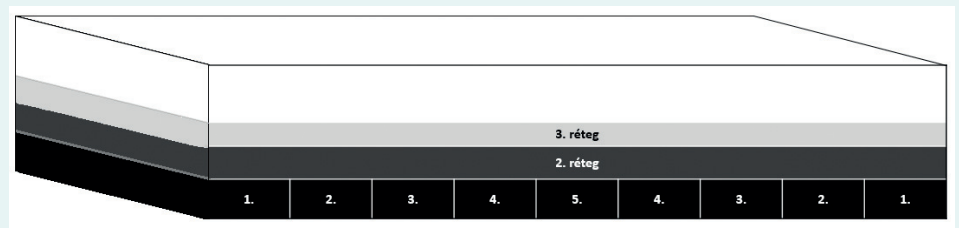


2. ÁBRA. Az elkészült MEGA-plate edény

Az elkészített edény átlátszó polikarbonát lemezből készült, ragasztása vízhatlan tetrahidrofurán ragasztóval történt. Az alsó réteget nyolc elválasztó osztja kilenc egyenlő részre

FIGURE 2. The finished MEGA-plate dish

The vessel is made of transparent polycarbonate sheet, glued with waterproof tetrahydrofuran glue. The bottom layer is divided into nine equal parts by eight dividers



3. ÁBRA. A MEGA-plate lemez öntése során kialakított rétegek

A táptalajöntés során három réteg kerül kialakításra. Az első réteg kilenc egyenlő rekeszből áll, amelyek a vizsgált antibiotikum 0×, 1×, 10×, 100× és 1000× koncentrációját tartalmazzák az edény két szélétől befelé növekvő sorrendben (1–5. rekeszek), a 2. réteg egy egybefüggő szilárd agarréteg, ami a homogenitást biztosítja az 1. és 3. réteg között. A 3. réteg egy félfolyékony agar, ami a baktériumok diffúz növekedését teszi lehetővé a növekvő hatóanyag koncentráció grádienssel szemben

FIGURE 3. Layers formed during the casting of MEGA-plate

Three layers are formed during the culture medium casting process. The first layer consists of nine equal compartments containing concentrations of the antibiotic of interest of 0×, 1×, 10×, 100× and 1000× in ascending order from the two edges of the dish (compartments 1–5), layer 2 is a continuous solid agar layer which provides homogeneity between layers 1 and 3. Layer 3 is a semi-liquid agar, which allows diffusive growth of bacteria against a gradient of increasing drug concentration

FERTŐTLENÍTÉSI PROTOKOLL

Az edény legyártását követően ki kellett dolgozni egy olyan módszert, ami hatékony fertőtlenítést tesz lehetővé, azért, hogy a kontaminációt elkerüljük. A Harvard Egyetem munkatársai 10%-os NaOCl-el (háztartási hipó) töltötték fel egy

A fertőtlenítéshez 7,5%-os hidrogén-peroxid-oldatot használtak

éjszakára az edényt [20]. Környezetvédelmi megfontolásból mi ezen a módszeren változtattunk, egyrészt mert a NaOCl jelentős környezetterhelést jelent, másrészt hogy ne maradjon maradékanyag a polikarbonát lemezen, ami befolyásolhatná a baktériumok növekedését. Ezért szakirodalmi adatokra hagyatkozva 7,5%-os hidrogén-peroxid-oldatot készítettünk, tömény (30%), stabilizált hidrogén-peroxid hígításával. A tömény hidrogén-peroxid egy literét hígítottuk fel három liter csapvízzel. A MEGA-plate lemezt steril fülke (lamináris boks) alá helyeztük, ezt követően feltöltöttük a 7,5%-os hidrogén-peroxiddal (4. ábra). Az edény peremét és a fedőlemez belső felületét NaOCl-oldattal töröltük át, amelyhez a kereskedelmi forgalomban kapható 4,5%-os oldatot négyszeresére hígítva 0,9%-os oldatot használtunk. A steril fülke alatt 15 perc inkubációs időt követően, vákuumszivattyú segítségével leszívjuk a hidrogén-peroxidot az edényből. Ezt követően a steril fülke alatt 30 percre UV-fényt kapcsolunk.



4. ÁBRA. A MEGA-plate fertőtlenítése

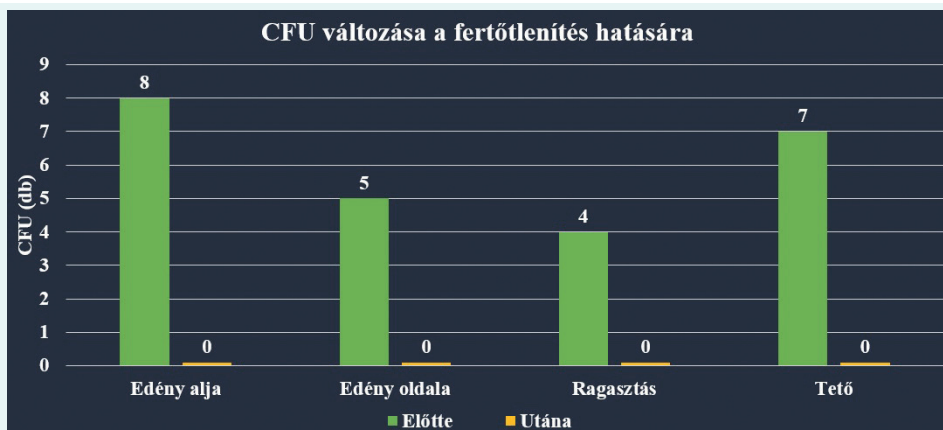
A fertőtlenítés során steril fülke alatt az edényt 7,5%-os hidrogén-peroxiddal töltjük meg, a peremét és a tető belső felületét 0,9%-os NaOCl-al töröljük át. 15 perc inkubációt követően vákuumszivattyú segítségével szívjuk le a hidrogén-peroxidot, majd 30 percre bekapcsoljuk az UV lámpát

FIGURE 4. Disinfecting the MEGA-plate

During the disinfection, the vessel is filled with 7.5% hydrogen peroxide under a sterile booth, the rim and the inner surface of the lid are wiped with 0.9% NaOCl. After 15 minutes of incubation, we aspirate the hydrogen peroxide with a vacuum pump and turn on the UV lamp for 30 minutes

A fertőtlenítést megelőzően és azt követően is tamponmintákat vettek baktériumtenyésztésre

A fertőtlenítés hatékonyságát úgy ellenőriztük, hogy a fertőtlenítés előtt steril vattapálcával mintát vettünk az edény aljáról, az oldalfaláról, a ragasztás mentén és a fedőlemez belső felületéről. A mintákat tripton-szója agart tartalmazó Petri-csészére oltottuk ki. A fertőtlenítést követően megismételtük a mintavételt. Ezen kívül az edényt feltöltöttük három liter tripton-szója levest (TSB) tartalmazó táplevessel. A kioltott mintákat és a lefedett edényt is 37 °C-os inkubátorba helyeztük. 24 órás inkubációt követően a fertőtlenítés előtt vett minták kis számban tartalmaztak baktériumtelepeket, az azt követően vett mintákból azonban nem nőtt ki telepformáló egység (CFU, Colony Forming Unit) és a táplevesben sem tapasztaltunk zavarosodást. A táplevessel feltöltött edényt további egy héten keresztül inkubáltuk 37 °C-on, azonban ezt követően sem tapasztaltunk benne elváltozást. Összességében tehát elmondható, hogy a fertőtlenítési protokollunk hatékonynak bizonyult (5. ábra) és egy hét inkubációt követően sem történt befertőződés (6. ábra).



5. ÁBRA. A fertőtlenítés hatékonyságának ellenőrzése tamponmintával

A fertőtlenítést megelőzően steril tamponnal mintát vettünk az edény aljáról, az edény oldaláról, a ragasztás mentén és a tetőről, majd ezt megismételtük a fertőtlenítést követően is. A mintákat ezután tripton-szója agart tartalmazó Petri-csészékre kentük le, amiket 24 órára 37 °C-os termosztátba helyeztünk. Az inkubációt követően megszámláltuk a Petri-csészéken a telepformáló egységeket, amelyből jól látszik, hogy a fertőtlenítést követően ez minden esetben nulla volt

FIGURE 5. Checking the effectiveness of disinfection with a swab sample

Prior to disinfection, samples were taken with a sterile swab from the bottom of the vessel, the sides of the vessel, along the adhesive and the roof, and repeated after disinfection. The samples were then smeared onto Petri dishes containing tryptone-soy agar and placed in a 37 °C thermostat for 24 hours. After incubation, the colony-forming units on the Petri dishes were counted, clearly showing that in all cases it was zero after disinfection



6. ÁBRA. A táplevessel feltöltött edény

A fertőtlenítés hatékonyságának ellenőrzésére három liter TSB-vel töltöttük fel a MEGA-plate-t, majd azt egy hétre 37 °C-os termosztátba tettük. Egy hét elteltével is jól látszik, hogy a leves zavarodástól mentes

FIGURE 6. The dish filled with broth

To check the effectiveness of the disinfection, three litres of tryptone-soy broth was added to the MEGA plate and placed in a 37 °C thermostat for one week. After a week, it is clear that the soup is turbidity-free

A 2%-os agaralapú táptalajba cikloheximidet keverték a gombás fertőzések megelőzésére

A táptalaj öntése három fázisban történt

MEGA-PLATE TÁPTALAJÖNTÉS

Táptalajként 2%-os BD Bacto Agart (Vwr International Kft., Debrecen, Magyarország) használtunk, tápanyagforrásként egy darab LB-Lennox (Vwr International Kft., Debrecen, Magyarország) kapszulát adtunk literenként a táptalajhoz. Saját tapasztalatunk azt mutatta, hogy a baktériumok nagyon lassan nőttek és egy bizonyos pont után nem akartak tovább nőni az edényben, ezt azzal sikerült kiküszöbölnünk, hogy a legfelső rétegbe plusz egy kapszulát raktunk. A gombás befertőződés elkerülése érdekében cikloheximidet (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) használtunk, 64 µg/ml koncentrációban.

A táptalaj öntése három fázisban történt. Először az elválasztott kilenc rekeszbe kellett elkészíteni a 2%-os szilárd táptalajt, amely egy-egy 252 ml térfogatú rekeszbe került. A kilenc elválasztott rekesz a növekvő antibiotikumkoncentrációt tartalmazó táptalajok elválasztására szolgál. Az egyes rekeszek táptalaját külön-külön Duran-üvegben készítettük el. Bemértük a szükséges agart, az ioncserélt vizet és üvegenként egy ml akrilfestéket. Ezt követően 40 percen keresztül 121 °C-on autoklávoztuk őket, majd amint 50 °C körüli hőmérsékletre hűlt vissza az agar, hozzáadtuk a cikloheximidet. A cikloheximid elkészítéséhez 226,8 mg cikloheximidből és 14 ml ioncserélt vízből készítettünk törzsoldatot, majd azt cellulóz szűrőn steril fülke alatt átszűrtük. Így az alsó réteg esetén mindegyik rekesz táptalajához 1 ml cikloheximid-törzsoldatot mértünk, ezzel elérve a 64 µg/ml koncentrációt. A második réteg 760 ml egybefüggő agarréteg, amely felülrétegi a különböző antibiotikumkoncentrációt tartalmazó rekeszeket, ezáltal megteremtve az alsó és legfelső harmadik réteg határfelületei közötti homogenitást. Ebbe a rétegbe 3 ml cikloheximid-törzsoldat és 3 ml festék került. Végül ennek megszilárdulását követően a harmadik réteghez egy 0,28%-os félfolyékony agar-réteget készítettünk, amibe 2 ml cikloheximid került, azonban ehhez tintát már nem adtunk (1. táblázat). Ez a félfolyékony réteg biztosítja a baktériumok táptalajban történő diffúz terjedését a növekvő antibiotikum-koncentrációval szemben. A legfelső réteg megszilárdulását követően a MEGA-plate lemez elkészült, a tetejét ráhelyezve, az illeszkedését pedig leragasztva megelőzhető a befertőződés.

1. TÁBLÁZAT. Az egyes rétegekben kialakított cikloheximid-koncentrációk

Törzsoldatot készítettünk 226,8 mg cikloheximidből 14 ml ioncserélt vízben. Miután cellulóz szűrőn átszűrtük, az első réteg mindegyik rekeszébe 1 ml oldatot, a második rétegbe 3 ml oldatot és a harmadik rétegbe 2 ml oldatot mértünk be, a gombás felülfertőződés megakadályozása érdekében

TABLE 1. Cycloheximide concentrations in each layer

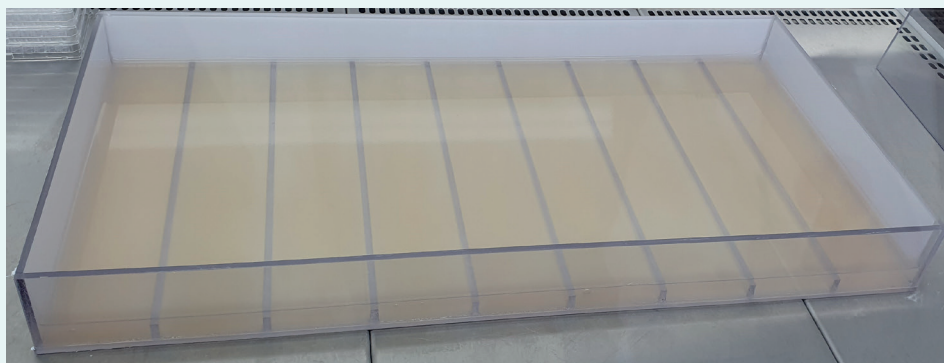
A stock solution of 226.8 mg cycloheximide in 14 ml of deionised water was prepared. After filtering through a cellulose filter, 1 ml of solution was added to each compartment of the first layer, 3 ml of solution to the second layer and 2 ml of solution to the third layer to prevent fungal overgrowth

Cikloheximid, 226,8 mg/14 ml											
	1. réteg									2. réteg	3. réteg
Mennyiség (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
Cikloheximid (mg)	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	48,6	32,4
Agar összesen (ml)	252	252	252	252	252	252	252	252	252	760	500
Koncentráció (µg/ml)	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64

Következő lépésként ellenőriznünk kellett, hogy a baktériumot a legfelső rétegre ráolva egyenletesen benövi-e az a tenyésztőedényt. Ehhez először egy hatóanyagmentes agart készítettünk, majd mindkét rövid oldalának szélére 100–100 µl *E. coli* baktériumleves-szuspenziót oltottunk egyenletesen szét-

*A baktériumok
növekedésének
láthatóvá tételéhez
fekete akrilfestéket
használtak*

osztva. A tapasztalatunk az volt, hogy ha a legfelső réteg készítésénél abba plusz egy kapszulát tettünk, akkor a baktérium egyenletesen mindkét szélről a tenyésztőedény közepe felé haladva 3 nap alatt benőtte azt (7. ábra). Ahhoz, hogy a baktériumok növekedését szabad szemmel is jól nyomon tudjuk követni, kontrasztosításra volt szükség. Ehhez fekete akrilfestéket használtunk, amelyből 252 ml táptalajonként 1 ml-t adtunk, kivéve a legfelső réteget (8. ábra). Ezt követően a rendszer adott baktérium, adott hatóanyaggal szembeni növekvő koncentrációgrádienssel szemben kialakított evolúciós és koszelekciós rezisztencia vizsgálatára alkalmassá vált.



7. ÁBRA. *Első próbaöntés*

Az első próbaöntés során a táptalaj nem tartalmazott antibiotikumot, arra voltunk kíváncsiak, hogy a ráoltott *E. coli* mennyi idő alatt növi be az edényt. Ráoltást követően három nappal volt szüksége, hogy teljesen benője azt, azonban ehhez a legfelső fél folyékony rétegbe egy plusz kapszulát kellett raknunk

FIGURE 7. *First test cast*

In the first test cast, the medium did not contain any antibiotics, and we were curious to see how long it would take the inoculated *E. coli* to grow in the dish. After inoculation, it took three days to fully colonise, but this required an extra capsule in the top semi-liquid layer



8. ÁBRA. *A táptalaj kontrasztosítása fekete festékkel*

Ahhoz, hogy a baktérium telepek növekedése a felső harmadik rétegben jól látható legyen, fekete kontrasztra volt szükség az alsóbb második és első rétegekben, ezért ezek táptalajához Acryl fekete festéket kevertünk

FIGURE 8. *Contrasting the medium with black dye*

To make the bacterial colony growth in the upper third layer clearly visible, black contrast was needed in the lower second and first layers, so Acryl black dye was mixed with the medium

VIZSGÁLAT KOLISZTINTARTALMÚ MEGA-PLATEN *E. COLI* BAKTÉRIUMMAL

A baktériumok növekedésének láthatóvá tételéhez fekete akrilfestéket használtak

Elsőként a vizsgált mikroba adott antibiotikumra vonatkozó MIC-értékét kell meghatározni. *E. coli* esetén kolisztinre nézve ez 1 µg/ml volt. A két szélső sávba nem került antibiotikum. Ezt követően ki kell számolni, hogy a MIC-értéknek a tízes alapú növelése alapján a 2. rekeszbe 1 µg/ml, a 3. rekeszbe 10 µg/ml, a 4. rekeszbe 100 µg/ml és végül az 5. rekeszbe 1000 µg/ml hatóanyag szükséges. Egy rekesz 252 ml, tehát pl. a 2. sávba 252 µg hatóanyag volt szükséges és így tovább. A középső sáv esetén ez 315 mg volt, amit 25 ml ioncserélt vízben oldottunk fel, majd steril fülke alatt cellulóz szűrővel szűrtünk át. A két szélső sávba hatóanyag nem került, így azok 250 ml vízben oldott agarból készültek (1 ml tintával és 1 ml cikloheximiddel számolva), a többi hatóanyagot tartalmazó rekesz esetén 27 ml-el kevesebb vízzel készültek a táptalajok (1 ml tintával és 1 ml cikloheximiddel számolva/rekesz), hiszen az autoklávozást követően a táptalaj 50 °C körüli hőmérsékletre történő hűtését követően került sor steril fülke alatt az 1 ml cikloheximid és a hozzá tartozó 25 ml antibiotikumkoncentrátum bemérésére. Ez összeadva minden rekesz esetén 252 ml végtérfogatot jelentett. Az 5. rekesz törzsoldatából kettőt készítettünk, az egyik az 1000× koncentrációnak felel meg, ha azt az 5. rekesz táptalajához öntjük. A másikkól a többi réteghez ebből hígítva készítettünk törzsoldatot, méghozzá azon az elven, hogy a 4. rekeszhez ebből a törzsoldatból kimértünk 2,5 ml-t, amit 22,5 ml TSB-hez adtunk, így megkaptuk a 4. rekesz 25 ml törzsoldatát (100× koncentráció). A 3. rekeszhez kimértünk 0,25 ml-t, amit 24,75 ml TSB-hez adtunk, így megkaptuk a 3. rekesz 25 ml törzsoldatát (10× koncentráció). A 2. rekeszhez kimértünk 0,025 ml-t, amit 24,975 ml TSB-hez adtunk, így megkaptuk a 2. rekesz 25 ml törzsoldatát (1× koncentráció), ezzel elkészítve a 0×, 1×, 10×, 100× és 1000× hatóanyag-koncentrációkat (2. táblázat).

2. TÁBLÁZAT. A szükséges hatóanyag mennyiségének kiszámítása és a rendszer összeállítása a kolisztin példáján

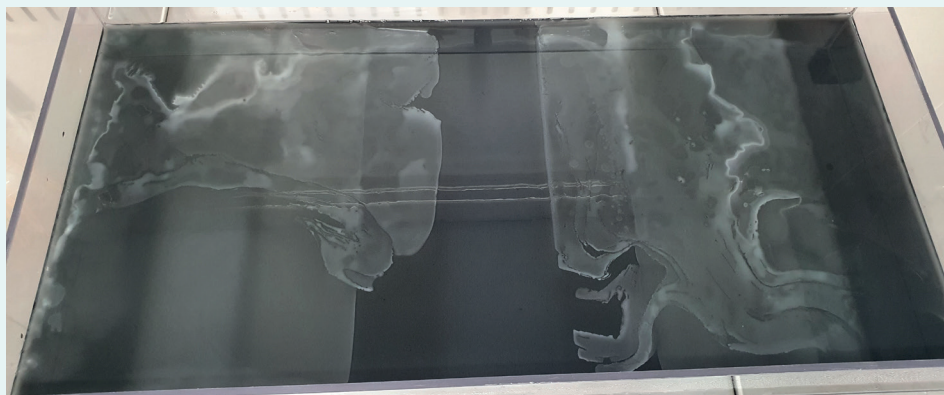
Antibiotikum hatóanyagot csak az első réteg tartalmaz, rekeszenként a vizsgált baktérium MIC-értékének 0×, 1×, 10×, 100× és 1000× koncentrációjában. A legegyszerűbben úgy készíthető el, hogy az 1000× középső rétegből 2 × 25 ml törzsoldatot készítsünk. Ebből az egyik a középső 1000× rétegbe kerül, a másikat tovább hígítva megkapjuk a 100×, 10× és 1× rekeszekhez szükséges 25–25 ml törzsoldatokat. Az autoklávozást követően, miután az egyes táptalajok kb. 50 °C-ig kihűltek, steril fülke alatt hozzájuk adjuk a megfelelő törzsoldatot

TABLE 2. Calculation and preparation of the required active substance using the example of colistin

Only the first layer contains antibiotic active ingredient, at concentrations of 0×, 1×, 10×, 100× and 1000× the MIC of the bacteria under test per compartment. The easiest way to prepare the 1000× middle layer is to prepare 2 × 25 ml of the 1000× middle layer. One of these is added to the 1000× middle layer and the other is further diluted to obtain the 25–25 ml stock solutions required for the 100×, 10× and 1× compartments. After autoclaving, after each medium has cooled to about 50 °C, the appropriate stock solution is added under sterile conditions

Koliszinttartalmú MEGA-plate (1 µg/ml MIC)											
	1. réteg									2. réteg	3. réteg
Festék (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
Cikloheximid (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
Agar (ml)	250	225	225	225	225	225	225	225	250	754	496
TSB (ml)	-	24,975	24,75	22,5	-	22,5	24,75	24,975	-	-	-
5. törzsoldat (ml)	-	0,025	0,25	2,5	25	2,5	0,25	0,025	-	-	-
Koncentráció (µg/ml)	-	1	10	100	1000	100	10	1	-	-	-

Az egyes rétegek öntését, majd a baktérium ráoltását követően a MEGA-plate lemez tetejét az illesztés mentén leragasztottuk, legalább egy 10 cm-es szakasz kivételével, hogy a felesleges víz el tudjon párologni és ne okozzon kondenzvíz-lecsapódást az edényen belül, ami megzavarná a baktériumok terjedését. A lemezt 37 °C-os termosztátba helyeztük és naponta steril fülke alatt a tetejét eltávolítva jól nyomon követhető a baktérium diffúziója, amiből mintát lehet venni további vizsgálatokra (9. ábra).



9. ÁBRA. A kolisztint tartalmazó táptalajon növekvő *E. coli*

A kolisztin MIC-értékének 0×, 1×, 10×, 100× és 1000× koncentrációját tartalmazó edényt a szélére oltott *E. coli* a 100× koncentrációig 4 nap alatt benőtte, jól látszik, hogy az 1000× koncentráció határán a baktérium növekedése megállt. Ahhoz, hogy ezt a határt is áttörje a baktérium, még néhány napra szükség van

FIGURE 9. *E. coli* growing on medium containing colistin

E. coli inoculated at the edge of the dish containing MIC concentrations of colistin 0×, 1×, 10×, 100× and 1000× were overgrown up to 100× concentration in 4 days, clearly showing that at the 1000× concentration limit the bacterial growth stopped. To break through this limit, the bacterium needs a few more days

MEGVITATÁS

A tenyésztés során vett minták vizsgálatával megállapítható a rezisztencia kialakulása és annak genetikai háttere is vizsgálható

Magyarországon elsőként készítettünk MEGA-plate edényt. Sikeresen kidolgoztuk annak hatékony fertőtlenítési protokollját, majd fekete akrilfesték segítségével kontrasztosítottuk a táptalajt, hogy a növekvő baktériumtelepek terjedése jól látható legyen. A rendszer különböző mikroorganizmusok, adott antibiotikum növekvő koncentrációjával szemben kialakuló rezisztencia evolúciós és koszelekciós vizsgálatára alkalmas. Az egyes részekről vett minták újbóli MIC-értékének meghatározásával megállapítható a rezisztencia kialakulásának fenotípusos megnyilvánulása, újgenerációs szekvenálás segítségével pedig a genetikai változások is nyomon követhetők.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-I-ÁTE-1 és ÚNKP-21-2-I-ÁTE-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával, az Állatorvostudományi Egyetem Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottságának (NKB) támogatásával, valamint a TKP2020-NKA-01 számú projekt keretében a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában készült.

IRODALOM

1. Kawecki TJ, Lenski RE, Ebert D, Hollis B, Olivieri I, Whitlock MC (2012) Experimental evolution. *Trends Ecol Evol* 27:547–560
 2. Perron GG, Zaslhoff M, Bell G (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *P R Soc B* 273:251–256
 3. Blount ZD, Borland CZ, Lenski RE (2008) Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *PNAS* 105:7899–7906
 4. Plotkin SA, Plotkin SL (2011) The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol* 9:889–893
 5. Ebert D (1998) Experimental Evolution of Parasites. *Science* 282:1432–1435
 6. Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC (1991) Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *Am Nat* 138:1315–1341
 7. Gerrish PJ, Lenski RE (1998) The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 102:127
 8. Conrad TM, Lewis NE, Palsson BØ (2011) Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol Syst Biol* 7:509
 9. Brown SW, Oliver SG (1982) Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 16:119–122
 10. Lane PG, Hutter A, Oliver SG, Butler PR (1999) Selection of Microbial Mutants Tolerant To Extreme Environmental Stress Using Continuous Culture–Control Design. *Biotechnol Progr* 15:1115–1124
 11. Butler PR, Brown M, Oliver SG (1996) Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection. *Biotechnol Bioeng* 49:185–196
 12. Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ (2010) Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467:82–85
 13. Bryson V, Szybalski W (1952) Microbial Selection. *Science* 116:45–51
 14. Toprak E, Veres A, Michel J–B, Chait R, Hartl DL, Kishony R (2011) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug stress. *Nat Genet* 44:101–105
 15. Sharma SK, Mohan A (2006) Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest* 130:261–272
 16. Olofsson SK, Geli P, Andersson DI, Cars O (2005) Pharmacodynamic model to describe the concentration-dependent selection of cefotaxime-resistant *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:5081–5091
 17. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37:311–320
 18. Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128:1037–1050
 19. Zhang Q, Lambert G, Liao D, Kim H, Robin K, Tung C, Pourmand N, Austin RH (2011) Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science* 333:1764–1767
 20. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, Kishony R (2016) Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 353:1147–1151
- Közlésre érck.: 2022. ápr. 10.